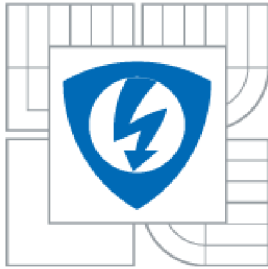




VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ
BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA ELEKTROTECHNIKY A KOMUNIKAČNÍCH
TECHNOLOGIÍ
ÚSTAV BIOMEDICÍNSKÉHO INŽENÝRSTVÍ

FACULTY OF ELECTRICAL ENGINEERING AND COMMUNICATION
DEPARTMENT OF BIOMEDICAL ENGINEERING

DIFERENČNÍ PULZNÍ VOLTAMETRIE PRO DETEKCI METALLOTHIONEINU

DIFFERENCE PULSE VOLTAMETRY FOR DETECTION OF METALLOTHIONEIN

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE
BACHELOR'S THESIS

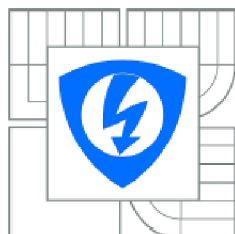
AUTOR PRÁCE
AUTHOR

TEREZA REICHLOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE
SUPERVISOR

prof. Ing. IVO PROVAZNÍK, Ph.D.

BRNO 2011



VYSOKÉ UČENÍ
TECHNICKÉ V BRNĚ

Fakulta elektrotechniky
a komunikačních technologií

Ústav biomedicínského inženýrství

Bakalářská práce

bakalářský studijní obor
Biomedicínská technika a bioinformatika

Studentka: Tereza Reichlová
Ročník: 3

ID: 115112
Akademický rok: 2010/2011

NÁZEV TÉMATU:

Diferenční pulzní voltametrie pro detekci metallothioneinu

POKYNY PRO VYPRACOVÁNÍ:

Seznamte se s problematikou analýzy proteinů moderními biofyzikálními metodami. Práce bude zaměřena na studium metallothioneinu pro pochopení jeho vztahu k nádorovým onemocněním a bude probíhat na pracovišti Mendelovy univerzity. Seznamte se s diferenciální pulzní voltametrií a proveďte základní experiment pro ověření metody.

Navrhňte postup detekce metallothioneinu pomocí diferenciální pulzní voltametrie a proveďte příslušná měření. Interpretujte získaná spektra a výsledky zpracujte pomocí vybraných postupů. Výsledky vyhodnoťte.

DOPORUČENÁ LITERATURA:

- [1] ADAM, V.; PETRLOVA, J.; WANG, J.; ECKSCHLAGER, T.; TRNKOVA, L.; KIZEK, R. Zeptomole electrochemical detection of metallothioneins. PLoS ONE 2010, 5, 1-8.
[2] ADAM, V.; FABRIK, I.; ECKSCHLAGER, T.; STIBOROVA, M.; TRNKOVA, L.; KIZEK, R. Vertebrate metallothioneins as target molecules for analytical techniques. TrAC-Trends in Analytical Chemistry 2010, 29, 409-418.

Termín zadání: 7.2.2011

Termín odevzdání: 27.5.2011

Vedoucí práce: prof. Ing. Ivo Provazník, Ph.D.

prof. Ing. Ivo Provazník, Ph.D.
Předseda oborové rady

UPOZORNĚNÍ:

Autor bakalářské práce nesmí při vytváření bakalářské práce porušit autorská práva třetích osob, zejména nesmí zasahovat nedovoleným způsobem do cizích autorských práv osobnostních a musí si být plně vědom následků porušení ustanovení § 11 a následujících autorského zákona č. 121/2000 Sb., včetně možných trestněprávních důsledků vyplývajících z ustanovení části druhé, hlavy VI. díl 4 Trestního zákoníku č.40/2009 Sb.

Abstrakt

Metallothionein (MT) je protein s charakteristickým aminokyselinovým složením, který díky svým thiolovým skupinám dokáže vázat ionty kovů a zapojovat se tak do homeostázy těchto iontů v organismu. Protein má svůj význam i v procesu karcinogeneze, mohl by být vhodným markerem u některých typů nádorů. MT má v organismech mnoho specifických funkcí. Může být zkoumán několikaletými technikami. Běžně používanou metodou stanovení koncentrace MT je elektroanalýza. Konkrétněji se v této práci zaměřuji na diferenční pulzní voltametrii za využití Brdičkovy reakce.

Abstract

Metallothionein (MT) is a protein with a characteristic amino acid composition which thanks to its thiol groups can bind metal ions and be involved in the homeostasis of these ions in organism. The protein has its significance in carcinogenesis, could be a suitable marker for certain types of tumors. MT has many specific functions in organisms. It can be studied using several techniques. In common use electroanalysis is used as method for determining the concentration of MT. More specifically, this work is focused on differential pulse voltammetry using Brdička reaction.

Klíčová slova

Metallothionein, nádorová onemocnění, diferenční pulzní voltametrie, Brdičkova reakce, prenatriová vlna, pík H, adsorpční přenosová rozpouštěcí technika.

Key words

Metallothionein, tumor diseases, differential pulse voltammetry, Brdička reaction, prenatrium wave, peak H, adsorptive transfer stripping technique.

REICHLOVÁ, T., Diferenční pulzní voltametrie pro detekci metallothioneinu: bakalářská práce. Brno: FEKT VUT v Brně, 2011. 56 s.

Prohlášení

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci na téma Diferenční pulzní voltametrie pro detekci metallothioneinu jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího bakalářské práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou všechny citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce.

Jako autorka uvedené bakalářské práce dále prohlašuji, že v souvislosti s vytvořením této práce jsem neporušila autorská práva třetích osob, zejména jsem nezasáhla nedovoleným způsobem do cizích autorských práv osobnostních a jsem si plně vědom následků porušení ustanovení § 11 a následujících autorského zákona č. 121/2000 Sb., včetně možných trestněprávních důsledků vyplývajících z ustanovení § 152 trestního zákona č. 140/1961 Sb.

V Brně dne

.....

podpis autorky

Poděkování

Děkuji konzultantovi mé bakalářské práce Ing. Petru Majzlíkovi, Ph.D. za odbornou a velmi užitečnou metodickou pomoc při zpracování teoretické části mé bakalářské práce i za trpělivost a pomoc při měření v laboratořích.

Děkuji Ing. Davidu Hynkovi, Ph.D. za pomoc při zpracování výsledků do mé bakalářské práce.

Děkuji také vedoucímu mé bakalářské práce prof. Ing. Ivu Provazníkovi, Ph.D. za poskytnutí cenných rad k vypracování předložené bakalářské práce.

V Brně dne

.....

podpis autora (autorky)

Obsah

1. ÚVOD	8
2. STRUKTURA A FUNKCE METALOTHIONEINU	10
2.1. STRUKTURA METALOTHIONEINU	10
2.2. MT RODINY, PODČELEDI A PODSKUPINY	13
2.3. IZOFORMY METALOTHIONEINŮ MT-1 A MT-2 A JEJICH EXPRESE V LIDSKÉ TKÁNI	15
2.4. FUNKCE METALOTHIONEINU	17
2.4.1. EXPRESE METALOTHIONEINU	17
2.4.2. METALOTHIONEIN A METABOLISMUS ZINKU	18
2.4.3. METALOTHIONEIN A OXIDATIVNÍ STRES	19
2.4.4. METALOTHIONEIN A NÁDOROVÁ ONEMOCNĚNÍ	19
3. MOŽNOSTI STANOVENÍ METALOTHIONEINU	22
3.1. PŘÍPRAVA VZORKU	22
3.2. ELEKTROCHEMICKÁ STANOVENÍ MT	23
3.3. VOLTAMETRIE (POLAROGRAFIE)	23
3.3.1. SCHÉMA ZAPOJENÍ	23
3.3.2. PRACOVNÍ ELEKTRODY	24
3.4. PULZNÍ METODY	25
3.4.1. NORMÁLNÍ PULZNÍ VOLTAMETRIE (NPV)	27
3.4.2. DIFERENČNÍ PULZNÍ VOLTAMETRIE (DPV)	28
3.5. KATALYTICKÉ REAKCE PROTEINŮ NA RTUŤOVÉ ELEKTRODĚ	28
3.5.1. BRDIČKOVA REAKCE	28
3.5.2. PRENATRIOVÁ VLNA A PÍK H	29
4. ZÁKLADNÍ EXPERIMENT	31
4.1. PŘÍPRAVA VZORKU PRO DETEKCI MT	31
4.2. METODA MĚŘENÍ	31
4.3. VÝSLEDKY A JEJICH ZPRACOVÁNÍ	32
5. MĚŘENÍ A ZPRACOVÁNÍ VÝSLEDKŮ	34

5.1. POUŽITÉ MATERIÁLY	34
5.2. METODA MĚŘENÍ	34
5.3. VÝSLEDKY	35
5.3.1. KALIBRAČNÍ KŘIVKY	35
5.3.2. POZOROVÁNÍ VÝŠKY CAT 2 (MT) PÍKU V ZÁVISLOSTI NA ZMĚNĚ DOBY AKUMULACE	44
5.4. DISKUSE	49
6. ZÁVĚR	51
7. SEZNAM ZKRATEK A SYMBOLŮ	52
8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	54

1. Úvod

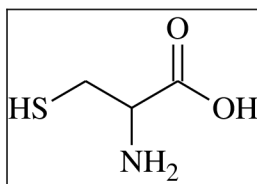
V dnešní moderní době je jistě jednou z nejdůležitějších, nejzajímavějších, ale i nejkomplicovanějších lidských činností výzkum v oblasti medicíny, správného fungování organismu a jeho ovlivňování různými negativními faktory. A to na všech úrovních od biologické, přes fyzikální, chemickou a snad až i po etickou. Bádání vědců na celém světě trvá již po tisíciletí a stále ještě není spousta informací objasněna. S velmi progresivním vývojem techniky je a bude pořád co zkoumat. Dokonaleji, přesněji, rychleji...

Ve své práci se snažím zpracovat poznatky o proteinu zvaném metalothionein. Z té praktické stránky se zabývám měřením - detekcí tohoto proteinu pomocí diferenční pulzní voltametrie a zpracováním výsledků.

Termín metalothionein (MT) byl původně používán pro pojmenování proteinu, objeveného v ledvinné kůře u koní. Objev je datován rokem 1957. Pánové Margoshes a Valee zjistili, že tento nízkomolekulární protein vykazoval vysokou afinitu k iontům kadmia. [2] Má charakteristické aminokyselinové složení, je bohatý na cysteiny, neobsahuje však žádné aromatické aminokyseliny. Významná je unikátní sekvence aminokyselin (charakteristická distribuce cysteinových zbytků jako je cys-x-cys). [1] Právě díky svým thiolovým skupinám dokáže MT vázat ionty kovů. (viz obr. 1.) Nejvíce pak měď a nejčastěji zinek, čímž se aktivně zapojuje do homeostázy těchto iontů v organismu. Při intoxikaci těžkými kovy jako jsou kadmium, olovo či rtuť, dokáže tyto kovy navázat a pro buňku tak zneškodnit. Následná detoxikace potom probíhá pravděpodobně v ledvinách. MT má také antioxidační vlastnosti. Dokáže tedy regulovat výskyt volných kyslíkových radikálů v organismu. Byla prokázána i jeho schopnost vytvářet redukční prostředí pomáhající chránit fosfolipidové membrány, proteinové části buňky a nukleové kyseliny před ionizujícími účinky vysokoenergetického záření a chemo-oxidativním stresem. Stále více je diskutována schopnost MT regulovat expresi DNA. Protein má svůj význam i v procesu karcinogeneze. Byly provedeny pokusy s geneticky modifikovanými myšmi. Zjistilo se, že jedinci bez genu pro MT jsou citlivější ke vzniku nádorového onemocnění. Existuje řada studií vyhodnocujících hladinu MT u pacientů. Je potřeba provádět dále výzkum koncentrace MT v souvislosti s lokalizací tumoru, stádiem onemocnění, věkem pacienta či stravovacími návyky, aby se lépe pochopilo, jak funguje nádorová buňka. Dosavadní výsledky přítomnosti MT v krevním séru u pacientů s nádorovými onemocněními dokazují, že by tento protein mohl být vhodným markerem u

některých typů nádorů. [3] Při zvýšené koncentraci MT může tento protein vyvázat Zn z tumor-supresorového proteinu p53. Z toho důvodu se výrazně zhoršuje schopnost navázat se na DNA a spustit signály pro apoptózu. [4]

Jak je patrné i z krátkého úvodu, metalothionein má v organismech mnoho specifických funkcí. Tento důležitý protein může být zkoumán několikaletými technikami. Z nich nejpoužívanější jsou metody elektrochemické.



Obrázek 1. Strukturní vzorec cysteinu s charakteristickou thiolovou –SH skupinou.

2. Struktura a funkce metalothioneinu

2.1. Struktura metalothioneinu

MT rozdělujeme do tří tříd podle toho, jakou mají primární strukturu a ze kterého organismu byly izolovány. Zástupci MT z jednotlivých tříd jsou ukázány v tabulce 1 a 2. [5]

Savčí metalothioneiny jsou jedno-řetězcové polypeptidy, s počtem aminokyselin pohybujícím se od 61 do 68 residuí. MT-I třída zahrnuje proteiny tvořené obvykle z 61 aminokyselin (obr.2.A). V molekulách MT-I nejsou přítomny aromatické aminokyseliny a v primární sekvenci se vyskytuje obvykle 20 cysteinů v těchto repeticích: Cys-X-Cys, Cys-Cys-X-Cys-Cys, Cys-X-Cys-Cys, kde X je označení pro jinou aminokyselinu než cystein (obr.2.B). Terciární struktura MT je rozdělena na dvě domény - α , β . Doména α (C-terminální) je stabilnější a obsahuje 4 vazebná místa, β (N-terminální) dokáže pojmout 3 ionty. Tyto domény jsou složeny z cysteinových klastrů a thiolových zbytků cysteinu odpovídajících za kovalentní vazbu s atomy kovů. Předpokládaná struktura vazebných domén molekuly MT je ilustrována na obr.2.C.

Třída MT-I je dále členěna na čtyři izoformy (iso-MT). Isoformy MT-1 a MT-2 jsou běžně přítomné ve většině orgánů, izoforma MT-3 byla izolována z neuronů a také gliových buněk, které stabilizují a troficky zásobují neuronové buňky. Isoforma MT-4 byla pozorována v dlaždicovém epitelu a je exprimována v keratinocytech. [2] Forma MT bez navázaného iontu kovu, apo-MT, se vyskytuje v buňkách, které trpí nedostatkem Zn. V nedávné době byl zjištěn výskyt této formy také v nádorových buňkách. Bylo pozorováno, že apo-MT může kvůli vysoké afinitě odebrat Zn ze zinkových prstů. [6]

MT-II třída zahrnuje metalothioneiny přítomné u některých prokaryot, kvasinek a nižších rostlin. Jde o peptidy podobné zástupcům z MT-I třídy. Rozdíl mezi peptidy MT-I a MT-II třídy je v počtu aminokyselin, vazebné domény jsou ale zachovány.

Peptidy přítomné v rostlinných buňkách jsou označovány jako fytochelatiny (rostlinné metalothioneiny). Radíme je do MT-III třídy. Fytochelatiny (PC) mají primární strukturu $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Gly}$. Glutamylcysteinová jednotka $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n$ se může opakovat 2 až 11krát (obr.3.A). PC obsahují podobně jako savčí MT-I a MT-II velké množství cysteinů a jsou schopny vytvářet s ionty kovů komplexy (obr.3.B). Na rozdíl od MT-I a MT-II, které jsou přímo geneticky předurčeny, jsou PC syntetizovány posttranslačně a to transpeptidizační reakcí glutathionu (GSH) katalyzovanou enzymem fytochelatin syntetázou ($\gamma\text{-Glu-Cys}$ dipeptidyl transpeptidázou). [2]

Tabulka 1. Přehled vybraných metalothioneinů z I a II třídy. [2]

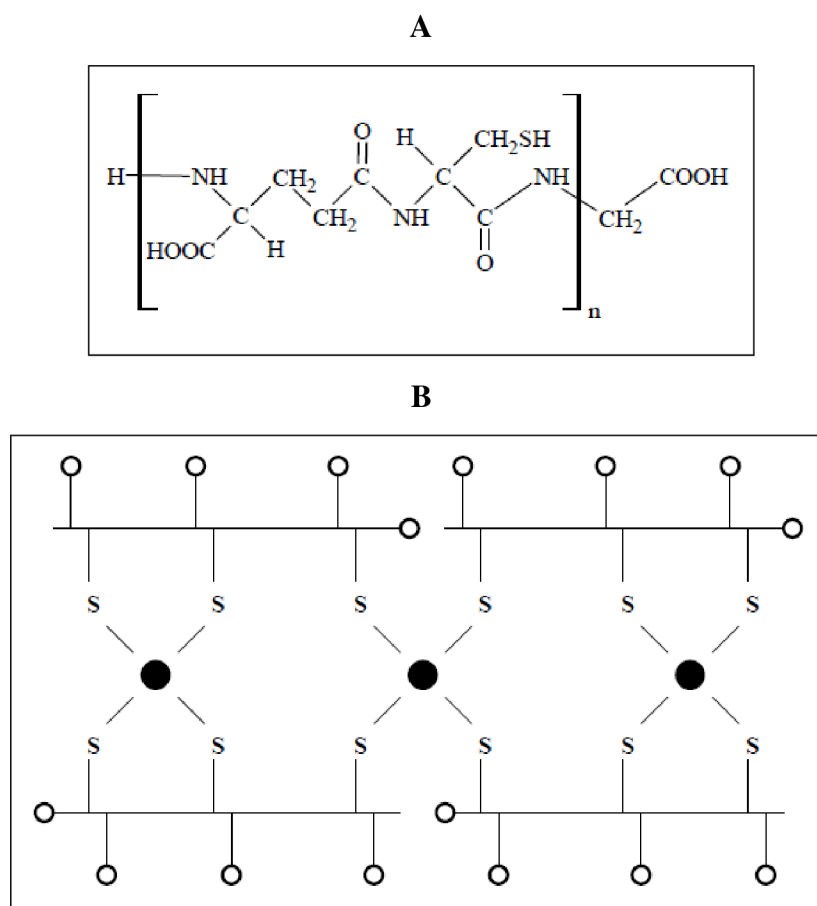
Organismus	Označení proteinu	Počet aminokyselin	Molekulová hmotnost (Da)	Počet cysteinů	pI ^a	GenBank ^b
<i>třída MT-I</i>						
<i>Homo sapiens</i>	<i>MT-1A</i>	61	6133	20	8,38	<i>K01383</i>
	<i>MT-2</i>	61	6042	20	8,23	<i>V00594</i>
	<i>MT-3</i>	68	6927	20	4,79	<i>M93311</i>
	<i>MT-4</i>	62	6419	20	8,38	<i>U07807</i>
<i>třída MT-II</i>						
<i>Candida glabrata</i>	<i>MT-I</i>	62	6243	18	7,53	<i>J05133</i>
	<i>MT-II</i>	51	5454	16	5,53	<i>J05134</i>
<i>Callinectes sapidus</i>	<i>MT-II</i>	58	6287	18	7,80	<i>P55949</i>

^a Teoretické hodnoty izoelektrických bodů (*pI*) byly převzaty z databáze Swiss-Prot (ExPASy Molecular Biology Server, zdroj: <http://www.expasy.ch>); ^b kód v bázi dat GenBank

Tabulka 2. Přehled známých rostlinných metalothioneinů. [2]

Organismus	Název	Vzorec
<i>Rauwolfia serpentina</i>	<i>fytochelatin</i>	$(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Gly}$
	<i>homofytochelatin(\beta-Ala)</i>	$(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-}\beta\text{-Ala}$
	<i>(hydroxymethyl)fytochelatin(Ser)</i>	$(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Ser}$
	<i>isofytochelatin(Glu)</i>	$(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Glu}$
	<i>desglycin-fytochelatin</i>	$(\gamma\text{-Glu-Cys})_n$

zobrazení vazebných domén jsou ionty kovů vyznačeny (●). Aminokyseliny jsou vyznačeny v mezinárodní symbolice; C: cystein, S: serin, K: lysin, G: glycin, A: alanin, T: threonin, N: asparagin, E: glutamová kyselina, M: methionin, P: prolin, D: asparagová kyselina, Q: glutamin, I: isoleucin a (C) schéma vazebných domén (α , β). (převzato a upraveno z [2])



Obrázek 3. (A) Strukturní vzorec molekuly fytochelatinu (γ -Glu-Cys) $_n$ -Gly ($n=2-11$). (B) Model struktury $Cd_3(PC_3)_4$ komplexu. Struktura se skládá ze čtyř molekul (γ -Glu-Cys) $_3$ -Gly, které prostřednictvím celkově dvanácti $-SH$ skupin vyvazují 3 atomy kovu (●); (○ vyznačují karboxylové skupiny). (převzato a upraveno z [2])

2.2. MT rodiny, podčeledi a podskupiny

Rozsáhlá analýza sekvencí dat stanovila jednoznačné modely evolučního vývoje metalothioneinů a umožnila tedy jejich přirozené seskupení do několika rodin.

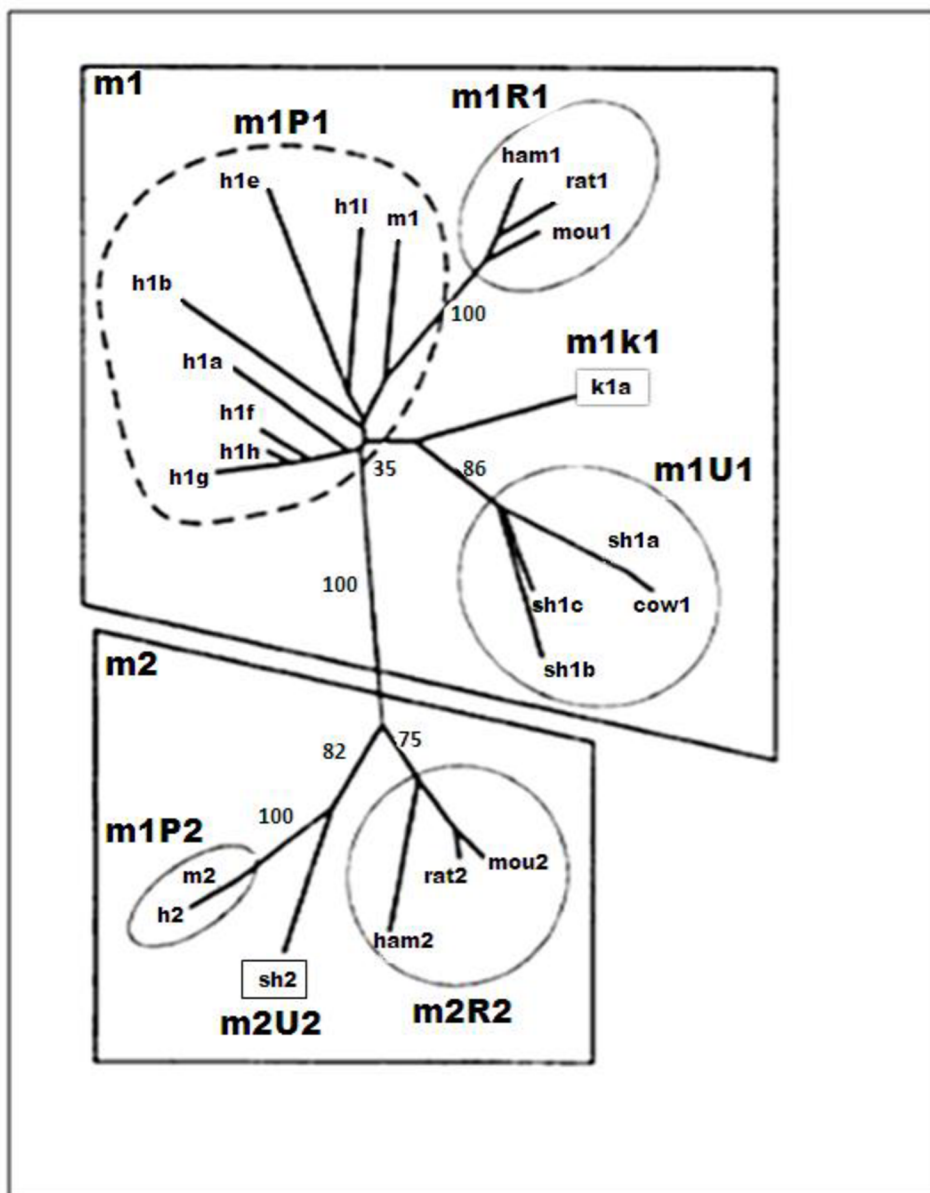
Tyto rodiny jsou známy následujícími vlastnostmi:

- unikátní sekvence vzorku

- taxonomický rozsah
- soubor společných sekvenčních charakteristik získaných z aminokyselinových a nukleotidových sekvencí
- vícenásobné zarovnání sekvencí (pro rodiny obsahující minimálně dva členy)
- fylogenetický strom (pro případy, kde je počet sekvencí více než čtyři)

Některé z MT-rodin mají další členění do několika fylogeneticky oddělených podčeledí s odlišnými strukturálními nebo genetickými vlastnostmi.

V některých zvláštních případech, založených na fylogenetické separaci, mohou být podčeledi dále rozděleny do podskupin. Vše je znázorněno na obr.4. [1]



Obrázek 4. *Fylogenetický strom metalothioneinu u obratlovců vypočtený z 5'UTR (netranslatovaná oblast na 5' konci) sekvencí. (převzato z [1])*

Nezakořeněné stromy slouží k ilustraci analýzy odlišných genových oblastí, která může poskytnout doplňkové informace o molekulární evoluci metalothioneinů. Dokumentují pododdělování do podčeledí a podskupin. Na obr.4 vidíme strom vypočítaný z 5'UTR, savčí m1 a m2 MT-geny jasně ukazují rozdělení do dvou paralogních podčeledí v savčí fylogenezi. Strom byl odvozen metodou Fitch-Margoliash (distanční metoda konstrukce dendrogramu, která počítá s nestejnou rychlostí mutací v jednotlivých větvích). Vysvětlení zkratk důležitých pro tuto práci je v tabulce 3. [1]

Tabulka 3. *Soubor MT rodin a podčeledí. [1]*

Rodina 1: vertebrate MT

m1: mammalian MT-1

m2: mammalian MT-2

m3: mammalian MT-3

m4: mammalian MT-4

m: n.d. mammalian MT

Zkratkou n.d. rozumíme podčeledi obsahující soubory sekvencí, pro které není z důvodů nedostatečných fylogenetických či strukturních informací možné přiřazení do již specifikovaných podčeledí.

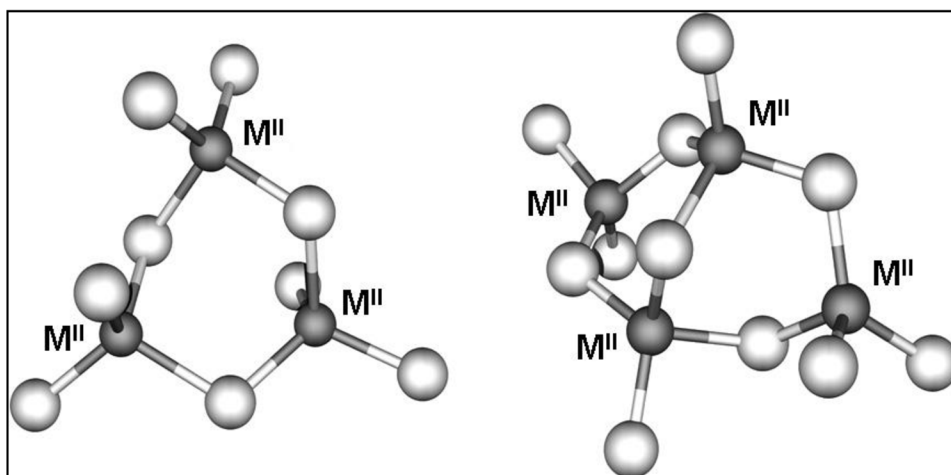
Označení sekvencí a jejich klasifikace je poskytována databází SWISS-PROT - dokumentem metallo.txt. [1]

2.3. Izoformy metalothioneinů MT-1 a MT-2 a jejich exprese v lidské tkáni

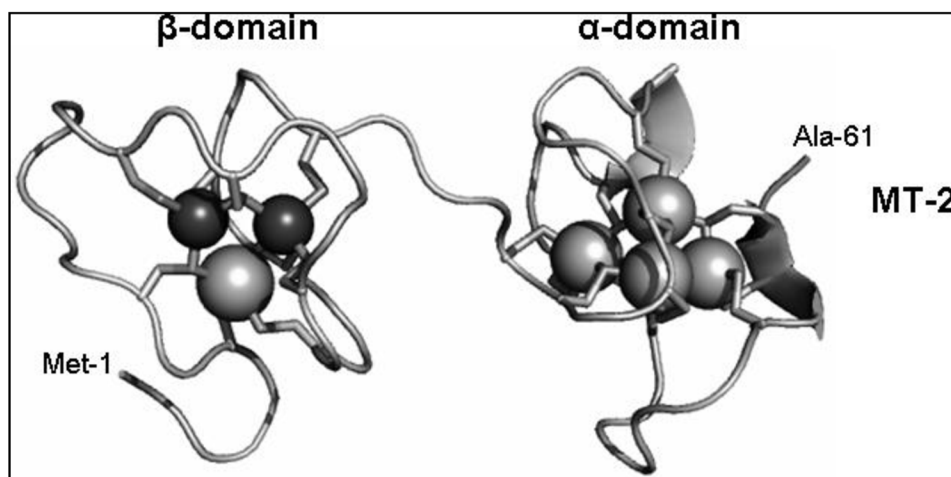
Lidské MT jsou kyselé proteiny s molekulovou hmotností 6-7-kDa a patří do I. třídy metalothioneinů a jsou kódovány rodinou genů vytvářejících 10 izoform. Vzniklé proteiny jsou rozděleny do čtyř skupin: MT-1, MT-2, MT-3 a MT-4. Je známo, že MT-2A gen kóduje pouze jeden MT-2 protein, zatímco MT-1 protein existuje ve více izoformách, respektive MT-1 protein vytváří více subtypů kódovaných sadou MT-1 genů (MT-1A, MT-1B, MT-1E, MT-1F, MT-1G, MT-1X). Rozdíly v MT genech pravděpodobně souvisí s jejich rozdílnou funkcí v odlišných podmínkách, ve kterých se organismy vyvíjely. Diferenční exprese izoform MT

u savců je přísně regulována během jejich vývoje i u vzniklých patologických stavů. V organismu dospělých jedinců jsou nejvíce zastoupeny dvě izoformy MT (MT-1a, MT-2a), které se exprimují ve většině lidských tkání, v mozkové tkáni je přítomna pouze izoforma MT-3 (někdy označována jako růstový inhibiční faktor - GIF). V dlaždicovém epitelu je hojně zastoupena izoforma MT-4. MT-1 a MT-2 izoformy jsou obvykle exprimovány v lidském organismu ve velmi malých koncentracích. Jejich exprese výrazně stoupá při indukci mnoha exogenními a endogenními faktory jako jsou UV záření, těžké kovy (Cd, Cu, Pt, Zn, Pb aj.), stresové hormony, volné kyslíkové radikály a cytokiny uvolňující se z poškozené tkáně či xenobiotika. Přestože jsou MT-1, MT-2 cytosolickými bílkovinami, byly také objeveny v jádře. MT lidských genů jsou lokalizovány na chromozomu 16q13 a jsou kódovány pomocí multigenních shluků těsně vázaných genů. Promotory regionů MT-1 a MT-2 genů obsahují několik metalo-responzivních elementů (MREs) a glukokortikoido-responzivních elementů (GRES), stejně jako prvky související s bazální úrovní transkripce. Expese MT je rovněž upravena oxidačním stresem podle antioxidant-responzivních elementů (ARES) nebo MREs, které rovněž reagují na oxidanty. Metalo-regulační transkripční faktor (MTF-1), který je nezbytný pro základní projevy a indukci zinku, se váže na promotor proximální MREs. MTF-1 se váže na MREs prostřednictvím svých šesti C₂H₂ zinkových prstů. [26]

Strukturální vlastnosti savčích metalothioneinů byly určovány téměř výhradně ze spektroskopické studie. První přímý důkaz o existenci kovo-thiolátových klastrů v MT pochází ze studií ¹¹³Cd pomocí nukleární magnetické rezonance (NMR), konkrétně studie rozpuštěného ¹¹³Cd₇MT-2. Velké množství znalostí o chemických vlastnostech MT-1, MT-2 souvisejících s jejich funkcí vzešlo z určení jejich tří-dimenzionálních (3D) struktur. 3D struktury MT-1, MT-2 různých druhů byly získány především NMR spektroskopií, ale také pomocí rentgenové krystalografie. 3D struktury na obr.5 a 6 odhalují podobné monomerní dvou-doménové bílkoviny ve tvaru činky představující klastrovou topologii (obr.5) a identické polypeptidové skládání (obr.6). Tyto dvě domény proteinů MT-1, MT-2 jsou spojeny pružným kloubem tvořeným oblastí zachovaných Lys-Lys sekvencí ve středu polypeptidového řetězce. [27]



Obrázek 5. Náčrt dvou kovo-thiolátových klastrů savčích Zn_2Cd_5MT-2 . Atomy kovů (M'') jsou zobrazeny jako zastíněné oblasti připojené k atomům síry. (převzato z [27])



Obrázek 6. Tří-dimenzionální krystalová struktura Zn_2Cd_5MT-2 potkana. Cd^{2+} a Zn^{2+} ionty jsou zobrazeny jako zastíněné oblasti připojené k proteinům pomocí cysteinových thiolátových ligandů. (převzato z [27])

2.4. Funkce metalothioneinu

2.4.1. Exprese metalothioneinu

Byla zkoumána schopnost metalothioneinu regulovat expresi. MT můžeme popsat jako zásobník zinku. Díky tomu dokáže přenášet esenciální kovy na transkripční faktory a tak je aktivovat. Aktivované transkripční faktory se váží na regulační sekvence DNA a spouští transkripci. Regulace exprese MT je také spjata s výskytem iontů kovů. Transkripce je řízena pomocí regulačního úseku DNA zvaného MRE (metal responsive element) a může být zahájena po navázání transkripčního faktoru na tuto sekvenci. Nejlépe zmapovanou cestou

exprese je přes MTF-1 (metal-regulatory transcription factor-1). Ten se v buňce nachází v inaktivovaném stavu s navázaným inhibítoru MTI. Po vstupu iontu kovu do buňky se tento ion naváže právě na inhibitor, čímž aktivuje MTF-1 a ten poté může po navázání na MRE zahájit transkripci MT.

Této expresní cesty se využívá při léčbě pacientů s otravou způsobenou těžkými kovy, kdy se pacientům podává zinek. Ten přes výše zmíněnou kaskádu zahájí transkripci genu pro MT, který kromě zinku, váže také toxické ionty těžkých kovů a pomáhá tak při detoxikaci organismu. [3]

2.4.2. Metalothionein a metabolismus zinku

Nejrozšířenějším kovem v lidském organismu hned po železe je zinek. Velké množství proteinů je zaměřeno na udržování homeostázy právě tohoto prvku. Dobrymi příklady je rodina transportních proteinů ZnT1-4, která se stará o příjem/výdej Zn^{2+} přes membrány buněk u savců. ZnT1 a ZnT4 jsou odpovědné za transport nadbytku zinku mimo buňku, naproti tomu ZnT2 a ZnT3 odpovídají za ukládání iontů tohoto kovu do organel v buňkách ledvin, střeva, varlat či neuronů. [7], [8]

O transportu zinku v intracelulárním prostoru toho však zatím tolik zjištěno nebylo. Zdá se, že právě metalothionein je hlavním proteinem rozhodujícím v tomto procesu. Zvýšená hladina MT byla zjištěna u proliferujících buněk, což může být způsobeno zvýšenou potřebou zinku. Podle výsledků pokusů s mRNA je role tohoto proteinu jak při ochraně buňky vůči velké koncentraci Zn^{2+} , ale tak i při odchytu těchto iontů pro potřebu celulárních aparátů tvorbou apo-MT. [6], [9]

K blokování vybraných genů nebo cílenému přenosu genů do dědičné informace organismu se využívá tzv. zinkových prstů. To jsou části bílkovinných molekul tvořené asi třemi desítkami aminokyselin. Propojením několika zinkových prstů lze určit jedinečné místo DNA, kam "sada prstů" zamíří. [10] Toto je zde zmíněno, protože MT může korigovat aktivitu zinkových prstů díky své afinitě k zinku. MT slouží nejen jako rezervoár zinku pro proteiny, které potřebují zinek ke svoji správné funkci, ale také jako zdroj tohoto kovu pro nově nesyntetizované apo-MT, či regulátor vlastní exprese (viz výše). Je taky možno vazbu MT-Zn narušit. A to pomocí oxidace thiolových skupin. Toho je schopna molekula oxidovaného glutathionu (GSSG), což je součást oxidačně redukčních mechanismů buňky. [11]

2.4.3. Metalothionein a oxidativní stres

Aby zůstaly zachovány funkce buněčných aparátů, musí být různé formy kyslíkových radikálů, které se tvoří například při intenzivní činnosti mitochondrií, buňkou zlikvidovány. Působením kyslíkatých radikálů dochází např. ke změnám na buněčné membráně. Od poruch funkčních (transportní děje, propustnost kanálů apod.) až po zánik organel a buněk. Pro tyto účely jsou syntetizovány látky - antioxidanty, které podléhají oxidaci namísto důležitých buněčných komponentů. Systém ochrany je tvořen specifickými enzymy. [12] Podobnou funkci tohoto typu zastávají i thioly, mezi něž patří MT a glutation. Jsou to neenzymatické látky, které dokážou vytvářet oxidačně redukční prostředí a za určitých podmínek jsou schopny se vzájemně oxidovat či redukovat. Metalothionein reguluje hladinu volných radikálů také nepřímo. To se děje navázáním iontů kovů, jež jsou potenciálními producenty těchto radikálů, například měď. [13] MT velmi efektivně likviduje hydroxylové radikály, které jsou pro buňku nebezpečné. Jako zdroj těchto radikálů můžeme uvést například rentgenové záření. U myši, jejichž tělo bylo ozařováno rentgenovými paprsky, byl zjištěn zvýšený výskyt mRNA metalothioneinu I. [14] Podobné pokusy, nyní s UV zářením, ukázaly také na zvýšení mRNA pro metalothionein I a II. [15]

2.4.4. METALOTHIONEIN A NÁDOROVÁ ONEMOCNĚNÍ

U proliferujících buněk byla pozorována vyšší hladina MT. Jeho koncentrace je závislá na stupni diferenciaci nádoru, stádiu onemocnění i jiných charakteristikách tumorových buněk. Tento fakt svědčí o důležitosti MT v procesu léčby nádorových onemocnění. Rozmnožující se buňky zřejmě potřebují zinek pro nově exprimované enzymy či pro regulační proteiny. [3], [16] Výhod pro nádorové buňky plynoucích ze zvýšené exprese MT je několik. Při zvýšené koncentraci apo-MT může tento protein vyvést Zn z tumor-supresorového proteinu p53. Tím se výrazně zhoršuje schopnost navázat se na DNA a spustit signály pro apoptózu. [4] Fakt, že MT chrání buňku proti potenciálním škodlivým látkám, může výrazně snížit efektivitu protinádorové léčby cytostatiky. [3]

Zatím není vztah MT k nádorovému bujení zcela jasný a v současnosti se touto problematikou zabývá mnoho vědeckých skupin. Z výsledků výzkumů vyplývá, že prognostická váha MT je problematická. Řada studií ukázala zvýšenou expresi MT v různých lidských tumorových buňkách, např. u nádorů jater, ledvin, močového měchýře, nosohltanu, plic, prostaty, prsu, slinných žláz, štítné žlázy, tlustého střeva, vaječníků a varlat. Avšak 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. U některých tumorů, jako je např. karcinom zárodečných buněk, exprese MT úzce souvisí se stupněm aktivity tumoru a proliferační aktivitou. Zvýšená hladina MT byla také pozorována u méně diferencovaných nádorů. Tedy pozorování množství MT opravdu může být považováno za prognostický marker pro některé tumory. Existuje jen velmi málo zpráv o vyjádření různých izoform MT, které byly analyzovány pomocí konkrétních genových sond. Odhalují, že některé izoformy jsou obsaženy ve specifických typech buněk.

Faktory, které mohou ovlivnit indukci MT v lidských nádorech, nebyly dosud pochopeny. Snižování syntézy MT v jaterních nádorech může souviset s hypermetylací u MT-promotorů nebo s mutací dalších genů jako je p53 tumor-supresorový gen. In vitro studie lidských nádorových buněk naznačují možnou roli p53 genu a estrogenových receptorů ve zvýraznění a indukci MT v epiteliálních nádorových buňkách. Vzhledem k tomu, že chemorezistence lidských nádorů je multifaktoriální jev, je obtížné dospět k závěru, že MT je klíčovým faktorem. Proto jsou další experimentální údaje o MT a jeho izoformách v lidských nádorech potřebné k objasnění biologických funkcí MT během progresu nádoru a to i spolu s dalšími nádorovými markery. [17]

Metalothionein, vzhledem ke své afinitě k široké škále kovových iontů, může prostřednictvím přímé interakce s anorganickými léky ovlivnit jejich účinnost. Mimo jiné, reaktivita MT-1 a MT-2 s protirakovinnými léky na bázi platiny, bismutovými léky a zlatoobsahujícími léky užívanými u revmatoidní artritidy přitahují obzvlášť velký zájem. Platinové léky jsou účinná chemoterapeutika pro léčbu testikulární rakoviny a jsou používány v kombinaci s terapií u celé řady dalších nádorů. Nicméně výskyt vnitřní rezistence u některých nádorů získané po zahájení léčby jsou hlavní nedostatky těchto chemoterapeutik. Vysoká reaktivita platinových sloučenin s hlavními intracelulárními thioley glutathionu (GSH) i MT prokazovala také rezistenci vůči těmto lékům. U protinádorové léčby cisplatinou je pozorováno zvýšené množství MT v tumorových buňkách. Předpokládá se, že přímé interakce těchto léků s MT by mohla být prvotní příčina odolnosti nádorových buněk. [27]

Jistě by se dalo mluvit i o spoustě dalších interakcí v organismu spojených s působením metalothioneinů. Například souvislost MT se záněty, kdy k jeho indukci dochází dramaticky při reakci na poškození tkáně. V této souvislosti by mohla být uvažována reakce na LPS injekci (lipopolysacharidu) zprostředkovaná cytokiny a uvolněním stresového hormonu. MT v játrech parenchymálních buněk se může zvýšit až 100krát za současné izolace zinku

z plazmy a tím zvýšení toku ze zinkových-donorových tkání. Závislost akumulace zinku v játrech na syntéze MT byla zkoumána již před dvěma desetiletími. Schopnost MT chovat se jako antioxidant může poskytnout výhodu pro přežití buněk v době infekce a zánětu.

Další zajímavá oblast je sledování funkce MT v organismu během těhotenství. Nebo také zkoumání funkcí v mozku spojených s MT působením. Zájem o akce řízené MT stoupl po objevení specifické izoformy MT-3 v mozku. [18]

Shrneme-li to, metalothionein je opravdu důležitý protein s redoxními a kovo-vazebnými vlastnostmi. A chceme-li poukázat na jednu jeho primární roli, není to možné, vzhledem k všudypřítomnosti MT. Je obsažen ve většině, ne-li ve všech eukaryotech a je aktivní ve většině tkání a orgánových systémech vyšších živočichů.

3. Možnosti stanovení metalothioneinu

Běžně používanou metodou stanovení koncentrace MT je elektroanalýza. Jde o metodu elektrochemickou, ke které se řadí především voltametrické a polarografické techniky. Umožňují stanovení i velmi nízkých koncentrací MT. Využívají se přednostně pro svoji časovou nenáročnost a snadnou přípravu vzorků na rozdíl od tradičně imunohistochemických technik nebo chromatografických metod separace. [2]

3.1. Příprava vzorku

Před samotnou elektroanalýzou MT je potřeba připravit si vzorek. Postupy jsou různé pro každý biologický materiál, kterým mohou být buňky, pletiva nebo tkáň. Uvažujeme-li buňky či jiný materiál, kterému předcházela kultivační proces s ionty kovů, je potřeba tyto vzorky promýt pufovaným roztokem. Takto odstraníme zbytky kultivačního média a vyvážíme kovy adsorbované na povrch buněk. Nejběžněji se používá fosfátový pufr ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 + \text{Na}_2\text{HPO}_4$) nebo Tris-HCl. Použitý pufr musí mít vlastnosti neutrálního prostředí a optimální iontovou sílu, aby nedošlo k předčasné lýze buněk vlivem osmotického šoku. Vzorky jsou ředěny puftrem v množství ekvivalentním hmotnosti tkáň (10krát). Aby nedošlo ke kontaminaci ionty kovů během homogenizace, musíme všechny předešlé postupy přesně dodržet. Buněčný vzorek může být homogenizován sonifikací pomocí ultrazvukových přístrojů, u celistvých tkání nebo pletiv je lepší použít mechanického rozrušování pomocí mixeru. Také se dá využít zmrazování vzorků v kapalném dusíku. Během homogenizace dojde k rozrušení buněčných stěn a membrán. Při stanovování MT je výhodné využít jeho vlastností jako je odolnost proti termokoagulaci a precipitaci v kyselém prostředí. Jako termostabilní protein totiž nepodlehne procesu vysrážení během denaturace v termobloku (99°C, 20 minut) jako většina jiných proteinů, ale zůstane v nezměněné podobě v získaném supernatantu. Následnou centrifugací (4°C, 16400rpm, 30min) docílíme oddělení buněčných kompartmentů od cytoplazmy. Odebraný supernatant může být poté analyzován.

MT se tak jako většina proteinů v organismu vyskytuje v redukovaném stavu. Musíme tedy zabránit oxidaci a degradaci vzorku použitím antioxidantů jako jsou β -merkaptoethanol, dithiothreitol (DTT) nebo tris(2-carboxyethyl)fosfin (TCEP). Také ochrana před mikrobiální infekcí je na místě, zvláště pokud vzorek skladujeme delší dobu. Používáme antibaktericidní 0,02% NaN_3 nebo inhibitory proteáz jako je např. fenylmethansulfonylfluorid. Ovšem v případě elektrochemických analýz se jejich použití nedoporučuje. Mohlo by dojít

k vzájemnému ovlivňování s MT a ke kompetici se studovanou látkou a povrchem elektrody. Redukční stav proteinu lze tedy zachovat deareací vzorku v atmosféře dusíku nebo argonu (nepublikované výsledky doc. Kizeka a spol.). [2]

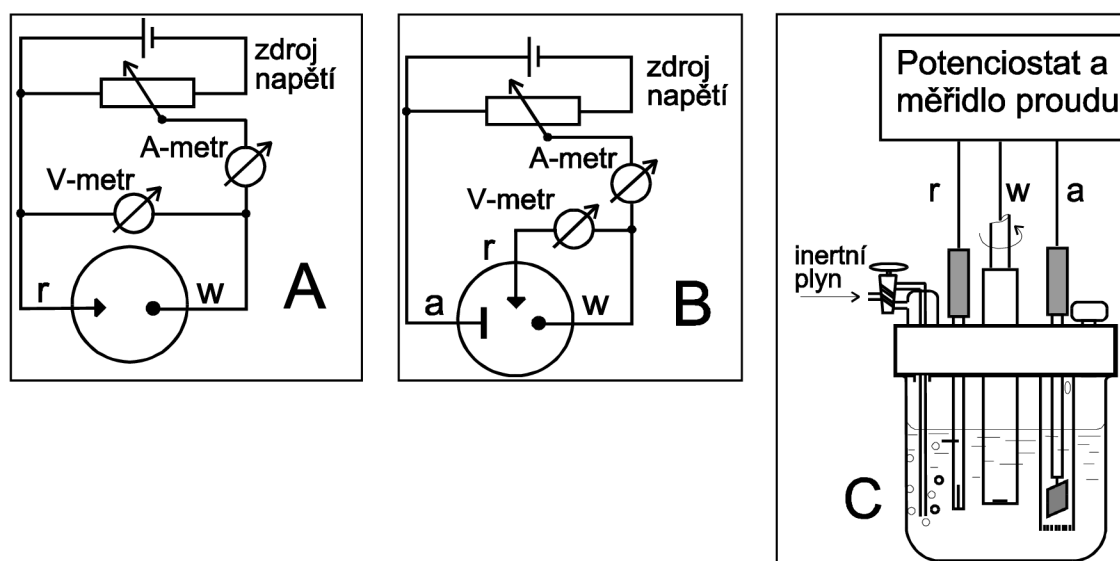
3.2. Elektrochemická stanovení MT

Uplatnění elektrochemie metalothioneinů spadá přednostně do oblasti studia vazby kovů s molekulami MT a vývoje citlivých potenciostatických a galvanostatických detektorů (biosenzorů). [2]

3.3. Voltametrie (polarografie)

Jde o elektroanalytickou metodu, při níž se studuje závislost elektrického proudu tekoucího pracovní elektrodou ponořenou v analyzovaném roztoku na jejím potenciálu, který se s časem mění. Zpravidla lineárně s časem roste či klesá. Není-li v roztoku u pracovní elektrody látka, která by se redukovala či oxidovala, je elektroda zpolarizována a protéká jí pouze kapacitní (nabíjecí) proud potřebný na změnu jejího potenciálu. Naopak v případě, kdy je v roztoku přítomna látka, která se při určitém potenciálu oxidoje nebo redukuje (tzv. depolarizátor), dojde k depolarizaci elektrody a teče jí elektrolytický (faradayický) proud. Velikost odpovídajícího anodického či katodického proudu určuje míru koncentrace tohoto depolarizátoru. Sledovanými depolarizátory jsou většinou stanovované látky, analyty. [19]

3.3.1. Schéma zapojení



Obrázek 7. Schéma zapojení elektrochemického článku. (převzato z [19])

A – dvouelektrodové zapojení;

B – tříelektrodové zapojení;

C – realizace voltametrické nádoby pro měření tříelektrodového zapojení; a - pomocná elektroda, r - referenční elektroda, w - pracovní elektroda.

Schéma aparatury pro voltametrická měření je na obr. 7.A, 7.B. Napětí ze zdroje vkládané na pracovní a referenční elektrodu je měřeno voltmetrem a proud tekoucí článkem je měřen ampérmetrem. Se změnou vloženého napětí se mění potenciál polarizovatelné pracovní elektrody. Potenciál nepolarizovatelné referenční elektrody je konstantní. V praxi se používá spíše tříelektrodového zapojení voltametrického článku. Proud teče mezi pomocnou a pracovní elektrodou a skutečný potenciál pracovní elektrody se měří mezi pracovní a referenční elektrodou za bezproudového stavu. Elektrochemické reakce, které probíhají při průchodu proudu na pomocné elektrodě, se nesledují. Bývá to oxidace vody nebo redukce vodíkového iontu. [19]

3.3.2. Pracovní elektrody

Pracovní elektrody ve voltametrii (polarografii) bývají rtuťové nebo z tuhých materiálů. Vlastnosti těchto elektrod se výrazně liší. Rtuť jako elektrodový materiál má dvě z hlediska elektrochemické analýzy velice významné přednosti oproti tuhým materiálům. Její povrch je homogenní a lze ho podle potřeby snadno obměňovat, takže každou analýzu je možno provádět vždy s novým reprodukovatelně obnoveným elektrodovým povrchem. Klasickou rtuťovou elektrodou je kapající elektroda (DME - dropping mercury electrode). Voltametrie s DME se z důvodů historických nazývá polarografií. Reprodukovatelné obnovování jejího povrchu vede k tomu, že proud tekoucí DME nezávisí na době elektrolýzy a polarizační křivka je stejná jak při vzrůstu, tak i poklesu potenciálu. [19]

Rtuťová kapková elektroda má poměrně široké možnosti analýzy potenciálů. Je možné na ni vkládat potenciál od -2,6V do +0,4V. Při hodnotě potenciálu větší než +0,4V dochází k rozpouštění rtuti, při hodnotách menších než -2,6V dochází k rozkladu vody. To platí v čisté vodě, jinak se dříve začne vylučovat kation z elektrolytu.

Výhodou DME je i to, že při analýze se vylučuje zanedbatelně malé množství látky nebo se vylučuje pouze v okolí kapky. Tím pádem se složení roztoku téměř nemění, pokud

neměříme v příliš malých objemech. Tedy výsledky měření jsou stejné, i když opakujeme analýzu několikrát na stejném vzorku. [20]

Ovšem DME má i své dvě hlavní nevýhody. Za prvé má neustále se měnící povrch, což komplikuje šíření difúze a vytváří plynulé proudové pozadí z nabíjené dvojité vrstvy. Za druhé jeho časové měřítko je řízeno životností kapky a nemůže být měněno pohodlně mimo rozsah 0,5-10s. Klasická rtuťová kapková elektroda (DME) je tedy dnes většinou nahrazena statickou rtuťovou kapkovou elektrodou (SMDE) s obnovovaným povrchem u polarografie nebo visící rtuťovou kapkovou elektrodou (HMDE) u voltametrie.

SMDE pracuje jako automatizované zařízení, ve kterém je průtok rtuti řízen ventilem. Hlavou o velikosti asi 10cm protéká rtuť skrz otvor kapiláry tehdy, když je ventil otevřen po reakci na elektrický signál. Kapka je vytlačena po méně než 100ms, pak je otvor uzavřen. Kapka zůstane na místě až do doby, než ji solenoidem řízené klepadlo uvolní a to po obdržení dalšího elektrického signálu. SMDE může sloužit v opakovaném režimu jako náhrada za DME. Většina současných polarografických prací je prováděna na SMDE. Stejně jako techniky voltametrické pracují s HMDE, která funguje na stejném principu. [22]

Dalším typem rtuťové elektrody je např. tzv. rtuťová filmová elektroda (MFE - mercury film electrode). [19]

Tuhými elektrodami jsou v podstatě všechny elektrody jiné než rtuťové. V průběhu elektrolýzy se na jejich povrchu často vytváří filmy látek adsorbovaných z roztoku či látek vznikajících elektrodovými reakcemi. Materiál elektrod (i platina i zlato) se může oxidovat či redukovat. Voltametrie s tuhými elektrodami je proto experimentálně náročnější než voltametrie či polarografie s elektrodami rtuťovými. Nejběžnějšími tuhými materiály jsou platina, zlato a různé formy uhlíku. [19]

3.4. Pulzní metody

Pulzní voltametrie (polarografie) patří mezi moderní elektroanalytické metody. V elektrochemii se jí často využívá i ke zjišťování reverzibility elektrodového děje a k charakterizaci produktů elektrodové reakce. [21] V literatuře je popsáno několik modifikací pulzní voltametrie, které se liší způsobem a tvarem potenciálových pulzů vkládaných na elektrodu. Pokud jsou pulzní metody používány ve spojení s DME, je vzhledem ke způsobu měření proudu doba kapky (řádově v sekundách) vždy externě řízena. [19]

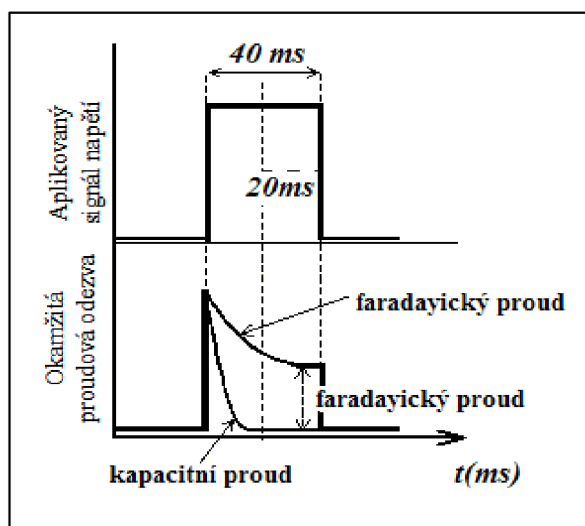
Proudová odezva při polarizaci elektrody (i aplikaci napěťového pulzu na elektrodu) je složena ze dvou složek:

- proudu kapacitního (nabíjecího),
- proudu faradayického (elektrolytického).

Proudu kapacitního je třeba k nabití elektrody na zvolený potenciál a tím k vytvoření elektrické dvojvrstvy na jejím povrchu. Tato dvojvrstva se skládá z vrstvy nábojů v kovovém povrchu kapky a z vrstvy iontů nabitých opačně, která je v bezprostřední blízkosti kapkové elektrody. Dostaneme tím vlastně kondenzátor. K nabití kapky na daný potenciál je tedy nutno dodat proud, který nabíjí tento kondenzátor. Protože tento proud nesouvisí s elektrolytickým dějem a souvisí s určitou kapacitou, říká se mu kapacitní. [20], [21]

Proud faradayický je výsledkem redukčního nebo oxidačního děje na elektrodě (přenos elektronů). Jeho velikost je dána velikostí náboje vyměňovaného mezi polarizovanou elektrodou a roztokem za jednotku času. Tento proud je oproti kapacitnímu proudu ještě závislý na počtu elektronů vyměňovaných v elektrodové reakci, na koncentraci depolarizátoru a na rychlosti jeho transportu z roztoku na povrch elektrody. [21]

Kapacitní proud je u elektrod s konstantním povrchem menší než u elektrod kapajících, jejíž obnovovaný povrch je třeba vždy znovu nabít na potenciál elektrody. Při stanovení stopových koncentrací depolarizátorů na rtuťové kapkové elektrodě (DME) bývá hodnota kapacitního proudu větší než hodnota proudu faradayického, a proto vznikla snaha kapacitní proud eliminovat. Jednu z možností eliminace kapacitního proudu nabízí pulzní metoda. Hlavní myšlenkou použití pulzní techniky je to, že kapacitní proud, který je odezvou pulzu, klesá exponenciálně s časem, zatímco pokles proudu faradayického je mnohem pomalejší. Pak proud může být měřen za určitou dobu po vložení pulzu, za kterou kapacitní proud poklesne téměř na nulu a faradayický proud má ještě dostatečnou velikost. Viz obr.8. [21]

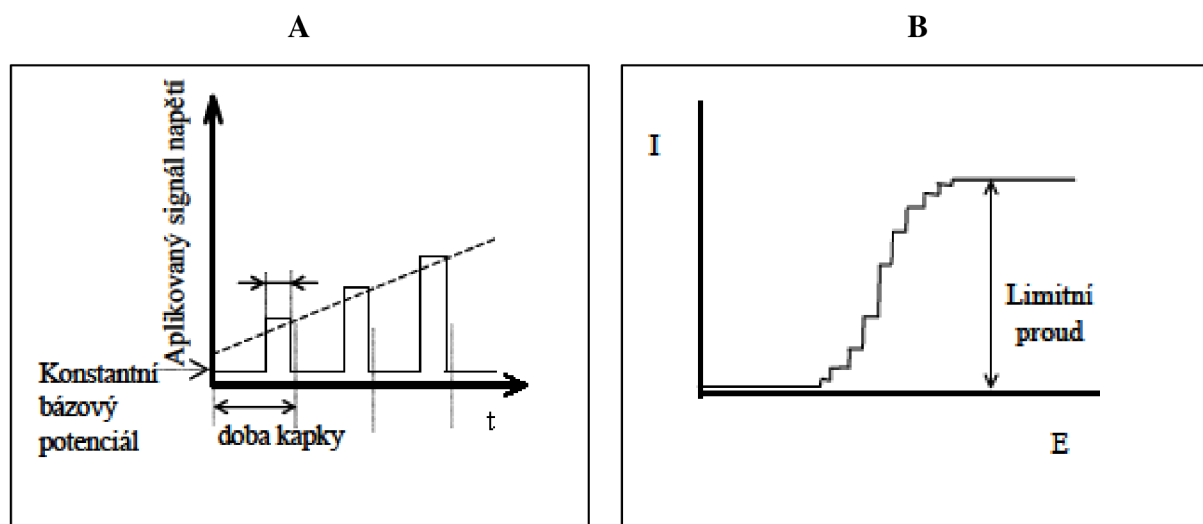


Obrázek 8. Schematické znázornění vloženého napětového signálu a odpovídající proudové odezvy (proud měřen v době posledních 20ms, tedy ke konci doby pulzu). (převzato z [21])

Rozdílná aplikace napětového pulzu a rozdílná registrace proudové odezvy rozdělila pulzní voltametrii na dva typy: (a) normální pulzní voltametrie, (b) diferenční pulzní voltametrie. [21]

3.4.1. Normální pulzní voltametrie (NPV)

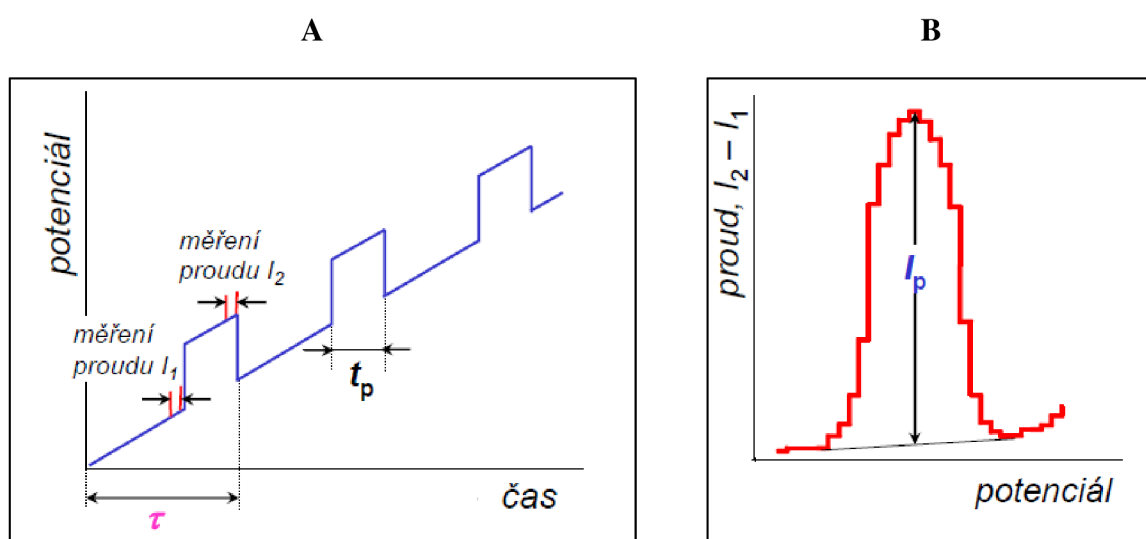
V normální pulzní voltametrii (NPV) jsou na elektrodu vkládány pulzy o šířce řádově desítek ms a o postupně rostoucí amplitudě. Proud se vzorkuje na konci vloženého pulzu po dobu řádově jednotek až desítek ms. Při použití DME je na každou kapku vložen jeden puls těsně před koncem její doby života (viz obr.9.A, 9.B). Tato metoda je vhodná pro práci s tuhými elektrodami, protože elektroda je po velkou část doby analýzy na počátečním potenciálu, který může být zvolen takový, aby při něm nedocházelo k adsorpci látek a tvorbě filmů, které práci s tuhými elektrodami komplikují. Přesto však jsou pulzní metody analyticky mnohem úspěšnější na rtuťových elektrodách než na elektrodách pevných. [19]



Obrázek 9. Charakter vkládaného potenciálu na elektrodu při NPV (A) a odpovídající polarizační křivka (B). I na svislé ose značí proud a E na ose vodorovné je potenciál. (převzato a upraveno z [21])

3.4.2. Diferenční pulzní voltametrie (DPV)

Z pulzních metod má pro elektroanalytickou chemii největší význam diferenční pulzní polarografie (DPP) a voltametrie (DPV). Při této metodě je potenciál lineárně s časem se měnící překládán napěťovým pulsem o amplitudě 10 až 100mV a době trvání řádově desítek ms. Napěťový pulz je aplikován ke konci doby života kapky, přičemž celková doba kapky je řízena elektronicky klepátkem. Regstruje se rozdíl proudů změřených těsně před vložním pulzu a na jeho konci. Závislost rozdílu proudů na potenciálu prochází maximem, má tvar píku. Poloha píku na potenciálové ose je dána kvalitou analytu, jeho výška závisí na koncentraci (viz obr.10.A, 10.B). [19]



Obrázek 10. Charakter vkládaného potenciálu (A) a registrovaná polarizační křivka při DPV (B). τ na obr.A značí dobu kapky, t_p je doba trvání pulzu. I_p na obr.B je limitní proud. (převzato a upraveno z [23])

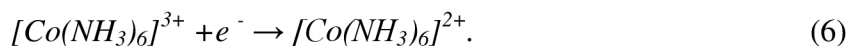
3.5. Katalytické reakce proteinů na rtuťové elektrodě

Ve třicátých letech minulého století bylo zjištěno, že proteiny poskytují na rtuťové elektrodě dva typy katalytických signálů, Brdičkovu reakci a prenatriovou vlnu. [2]

3.5.1. Brdičkova reakce

Metoda polarografického stanovení proteinů, které obsahují -SH skupiny, na rtuťové elektrodě byla poprvé popsána R. Brdičkou. Brdičkova reakce byla široce používána pro analýzu proteinů, ačkoli její mechanismus ještě nebyl zcela objasněn. [25] Postup byl původně navržen pro analýzu sírných látek, jako jsou organické thiosloučeniny,

aminokyseliny a proteiny. Jde o katalytické reakce proteinů v Brdičkově roztoku, který se skládá z amoniakálního pufru $\text{NH}_4\text{OH}+\text{NH}_4\text{Cl}$ a kobaltitého komplexu $[\text{Co}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$. Bylo zjištěno, že za katalytický signál proteinu v Brdičkově roztoku jsou odpovědné limitní proudy. Možnosti stanovení publikoval pan R. Olafson. Popisuje ireverzibilní redukci amonného komplexu Co^{3+} podle reakce



Redukční proces na povrchu rtuťové elektrody je katalyzován vylučováním vodíku. V případě samotné redukce komplexů kobaltu se předpokládá difuzí řízený proces. Reakční mechanismus je ovlivněn přítomností $-\text{SH}$ skupin proteinu. Při stanovení MT Brdičkovou reakcí se nejčastěji využívá metody DPP či DPV. Brdičkova reakce byla použita ke studiu fyziologických koncentrací MT u celé řady organismů. [2]

3.5.2. Prenatriová vlna a pík H

K prvním lidem zkoumajícím novou polarografickou metodu patřili pánové F. Herles a A. Vančura, kteří testovali různé tělní tekutiny. Zjistili, že všechny použité kapaliny - krevní sérum, transsudáty, výpotky, moč a žluč, po přidání do fyziologického roztoku (elektrolytu) způsobily na polarografické křivce zřetelné snížení vlny asi o 0,3V pozitivněji před vlnou sodných iontů. Proto ji nazvali „prenatriová vlna“. Popsané pokusy opakovali J. Heyrovský a J. Babička, kteří zjistili, že vlna je způsobena přítomností bílkovin. Přidáním amonných solí do roztoku bílkoviny nastává také vzestup proudu - před vylučováním amonného iontu. Závislost výšky proteinové vlny na koncentraci amonných iontů vedla autory k závěru, že jde o vlnu sodíku katalyzovanou bílkovinami. [24] Za katalytickou reakci jsou pravděpodobně odpovědné $-\text{SH}$ a $-\text{NH}_2$ skupiny proteinu.

Prenatriová vlna je tedy katodická odezva proteinů zaznamenaná na rtuťové elektrodě při negativních potenciálech předcházejících redukci sodných iontů základního elektrolytu. Této vlny bylo později využito pro stanovení vasopresinu a angiotensinu. Měřilo se metodou derivační chronopotenciometrie s konstantním proudem (CPSA). U galvanostatické metody CPSA se vychází z derivace napětí podle času $(dE/dt)^{-1}$. Elektrochemický záznam obsahuje závislost této derivace na polarizačním potenciálu. Chronopotenciometrický signál ekvivalentní polarografické prenatriové vlně byl pracovně označen jako „pík H“. Píku H může být použito ke stanovení MT v prostředí pufru. Bylo zjištěno, že výška i poloha píku H jsou závislé na pH základního elektrolytu, což má pravděpodobně souvislost s izoelektrickou pohyblivostí (pI) proteinu. Hodnoty pI se u různých MT liší a jsou zaznamenány v tabulce 1.

Metodou CPSA v kombinaci s adsorpční přenosovou rozpouštěcí technikou (Adsorptive Transfer Stripping Technique - AdTS) je možné detekovat až femtomolární množství MT ve velmi malých (5 μ l) objemech vzorku. Princip techniky AdTS spočívá v adsorbování studovaného analytu při otevřeném potenciálu na povrch elektrody (HMDE). Po adsorpci je elektroda vyjmuta z roztoku a omyta v deionizované vodě. Adsorbovaný analyt je následně analyzován v prostředí základního elektrolytu.

MT se podílí na katalytickém vylučování vodíku. Proces vylučování vodíku na rtuťové elektrodě je charakteristický a je popsán Heyrovského reakcí

(7)

Vzhledem ke složitosti katalytického procesu, který zasahuje do vylučování vodíku, je kromě katalyzujícího proteinu velmi důležitá jeho koncentrace, složení, pH a teplota základního elektrolytu. [2]

4. Základní experiment

Pro ověření metody diferenční pulzní voltametrie jsem provedla základní experiment. Analyzovanou látkou bylo krevní sérum pacienta s rakovinou. V tomto séru byl detekován metalothionein.

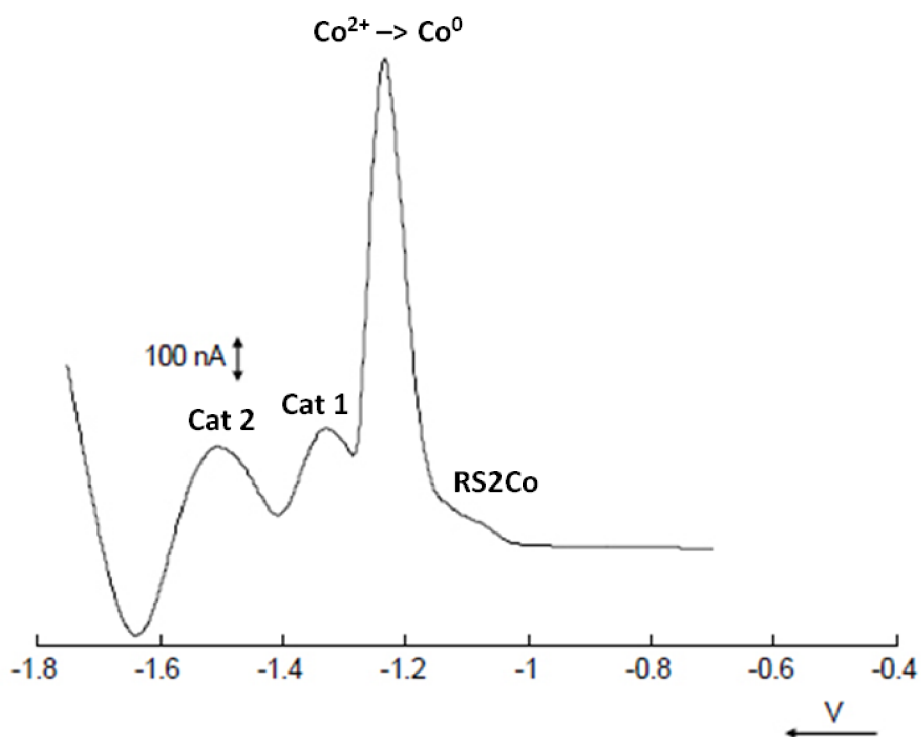
4.1. Příprava vzorku pro detekci MT

Ze získaných vzorků krevních sér bylo odebráno 10 μ l, smícháno s 990 μ l fosfátového pufru o pH 7 a umístěno na 20 minut při 99°C do termobloku (Eppendorf 5430, USA) pro denuraci termolabilních proteinů. Směs byla poté ochlazena na 4°C a metalothionein jako termostabilní protein byl následně oddělen centrifugací při 4°C, 16400rpm trvající po dobu 30 minut (Eppendorf 5402, USA). Takto připravené vzorky byly 100krát zředěny a analyzovány pomocí adsorptivní přenosové techniky (AdTS) s diferenční pulzní voltametrií (DPV). Množství analyzovaného vzorku bylo 5 μ l.

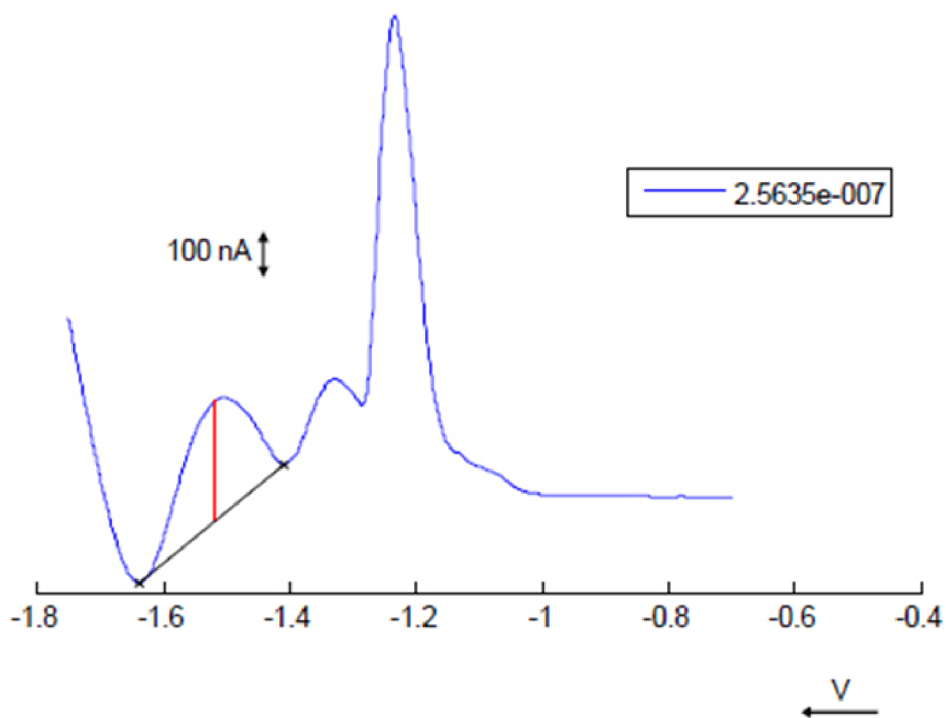
4.2. Metoda měření

Stanovení koncentrace metalothioneinu bylo provedeno pomocí adsorptivní přenosové techniky (AdTS) s diferenční pulzní voltametrií (DPV). K analýze bylo odebráno 5 μ l analyzovaného supernatantu, smícháno společně s 1995 μ l Brdičkova činidla v měrné nádobce a následně bylo provedeno samotné elektrochemické stanovení. Bylo použito klasické tříelektrodové zapojení. Pracovní elektrodou byla visící rtuťová kapková elektroda (HMDE) s plochou kapky 0,4mm², referenční elektrodou byla Ag/AgCl/3M KCl a pomocnou platinová elektroda. Základní elektrolyt (1mmol \cdot l⁻¹ [Co(NH₃)₆]Cl₃ a 1mol \cdot l⁻¹ amonný pufr; NH₃(aq) + NH₄Cl, pH 9,6) byl pro každý měřený vzorek vyměněn. Parametry DPV byly následující: počáteční potenciál -0,7V, konečný potenciál -1,75V, probublávání 5s, čas depozice 240s, modulační čas 0,05s, intervalový čas 0,25s, potenciálový krok 0,00105V, rychlost scanu 0,0042V/s, modulační amplituda 0,02505V. Měření bylo provedeno na měřícím zařízení skládajícím se z potenciostatu μ Autolab TypeIII a měřící jednotky 663 VA Stand (Metrohm CH). Elektrolyt byl mezi jednotlivými měřeními uchovávan v ledu. Jako řídicí program byl použit GPES 4.9, ve kterém byly zadány parametry měření i vyhodnoceny jednotlivé získané voltamogramy.

4.3. Výsledky a jejich zpracování



Obrázek 11. Voltamogram.



Obrázek 12. Voltamogram - výpočet výšky píku.

Výsledky hodnotíme z tzv. voltamogramů znázorňujících závislost proudu protékajícího soustavou na vloženém napětí (viz obr.11). Pozice píků charakterizují jednotlivé látky či sloučeniny v měřeném roztoku. Nejvyšší pík značí přítomnost kobaltu ($\text{Co}^{2+} \rightarrow \text{Co}^0$). Menší píky zleva i zprava od kobaltnatého píku svědčí o přítomnosti kobaltnatých komplexů vznikajících během voltametrického měření při použití Brdičkova roztoku (Cat 1, RS_2Co). Pík označený jako „Cat 2“ na pozici přibližně od -1,75V do -1,4V na ose x můžeme považovat za metalothionein přítomný v měřeném roztoku. Koncentraci MT zjistíme vypočtením výšky píku, což je naznačeno na obr.12. Tato výška odpovídá hodnotě 256,35nA. Výsledná koncentrace MT v krevním séru je potom vypočtena pomocí kalibrační křivky.

5. Měření a zpracování výsledků

Cílem mé práce bylo detekovat metalothionein metodou diferenční pulzní voltametrie a vyhodnotit výsledné voltamogramy. K měření jsem použila izoformy MT-1 a MT-2 pro vytvoření kalibračních křivek. Tyto křivky popisují závislost koncentrace MT na výšce Cat 2 (MT) píku. Z tabulek hodnot naměřených pro dané izoformy, ze kterých byly vytvořeny kalibrační křivky, jsem následně porovnála pozice a výšky píků Cat 2 (MT). Dále jsem zkoumala závislost doby akumulace analytu na rtuťovou kapku na výšce Cat 2 (MT) píku. Obojí měření jsem zopakovala i s izoformami apo-MT-1 a apo-MT-2. Následně jsem porovnála voltamogramy izoform MT a apo-MT.

5.1. Použité materiály

Použitými materiály byla izoforma MT-1 a MT-2 separovaná z králičích jater s obsahem 7% kadmia. Pro vytvoření kalibračních řad byla použita ACS voda. Apo-MT izoformy jsem získala smícháním MT izoform s kyselinou ethylendiamintetraoctovou (EDTA), díky které se vyvázalo kadmium z proteinu. Měření katalytických signálů poskytovaných proteiny probíhalo v Brdičkově roztoku - směsi amoniakálního pufru $\text{NH}_4\text{OH} + \text{NH}_4\text{Cl}$ a kobaltitého komplexu $[\text{Co}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$. Pro omývání elektrod mezi jednotlivými měřeními jsem potřebovala miliQ vodu.

Tabulka 4. Použité materiály

<i>Materiál</i>	<i>Výrobní číslo</i>	<i>Firma</i>
<i>MT-1</i>	<i>M5267-5MG, 014K7053</i>	<i>Sigma - Aldrich, s.r.o.</i>
<i>MT-2</i>	<i>M5392-5MG, 052K7002</i>	<i>Sigma - Aldrich, s.r.o.</i>
<i>ACS voda</i>	<i>Lot: S43109-287, Cat: 32007-2</i>	<i>Sigma - Aldrich, s.r.o.</i>
<i>miliQ voda</i>		<i>Millipore, s.r.o.</i>
<i>EDTA</i>	<i>Lot: 042K0087</i>	<i>Sigma - Aldrich, s.r.o.</i>
<i>Brdičkův roztok</i>		<i>vyrobeno vlastnoručně; chemikálie od Sigma - Aldrich, s.r.o.</i>

5.2. Metoda měření

Pro všechna měření byla použita metoda diferenční pulzní voltametrie. Podmínky měření pro vytvoření kalibračních křivek byly následující: počáteční potenciál -0,7V, konečný

potenciál -1,75V, probublávání 5s, čas depozice 240s, modulační čas 0,05s, intervalový čas 0,25s, potenciálový krok 0,00105V, rychlost scanu 0,0042V/s, modulační amplituda 0,02505V. Při sledování změny MT píku v závislosti na změně doby akumulace jsem měnila čas depozice postupně od 10s do 300s s krokem 30s, ostatní parametry zůstaly stejné. Měření bylo provedeno na měřícím zařízení skládajícím se z potenciostatu μ Autolab TypeIII a měřící jednotky 663 VA Stand (Metrohm CH). Jako řídicí program byl použit GPES 4.9, ve kterém byly zadány parametry měření i vyhodnoceny jednotlivé získané voltamogramy.

Pracovní elektrodou byla visící rtuťová kapková elektroda (HMDE) s plochou kapky $0,4\text{mm}^2$ (Metrohm 6.1246.020), referenční elektrodou byla Ag/AgCl/3M KCl a pomocnou platinová elektroda. Základní elektrolyt ($1\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ $[\text{Co}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$ a $1\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ amonný pufr; $\text{NH}_3(\text{aq}) + \text{NH}_4\text{Cl}$, pH 9,6) byl pro každý měřený vzorek vyměněn. Elektrolyt byl mezi jednotlivými měřeními uchovávan v ledu.

5.3. Výsledky

Výsledky byly zpracovávány pomocí programů GPES 4.9 a Excel.

5.3.1. Kalibrační křivky

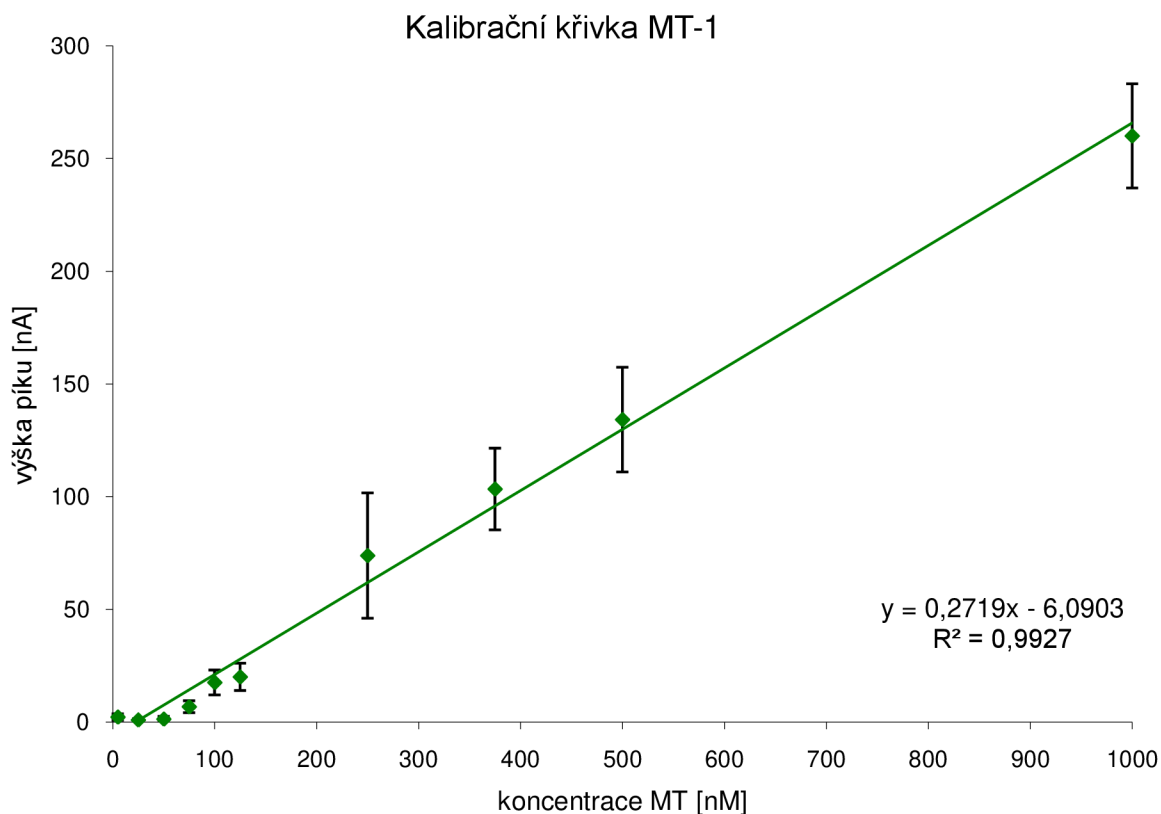
Vzorový voltamogram je na obr.11. Pro každou koncentraci z kalibrační řady (od 5 do 1000 nM), byl získán jeden voltamogram. Z křivky byla ručně pomocí funkcí v programu GPES 4.9 vypočtena výška Cat 2 (MT) píku, což je znázorněné na obr. 12. Hodnoty výšek Cat 2 (MT) píků a pozic Cat 2 (MT) píků u různých koncentrací byly zaznamenávány do tabulek. Postup byl stejný pro všechny izoformy = MT-1, MT-2, apo-MT-1 i apo-MT-2. Ze získaných dat byly vytvořeny grafy závislosti výšek píků na koncentraci - tedy kalibrační křivky. Pro každou izoformu bylo měření třikrát opakováno. Pro vytvoření grafu byly použity průměrné hodnoty výšek píků a také byla vypočtena jejich směrodatná odchylka od průměrné hodnoty.

Tabulka 5. Hodnoty naměřené u izoformy MT-1

koncentrace [nM]	1. měření		2. měření		3. měření	
	pozice píku [V]	výška píku [nA]	pozice píku [V]	výška píku [nA]	pozice píku [V]	výška píku [nA]
5	-1,446	0,300	-1,470	4,242	-1,474	2,081
25	-1,477	0,844	-1,476	1,662	-1,442	0,273
50	-1,552	3,180	-1,437	0,681	-1,503	0,059
75	-1,480	9,940	-1,474	7,781	-1,462	2,646
100	-1,483	19,800	-1,478	23,960	-1,484	8,863
125	-1,481	25,300	-1,483	24,660	-1,486	10,140
250	-1,477	119,000	-1,465	55,330	-1,482	47,200
375	-1,480	113,000	-1,477	122,800	-1,482	74,310
500	-1,479	171,000	-1,478	123,600	-1,476	107,900
1000	-1,479	288,000	-1,478	268,000	-1,474	224,100

Tabulka 6. Průměr a směrodatná odchylka výšek a pozic Cat 2 (MT) píku k tabulce 5

průměr výšky píku [nA]	sm. odch. výšky píku [nA]	průměr pozice píku [V]	sm. odch. pozice píku [V]
2,208	1,396	-1,463	0,012
0,926	0,494	-1,465	0,016
1,306	1,168	-1,497	0,047
6,789	2,649	-1,472	0,007
17,541	5,514	-1,482	0,003
20,033	6,063	-1,483	0,002
73,843	27,802	-1,475	0,007
103,370	18,130	-1,480	0,002
134,167	23,229	-1,478	0,001
260,033	23,113	-1,477	0,002



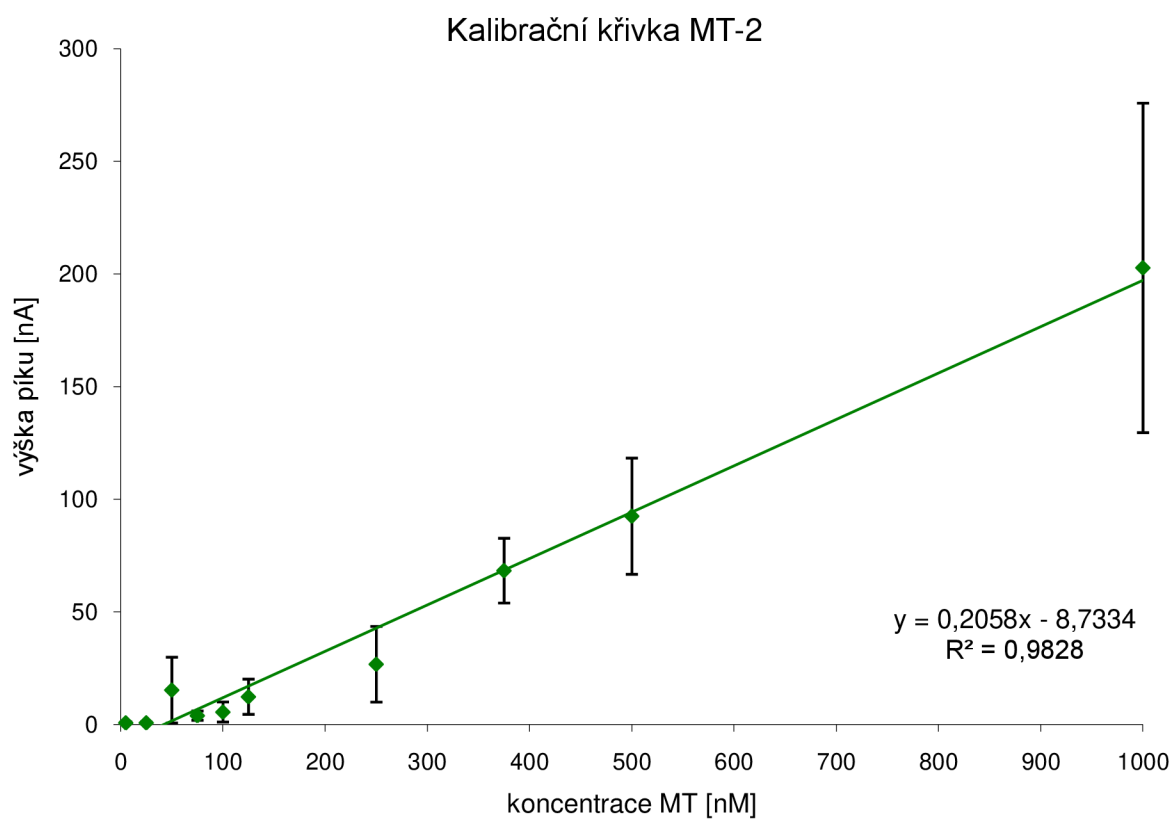
Obrázek 13. Kalibrační křivka izoformy MT-1.

Tabulka 7. Hodnoty naměřené u izoformy MT-2

koncentrace [nM]	1. měření		2. měření		3. měření	
	pozice píku [V]	výška píku [nA]	pozice píku [V]	výška píku [nA]	pozice píku [V]	výška píku [nA]
5	-1,562	1,44	-1,396	0,021	-1,453	0,574
25	-1,457	1,35	-1,419	0,217	-1,497	0,563
50	-1,473	3,75	-1,470	39,070	-1,461	2,803
75	-1,447	1,21	-1,480	6,989	-1,485	3,428
100	-1,437	4,03	-1,472	12,400	-1,401	0,024
125	-1,482	21,60	-1,472	15,120	-1,455	0,068
250	-1,478	45,70	-1,465	34,330	-1,448	0,038
375	-1,470	72,20	-1,478	86,290	-1,458	46,230
500	-1,479	71,30	-1,462	71,450	-1,480	134,500
1000	-1,477	84,40	-1,481	247,100	-1,481	276,400

Tabulka 8. Průměr a směrodatná odchylka výšek a pozic Cat2 (MT) píku k tabulce 7

průměr výšky píku [nA]	sm. odch. výšky píku [nA]	průměr pozice píku [V]	sm. odch. pozice píku [V]
0,678	0,506	-1,470	0,069
0,710	0,411	-1,458	0,032
15,208	14,616	-1,468	0,005
3,876	2,061	-1,471	0,017
5,485	4,465	-1,437	0,029
12,263	7,811	-1,470	0,011
26,689	16,808	-1,464	0,012
68,240	14,369	-1,469	0,008
92,417	25,771	-1,474	0,008
202,633	73,140	-1,480	0,002



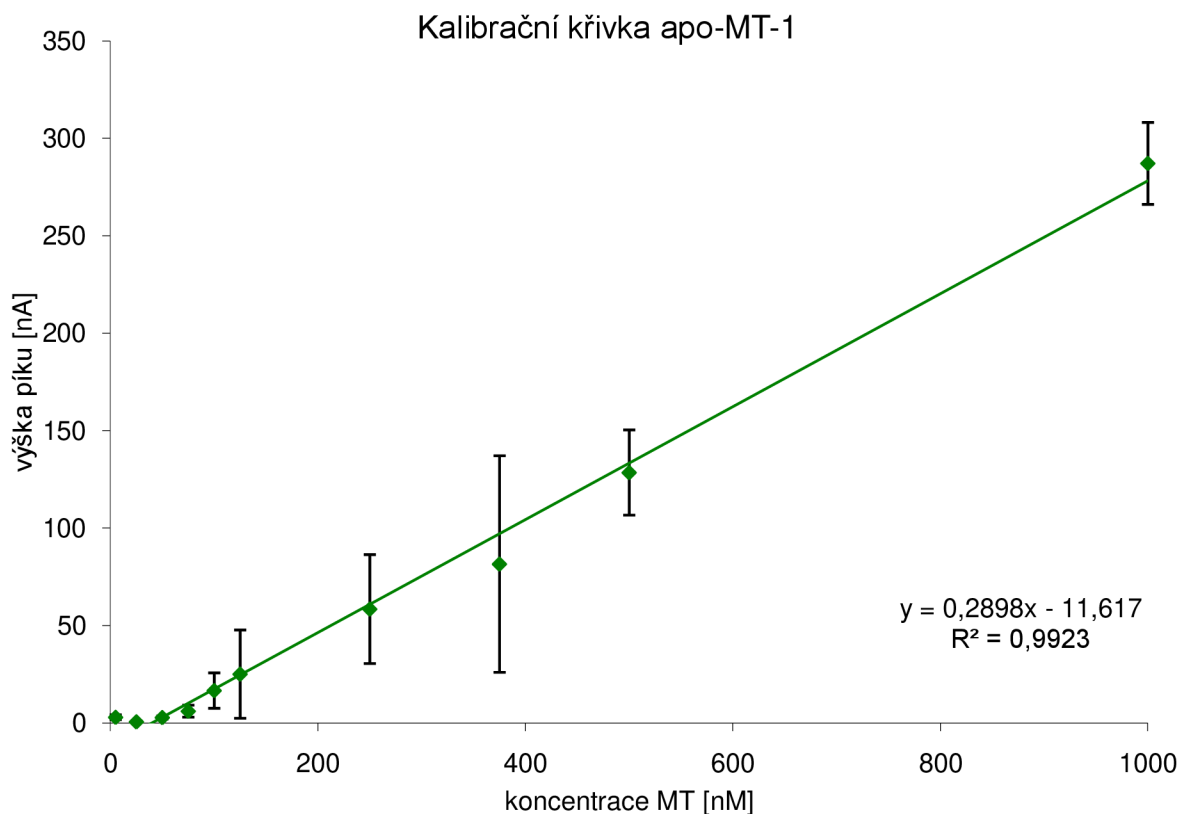
Obrázek 14. Kalibrační křivka izoformy MT-2.

Tabulka 9. Hodnoty naměřené u izoformy apo-MT-1

koncentrace [nM]	1. měření		2. měření		3. měření	
	pozice píku [V]	výška píku [nA]	pozice píku [V]	výška píku [nA]	pozice píku [V]	výška píku [nA]
5	-1,486	1,018	-1,493	3,411	-1,504	4,410
25	-1,465	0,873	-1,447	0,120	-1,449	0,854
50	-1,486	4,055	-1,496	2,439	-1,472	1,958
75	-1,483	10,790	-1,493	5,240	-1,496	2,168
100	-1,495	27,620	-1,480	2,539	-1,493	19,780
125	-1,484	61,430	-1,478	12,760	-1,511	1,030
250	-1,489	104,100	-1,494	36,600	-1,490	34,710
375	-1,497	172,100	-1,490	30,960	-1,488	41,600
500	-1,505	158,600	-1,492	96,800	-1,484	130,100
1000	-1,495	311,300	-1,520	296,200	-1,504	253,900

Tabulka 10. Průměr a směrodatná odchylka výšek a pozic Cat 2 (MT) píku k tabulce 9

průměr výšky píku [nA]	sm. odch. výšky píku [nA]	průměr pozice píku [V]	sm. odch. pozice píku [V]
2,946	1,233	-1,494	0,007
0,616	0,304	-1,454	0,008
2,817	0,777	-1,485	0,010
6,066	3,090	-1,491	0,006
16,646	9,073	-1,489	0,007
25,073	22,647	-1,491	0,014
58,470	27,951	-1,491	0,002
81,553	55,576	-1,492	0,004
128,500	21,872	-1,494	0,009
287,133	21,040	-1,506	0,010



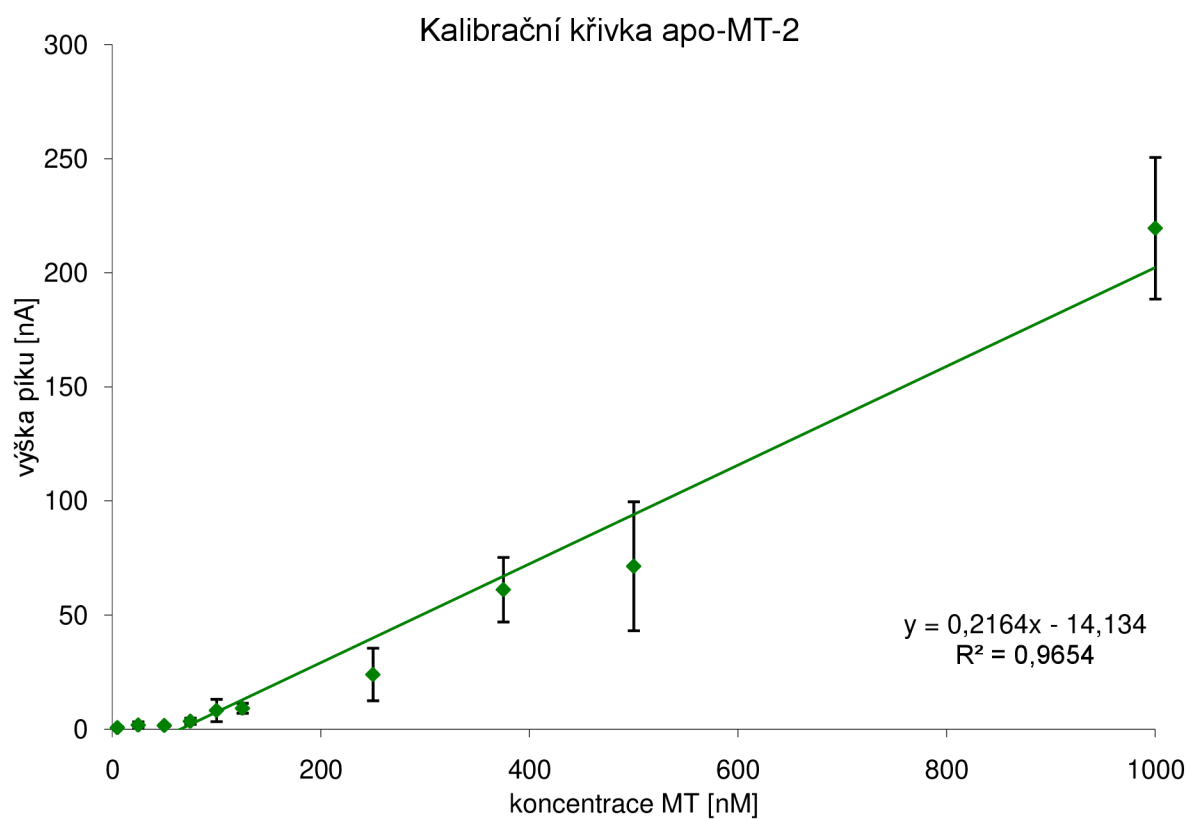
Obrázek 15. Kalibrační křivka izoformy apo-MT-1.

Tabulka 11. Hodnoty naměřené u izoformy apo-MT-2

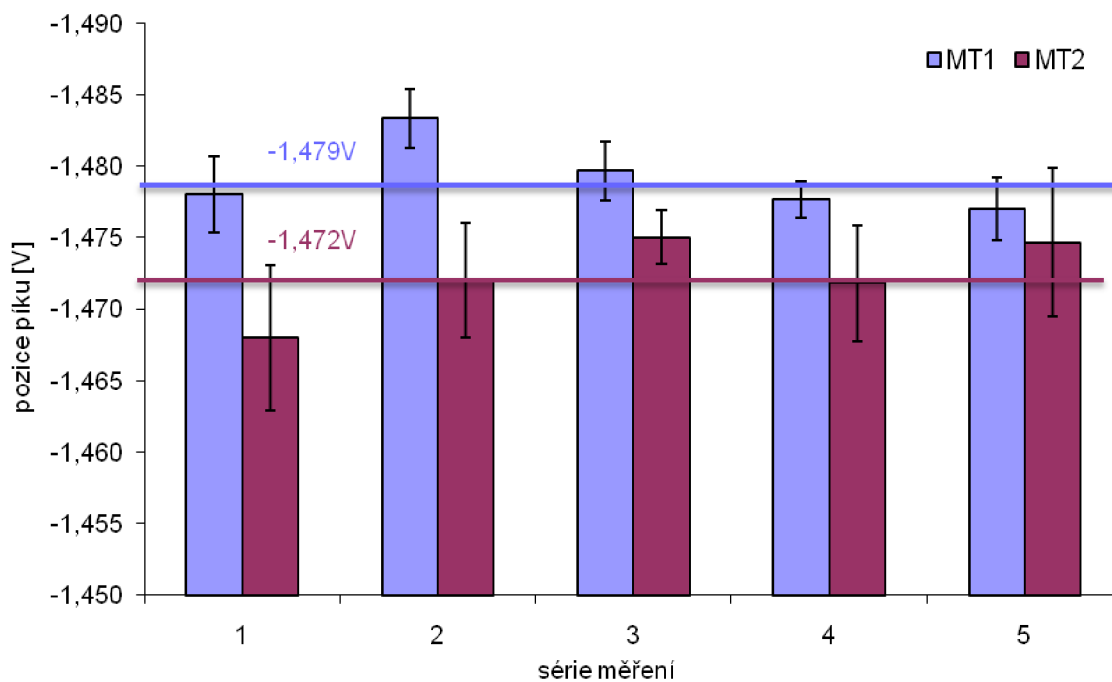
koncentrace [nM]	1. měření		2. měření		3. měření	
	pozice píku [V]	výška píku [nA]	pozice píku [V]	výška píku [nA]	pozice píku [V]	výška píku [nA]
5	-1,497	0,009	-1,479	0,433	-1,465	1,400
25	-1,484	0,915	-1,505	0,317	-1,481	4,060
50	-1,469	1,044	-1,452	1,413	-1,488	2,310
75	-1,488	4,925	-1,478	4,177	-1,474	1,260
100	-1,500	14,740	-1,496	8,868	-1,440	0,921
125	-1,487	11,920	-1,489	9,591	-1,443	5,850
250	-1,500	36,240	-1,489	30,120	-1,461	5,460
375	-1,478	53,700	-1,497	83,770	-1,479	45,800
500	-1,492	82,000	-1,489	104,900	-1,460	27,200
1000	-1,515	261,600	-1,503	222,900	-1,490	174,000

Tabulka 12. Průměr a směrodatná odchylka výšek a pozic Cat 2 (MT) píku k tabulce 11

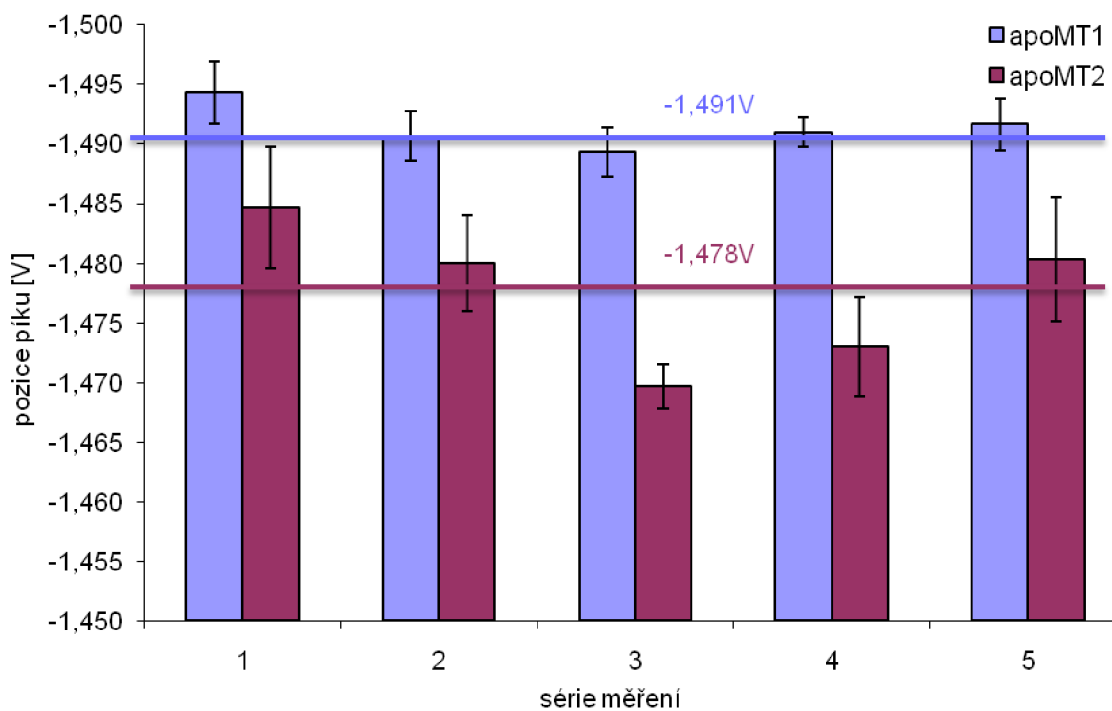
průměr výšky píku [nA]	sm. odch. výšky píku [nA]	průměr pozice píku [V]	sm. odch. pozice píku [V]
0,614	0,504	-1,480	0,013
1,764	1,422	-1,490	0,011
1,589	0,460	-1,470	0,015
3,454	1,369	-1,480	0,006
8,176	4,904	-1,479	0,027
9,120	2,165	-1,473	0,021
23,940	11,522	-1,483	0,016
61,090	14,167	-1,485	0,009
71,367	28,232	-1,480	0,014
219,500	31,041	-1,503	0,010



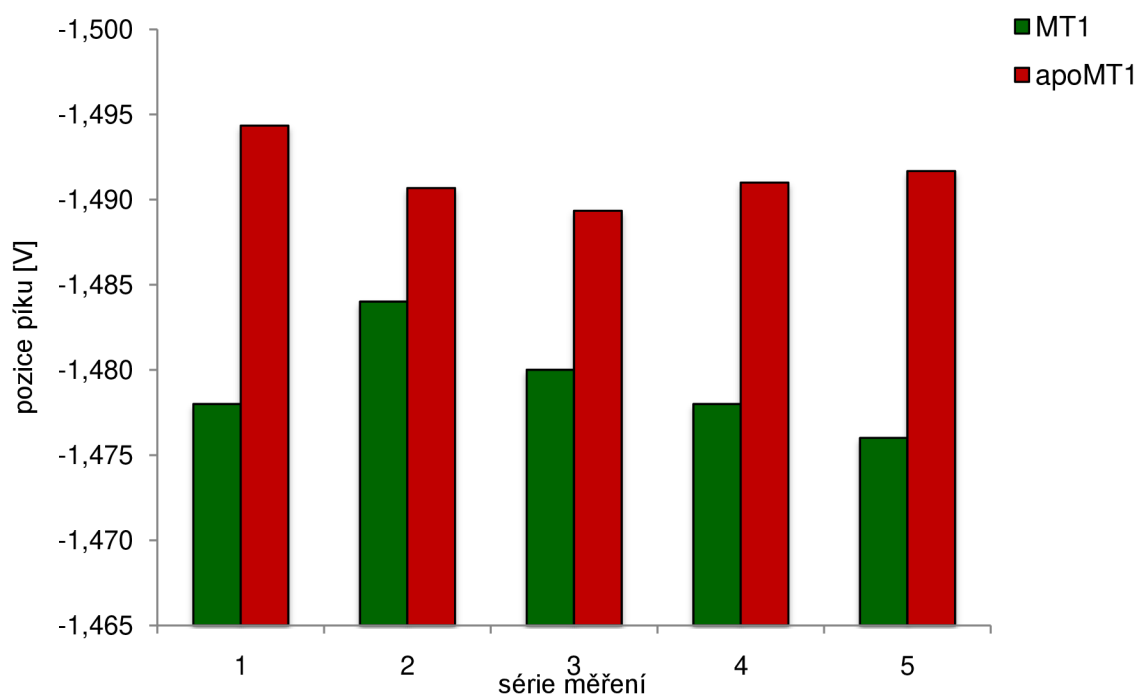
Obrázek 16. Kalibrační křivka izoformy apo-MT-2.



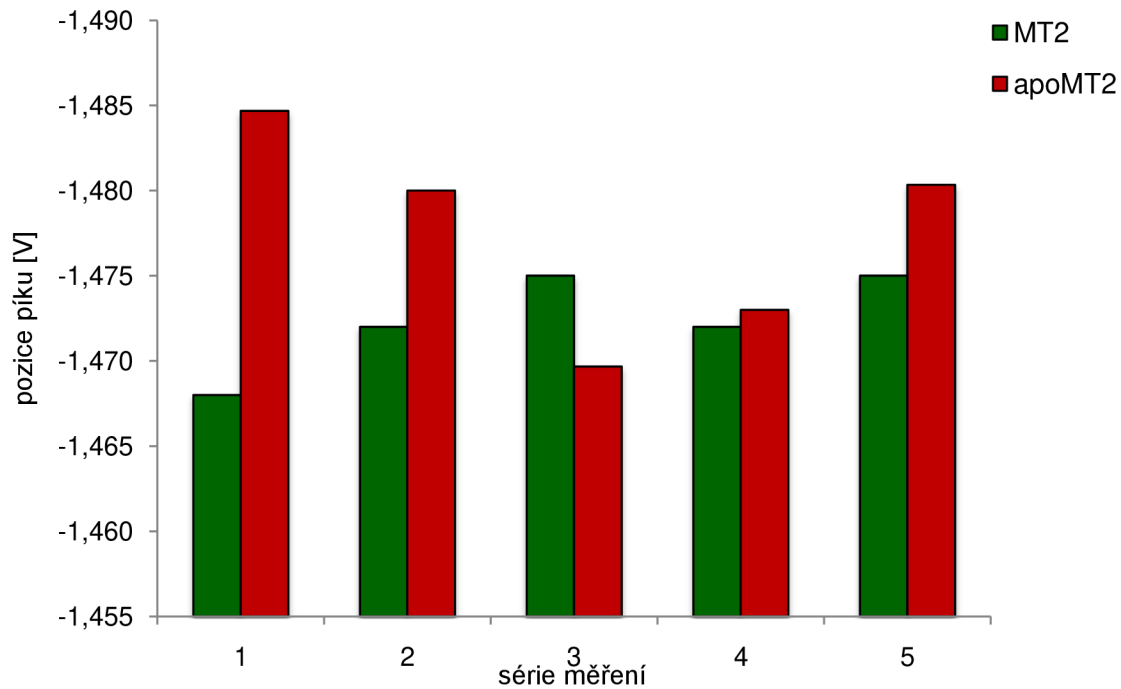
Obrázek 17. Graf rozdílů pozic Cat 2 (MT) piků u izoforem MT-1 a MT-2.



Obrázek 18. Graf rozdílů pozic Cat 2 (MT) piků u izoforem apo-MT-1 a apo-MT-2.



Obrázek 19. Srovnání pozic Cat 2 (MT) píků u MT-1 a apo-MT-1 izoformem.



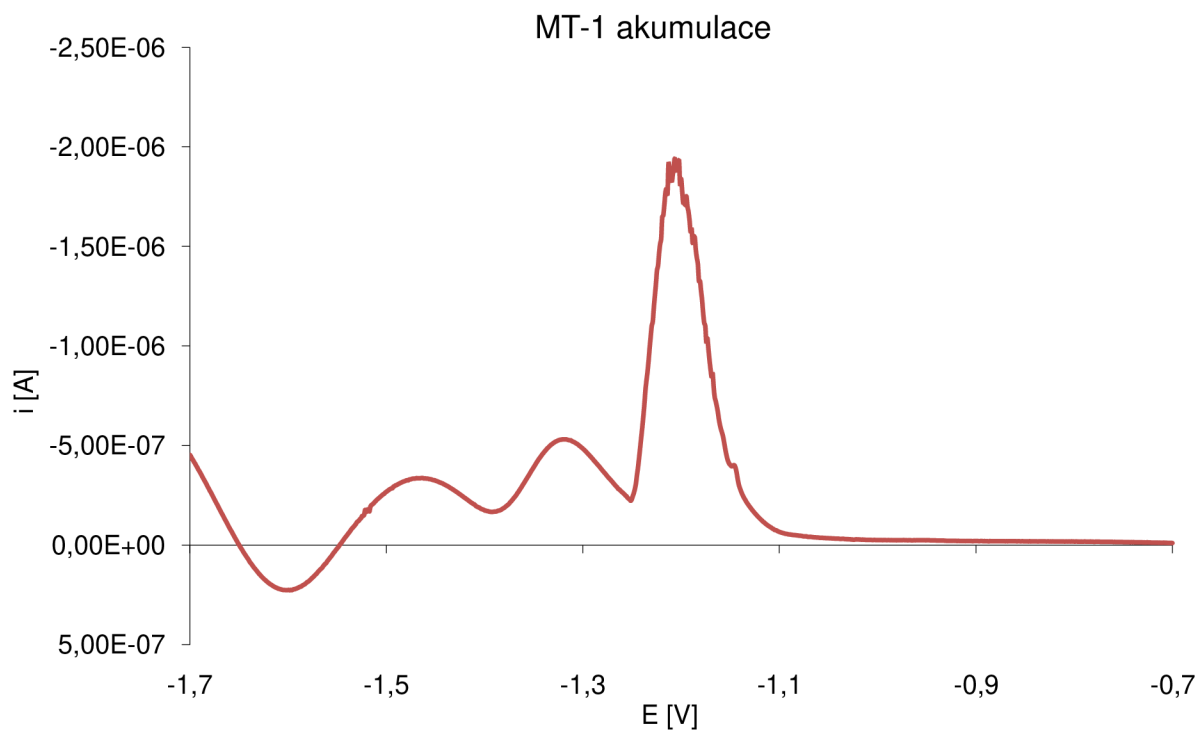
Obrázek 20. Srovnání pozic Cat 2 (MT) píků u MT-2 a apo-MT-2 izoformem.

5.3.2. Pozorování výšky Cat 2 (MT) píku v závislosti na změně doby akumulace

Toto měření bylo provedeno pro optimalizaci metody - pro stanovení nejvhodnější doby akumulace analytu na rtuťovou kapku. Dále bylo zkoumáno, jak se mění výška kobaltnatého píku a MT píku se zvyšující se dobou akumulace.

Tabulka 13. Hodnoty naměřené při různé době akumulace u izoformy MT-1

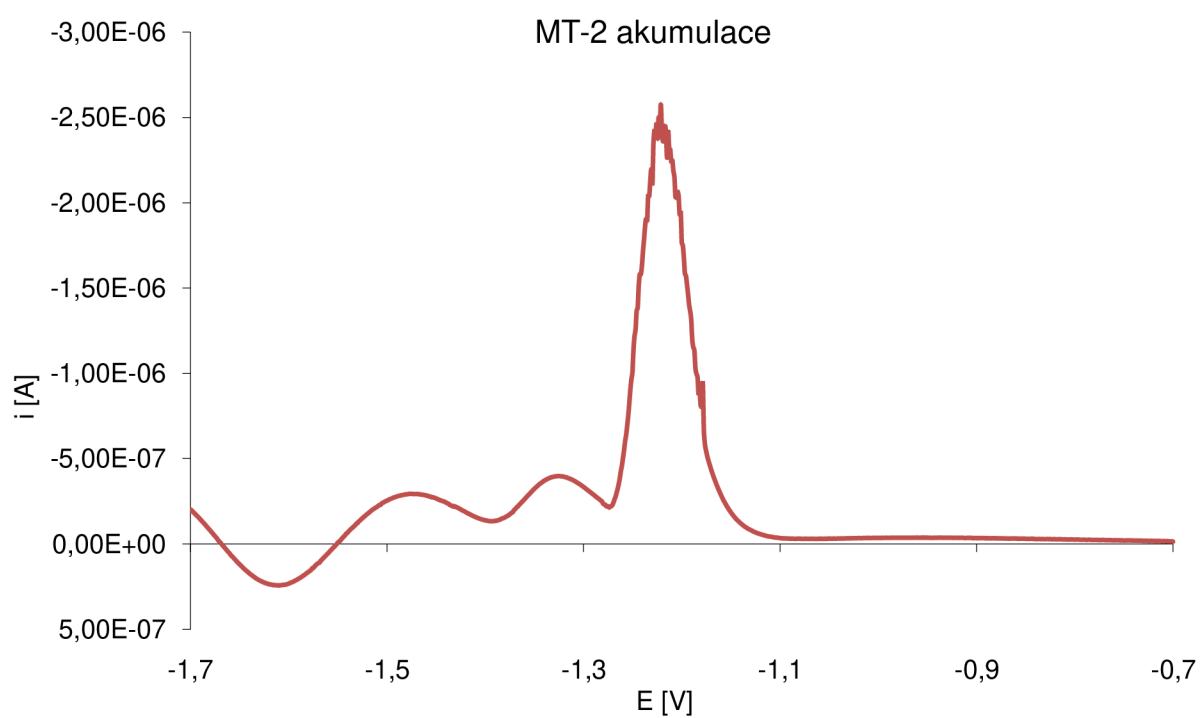
doba akumulace [s]	pík $\text{Co}^{2+} - \text{Co}^0$		pík Cat 1		pík Cat 2 (MT)	
	pozice píku [V]	výška píku [nA]	pozice píku [V]	výška píku [nA]	pozice píku [V]	výška píku [nA]
10	-1,196	1800	-1,316	333,6	-1,479	293,9
30	-1,207	1711	-1,321	330,8	-1,482	321,3
60	-1,206	1562	-1,320	314,1	-1,482	308,6
90	-1,213	1394	-1,329	281,7	-1,486	303,7
120	-1,218	1721	-1,331	241,9	-1,488	261,6
150	-1,215	1690	-1,324	246,5	-1,482	332,8
180	-1,214	1588	-1,328	301,7	-1,485	311,4
210	-1,207	1589	-1,329	308,3	-1,487	354,0
240	-1,208	1468	-1,327	295,3	-1,487	314,1
270	-1,213	1720	-1,323	237,3	-1,486	210,2
300	-1,203	1191	-1,332	334,8	-1,490	322,9



Obrázek 21. Vzorový voltamogram izoformy MT-1 při době akumulace 30s.

Tabulka 14. Hodnoty naměřené při různé době akumulace u izoformy MT-2

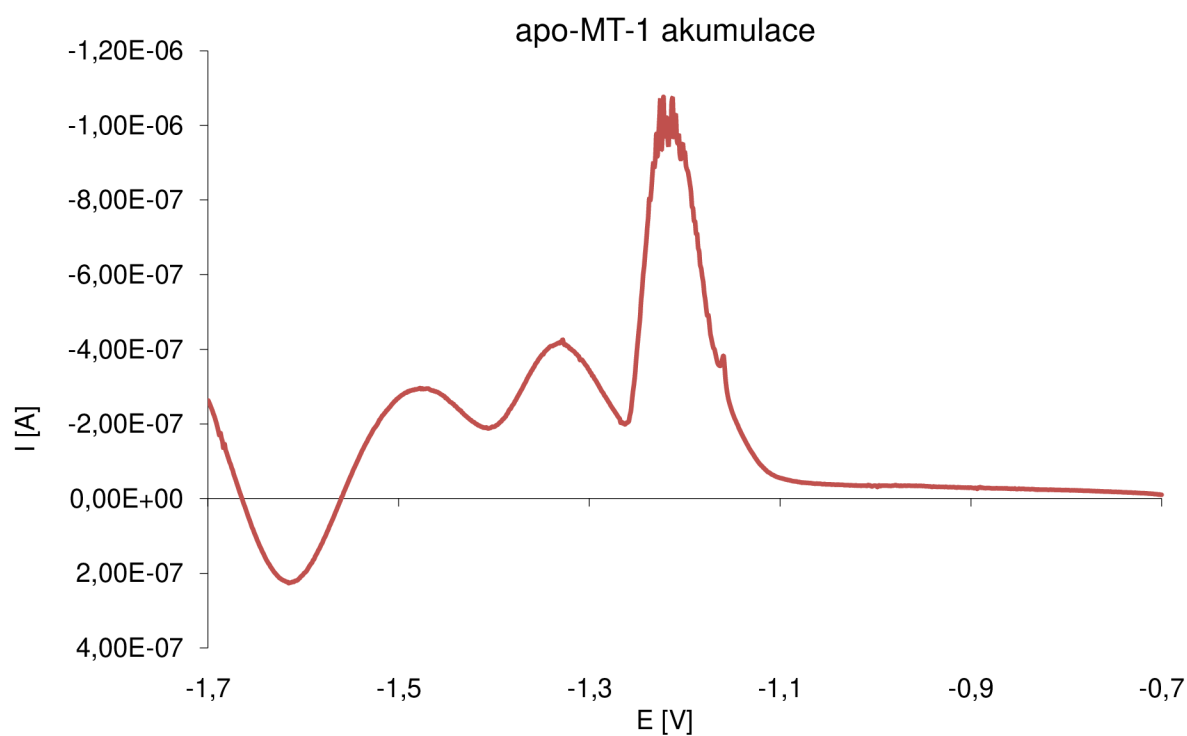
doba akumulace [s]	pík $\text{Co}^{2+} - \text{Co}^0$		pík Cat 1		pík Cat 2 (MT)	
	pozice píku [V]	výška píku [nA]	pozice píku [V]	výška píku [nA]	pozice píku [V]	výška píku [nA]
10	-1,225	2036	-1,328	189,3	-1,487	271,5
30	-1,221	2261	-1,328	215,2	-1,488	311,2
60	-1,221	2002	-1,329	228,7	-1,487	313,4
90	-1,216	1623	-1,336	317,5	-1,486	318,4
120	-1,201	1544	-1,314	341,8	-1,477	283,7
150	-1,218	1470	-1,332	321,3	-1,486	312,1
180	-1,216	1570	-1,328	306,2	-1,485	295,9
210	-1,203	1171	-1,324	359,3	-1,483	284,5
240	-1,200	1280	-1,324	392,2	-1,485	270,3
270	-1,203	1232	-1,322	419,5	-1,484	320,1
300	-1,201	1066	-1,324	384,2	-1,477	326,2



Obrázek 22. Vzorový voltamogram izoformy MT-2 při době akumulace 30s.

Tabulka 15. Hodnoty naměřené při různé době akumulace u izoformy apo-MT-1

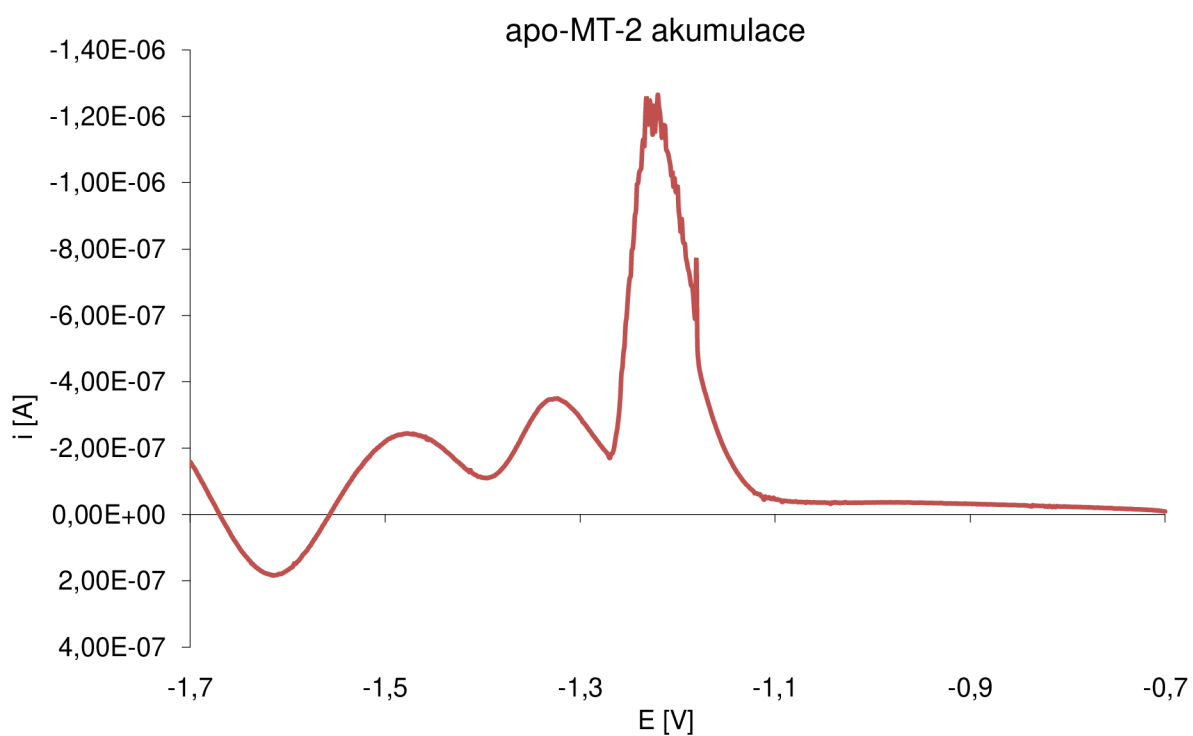
doba akumulace [s]	pík $\text{Co}^{2+} - \text{Co}^0$		pík Cat 1		pík Cat 2 (MT)	
	pozice píku [V]	výška píku [nA]	pozice píku [V]	výška píku [nA]	pozice píku [V]	výška píku [nA]
10	-1,223	996,3	-1,326	216,7	-1,498	221,9
30	-1,219	831,6	-1,331	222,4	-1,498	268,5
60	-1,222	913,5	-1,328	185,7	-1,495	212,5
90	-1,230	903,0	-1,317	125,6	-1,493	168,8
120	-1,223	859,1	-1,337	217,8	-1,500	274,2
150	-1,212	688,7	-1,341	255,2	-1,507	245,8
180	-1,213	723,9	-1,331	231,7	-1,494	261,2
210	-1,221	864,6	-1,322	185,2	-1,493	174,3
240	-1,205	573,2	-1,336	275,3	-1,492	232,0
270	-1,206	776,4	-1,326	241,0	-1,493	203,9
300	-1,219	678,6	-1,328	218,7	-1,493	278,0



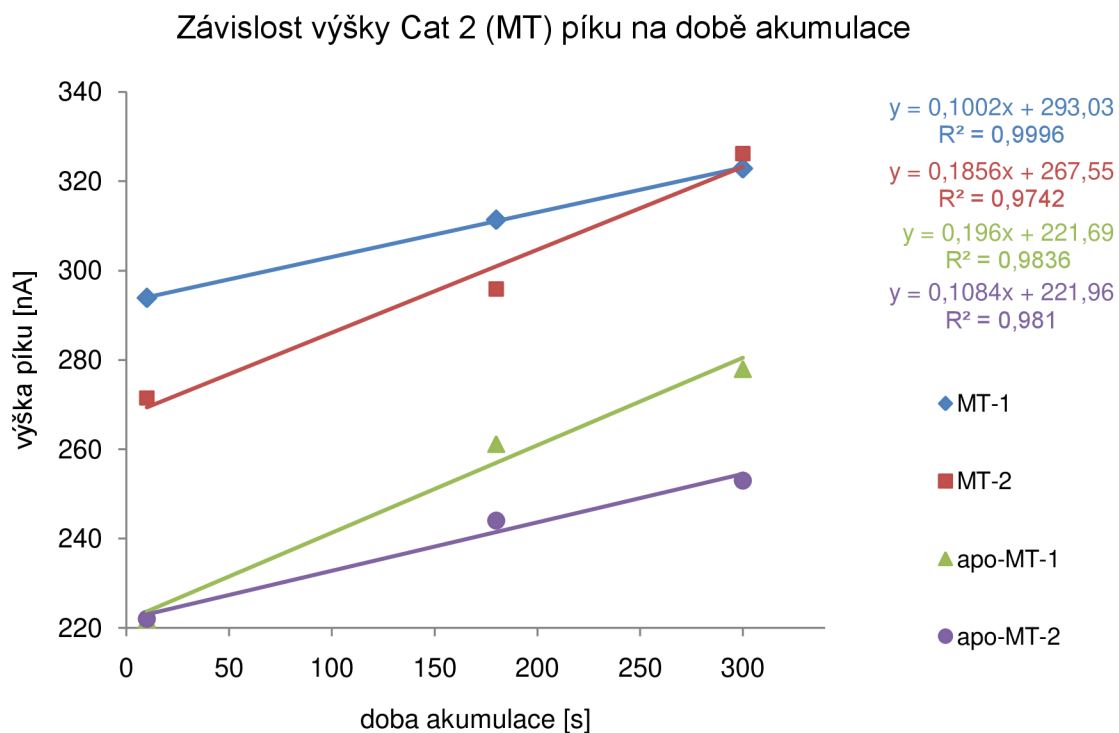
Obrázek 23. Vzorový voltamogram izoformy apo-MT-1 při době akumulace 30s.

Tabulka 16. Hodnoty naměřené při různé době akumulace u izoformy apo-MT-2

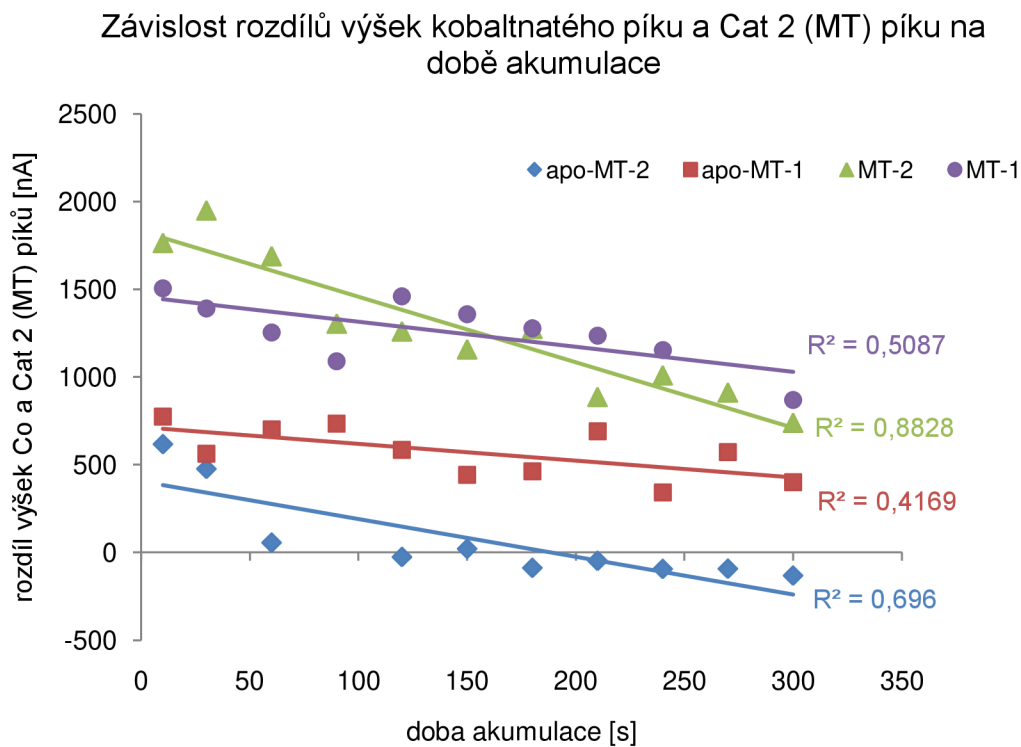
doba akumulace [s]	pík $\text{Co}^{2+} - \text{Co}^0$		pík Cat 1		pík Cat 2 (MT)	
	pozice píku [V]	výška píku [nA]	pozice píku [V]	výška píku [nA]	pozice píku [V]	výška píku [nA]
10	-1,202	829	-1,315	245	-1,481	212
30	-1,220	730	-1,331	205	-1,493	254
60	-1,201	316	-1,315	197	-1,488	261
90	-1,176	166	-1,330	236	-1,487	259
120	-1,181	207	-1,319	170	-1,480	234
150	-1,196	221	-1,315	198	-1,470	201
180	-1,156	155	-1,312	243	-1,473	244
210	-1,188	201	-1,307	194	-1,478	250
240	-1,175	150	-1,323	208	-1,484	245
270	-1,176	162	-1,323	217	-1,487	256
300	-1,161	120	-1,333	235	-1,487	253



Obrázek 24. Vzorový voltamogram izoformy apo-MT-2 při době akumulace 30s.



Obrázek 25. Graf závislosti výšky Cat 2 (MT) píku na době akumulace analytu na rtuťovou kapku u všech izoform.



Obrázek 26. Graf závislosti rozdílů výšek kobaltnatého píku a Cat 2 (MT) píku pro jednotlivé doby akumulace pro všechny izoformy.

5.4. Diskuse

Z kalibračních křivek je vidět, že se zvyšující se koncentrací MT roste výška Cat 2 (MT) píku. Je tomu tak u všech izoform. U izoform MT-1 a apo-MT-1 mají kalibrační křivky strmější průběh. Kalibrační křivka MT-1 je strmější o 0,0661 jednotek než MT-2 křivka. Apo-MT-1 křivka je strmější o 0,0734 jednotek než apo-MT-2 křivka. Hodnoty výšek píků u nejvyšší koncentrace se pohybují okolo 260nA u MT-1 a 280nA u apo-MT-1 na rozdíl od hodnot 200nA u MT-2 a 220nA u apo-MT-2. Srovnání se nabízí stejné i u nižších koncentrací. Takto se tedy izoformy dají od sebe nepatrně odlišit.

Rozptyl chybových úseček u kalibračních křivek je u některých hodnot poměrně velký, což může být způsobeno chybou měření. Měření bylo opakováno celkem třikrát, vždy v jiný den. Vzorek musel být před daným měřením rozmrazen. Všechna měření byla provedena na stejném přístroji, ale tento přístroj byl velmi často používán i pro jiná měření.

Předpokladem pro použití apo-MT izoform bylo zjištění, jaký vliv má iont kovu navázaný ve struktuře MT. Tedy zdali se naměřené voltamogramy u apo-MT izoform a MT izoform nějak liší.

První sledovanou veličinou byla pozice Cat 2 (MT) píku. Tato pozice se u jednotlivých izoform metalothioneinu lišila. Rozdíly jsou znázorněny v grafech na obr.17 a obr.18. Grafy byly získány z výběrových průměrů (se směrodatnou odchylkou $< 0,01V$) pozic MT píků u izoform MT-1 a MT-2 a u izoform apo-MT-1 a apo-MT-2. Na obr.17 vidíme, že MT pík se nacházel u izoformy MT-1 vždy na nižší pozici (menší hodnota [V]) než u izoformy MT-2. Průměrná hodnota pozice MT píku u izoformy MT-1 je -1,479V, u izoformy MT-2 je to -1,472V. Podobné výsledky vidíme na obr.18. MT pík se nacházel u izoformy apo-MT-1 vždy na nižší pozici než u izoformy apo-MT-2. Průměrné hodnoty pozic MT píků jsou -1,491V u apo-MT-1 a -1,478V u apo-MT-2. Z výsledků je patrné, že jednotlivé izoformy se od sebe dají odlišit, ale rozdíly v hodnotách potenciálů jsou mezi nimi velmi malé. Presentovaná metoda - diferenční pulzní voltametrie za využití Brdičkovy reakce - je tedy schopna odlišit izoformy MT, ale pro praktické stanovení bude pravděpodobně vhodnější použít jinou analytickou metodu s větší mírou rozlišení jednotlivých izoform MT, např. elektroforézu.

Srovnáme-li izoformy MT a apo-MT z hlediska polohy píku, ve většině případů se MT pík nacházel u izoform MT na nižší pozici (menší hodnota ve [V]) než u izoform apo-MT (viz obr.19. a obr.20). Rozdíl mezi MT-1 a apo-MT-1 představuje hodnota 0,0112V. Hodnota rozdílu mezi MT-2 a apo-MT-2 je 0,0052V.

Měření bylo opakováno z časových důvodů pouze třikrát pro každou izoformu, proto se pro zpracování dat nenabízí jako vhodné použití další statistické metody. Naměřená data byla porovnána s výsledky z jiných prací, kde byly nalezeny shody. Měření lze proto považovat za správné a výsledné kalibrační křivky je možné použít pro stanovení koncentrací MT.

Další sledovanou veličinou byla doba akumulace analytu na rtuťovou kapku a její vliv na získané voltamogramy. Měření vlivu doby akumulace probíhalo v intervalu 10-300s.

Měření bylo dokázáno, že výšky jednotlivých píků se mění se změnou doby akumulace. Výška redukčního píku $\text{Co}^{2+} - \text{Co}^0$ (kobaltnatý pík) se snižuje se zvyšující se dobou akumulace. Tento pokles byl pozorován u všech izoform. Naproti tomu výška píku Cat 2 (MT) se zvyšující se dobou akumulace roste, což můžeme vidět z grafu na obr.25. Tato závislost byla vytvořena ze tří hodnot doby akumulace - nejnižší (10s), střední (180s) a nejvyšší (300s). Vypočteme-li rozdíly výšek kobaltnatého píku a píku Cat 2 (MT) pro jednotlivé doby akumulace, dostaneme klesající závislost. Hodnoty rozdílů výšek těchto dvou píků se snižují se zvyšující se dobou akumulace (viz obr.26).

S dobou akumulace se také mění poloha některých píků. Poloha kobaltnatého píku se mění směrem k vyšším hodnotám potenciálů a to se zvyšující se dobou akumulace. Pík Cat 2 (MT) nevykazuje u žádné z izoform změnu polohy s rostoucí dobou akumulace. U izoformy MT-1 i MT-2 je průměrná hodnota pozice Cat 2 (MT) píku -1,485V se směrodatnou odchylkou 0,001V. U izoformy apo-MT-1 je tato hodnota rovna -1,496V a směrodatná odchylka 0,001V. U poslední izoformy apo-MT-2 je poloha píku Cat 2 (MT) -1,482V se směrodatnou odchylkou 0,002V.

Ze získaných výsledků vyplývá, že doba akumulace 240s je pro elektrochemické stanovení metalothioneinu optimální, protože za tuto dobu se již analyt dostatečně naváže na rtuťovou kapku a přitom doba jednoho měření není příliš dlouhá (vzhledem k velkému počtu vzorků).

6. Závěr

Ve své práci popisuji strukturu, vlastnosti a funkce proteinu s názvem metalothionein. Jsou zde uvedeny funkce tohoto proteinu v organismu a jeho vztah k nádorovému onemocnění. Současně s těmito poznatky jsou publikovány také metody detekce tohoto proteinu. Provedením základního experimentu jsem ověřila, že diferenční pulzní voltametrie za využití Brdičkovy reakce je vhodnou analytickou metodou k detekci metalothioneinu. Tuto metodu se mi podařilo optimalizovat pomocí následujících kroků

- stanovení vhodné doby akumulace analytu na rtuťovou kapku
- sestavení kalibračních křivek, ze kterých je možné odečíst hodnotu koncentrace MT ve stanovovaném vzorku
- nalezení rozdílů v elektrochemické detekci mezi izoformami MT-1, MT-2 a apo-MT-1, apo-MT-2

Nejvýznamnější oblastí diskutovanou v mojí práci je elektrochemická detekce metalothioneinu za účelem zjištění jeho množství ve stanovovaném vzorku a případná korelace naměřených dat s rakovinným onemocněním. Je nutné zdůraznit, že v budoucnu je potřeba dále provádět výzkum závislosti množství MT na lokalizaci tumoru, stádiu onemocnění, věku pacienta či stravovacích návycích, abychom lépe pochopili, jak koncentrace MT souvisí s těmito onemocněními. Dosavadní výsledky přítomnosti MT v krevním séru u pacientů s rakovinou dokazují, že by tento protein mohl být vhodným markerem u některých typů takovýchto onemocnění.

7. Seznam zkratek a symbolů

5'UTR	netranslatovaná oblast na 5' konci sekvence DNA
AdTS	adsorptive transfer stripping technique - adsorpční přenosová rozpouštěcí technika
Ala	alanin
apo-MT	metallothionein bez navázaného kadmia ve struktuře proteinu
ARE	antioxidant response element - antioxidační-responzivní element
Cd	kadmium
CPSA	chrono-potentiometric stripping analysis - derivační chronopotenciometrie s konstantním proudem
Cu	měď
Cys	cystein
DME	dropping mercury electrode - rtuťová kapková elektroda
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DPP	diferenční pulzní polarografie
DPV	diferenční pulzní voltametrie
DTT	dithiothreitol
GIF	growth inhibitory factor - růstový inhibiční faktor
Glu	kyselina glutamová
Gly	glycin
GRE	glucocorticoid response element - glukokortikoido-responzivní element
GSH	glutathion
GSSG	molekula oxidovaného glutationu
HMDE	hanging mercury drop electrode - visící rtuťová kapková elektroda
LPS	lipopolysacharid
Lys	lysin
MFE	mercury film electrode - rtuťová filmová elektroda
MRE	metal response element; úsek DNA zodpovědný za transkripci MT
mRNA	mediátorová (informační) ribonukleová kyselina
MT	metallothionein
MTF-1	metal-regulatory transcription factor-1 - metalo-regulační transkripční faktor 1; druhá složka komplexu, na který se váže zinek
MTI	inhibitor; první složka aktivačního komplexu, na kterou se váže zinek

NMR	nukleární magnetická rezonance
NPV	normální pulzní voltametrie
Pb	olovo
PC	fytochelatiny
pI	izoelektrická pohyblivost proteinu
Pt	platina
Ser	serin
SMDE	static mercury drop electrode - statická rtuťová kapková elektroda
TCEP	tris(2-carboxyethyl)fosfin
Tris-HCl	tris(hydroxymethyl)aminomethan
UV	ultrafialové (záření)
Zn	zinek

8. Seznam použité literatury

- [1] KLASSEN, C.D. Metallothionein IV. Basel : Birkhäuser, 1999. 645 s. ISBN 3-7643-5830-0
- [2] KIZEK, R.; VACEK, J.; TRNKOVÁ, L.; KLEJDUS, B.; HAVEL, L. Využití katalytických reakcí na rtuťové elektrodě pro elektrochemické stanovení metallothioneinů. *Chemické listy*. 2004, 98, 4, s. 166-173
- [3] FABRIK, I.; KUKAČKA, J.; PRŮŠA, R.; ECKSCHLAGER, T.; ADAM, V.; KIZEK, R. Metallothionein a jeho klinický význam [online]. [cit.2010-11-10]. Dostupné z WWW: <<http://www.stapro.cz/bullfons/22008/labo3.pdf>>
- [4] MEPLAN, C.; RICHARD, M. J.; HAINAUT, P. Metalloregulation of the tumor suppressor protein p53: zinc mediates the renaturation of p53 after exposure to metal chelators in vitro and in intact cells. *Oncogene*. 2000, 19 (46), s. 5227-5236
- [5] KOJIMA, Y. Definitions and nomenclature of metallothionein. *Methods in Enzymology*. 1991, 205, s. 8-10
- [6] ZENG, J.; VALLEE, B. L.; KAGI, I. H. R. Zinc transfer from transcription factor-III A fingers to thionein clusters. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1991, 88 (22), s. 9984-9988
- [7] PALMITER, R. D.; FINDLEY, S. D. Cloning and functional characterization of mammalian zinc transporter that confers resistance to zinc. *Embo Journal*. 1995, 14 (4), s. 639-649
- [8] COLE, T. B.; WENZEL, H. J.; KAFER, K. E. Elimination of zinc from synaptic vesicles in the intact mouse brain by disruption of the ZnT3 gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1999, 96 (4), s. 1716-1721
- [9] STUDER, R.; VOGT, C. P.; CAVIGELLI, M. Metallothionein accretion in human hepatic cells is linked to cellular proliferation. *Biochemical Journal*. 1997, 328, s. 63-67
- [10] PETR, J. "Zinkové prsty" vnášejí geny do rostlin - Český rozhlas Leonardo [online]. 2009-05-05 [cit.2010-11-10]. "Zinkové prsty" vnášejí geny do rostlin. Dostupné z WWW: <http://www.rozhlas.cz/leonardo/priroda/_zprava/578425>
- [11] JIANG, L. J.; MARET, W.; VALLEE, B. L. The glutathione redox couple modulates zinc transfer from MT to zinc-depleted sorbitol dehydrogenase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1998, 95 (7), s. 3483-3488

- [12] [online], [cit.2010-11-10]. Dostupné z WWW: <http://quicksealinternational.com/img/Kyslikove_radikaly.pdf>
- [13] MURRAY, R. K.; GRANNER, D. K.; MAYES, P. A. *Harper's illustrated biochemistry*. 26th edition. New York : McGraw-Hill, 2003. 693 s. ISBN 978-0071389013
- [14] KOROPATNICK, J.; LEIBBRANDT, M.; CHERIAN, M. G. Organ specific metallothionein induction in mice by X irradiation. *Radiation Research*. 1988, 119 (2), s. 356-365
- [15] FORNACE, A. J.; SCHALCH, H.; ALAMO, I. Coordinate induction of metallothionein-I and metallothionein-II in rodent cells by UV irradiation. *Molecular and Cellular Biology*. 1988, 8 (11), s. 4716-4720
- [16] THEOCHARIS, S. E.; MARGELI, A. P.; KLIJANIENKO, J. T.; KOURAKLIS, G. P. Metallothionein expression in human neoplasia. *Histopathology*. 2004, 45 (2), s. 103-118
- [17] CHERIAN, M. G.; JAYASURRYA, A.; BAY, B.-H. Metallothioneins in human tumors and potential roles in carcinogenesis. *Mutation Research*. 2003, 533, s. 201-209
- [18] COYLE, P.; PHILCOX, J. C.; CAREY, L. C.; ROFE, A. M. Metallothionein: the multipurpose protein. *Cell Mol. Life Science*. 2002, 59, s. 627-647
- [19] HELÁN, V. *Elektroanalytické metody : Sborník přednášek z kurzu*. Vyd. 1. Český Těšín : 2 THETA, 2001. 316 s. ISBN 80-86380-07-6
- [20] ZČU - FAKULTA PEDAGOGICKÁ: KATEDRA CHEMIE Polarografie. *Laboratorní cvičení z instrumentální chemie - návody* [online], [cit.2010-11-18]. Dostupné z WWW: <<http://www.kch.zcu.cz/cz/di/sks/01-POLAROGRAFIE.pdf>>
- [21] TRNKOVÁ, L.; JANDERKA, P. Úloha č. 9: Stanovení těžkých kovů a) pomocí DPV na HMDE, b) pomocí EVLS na PIGE. *Elektroanalytické metody - laboratorní cvičení* [online], [cit.2010-11-18]. Dostupné z WWW: <http://cheminfo.chemi.muni.cz/ktfch/trnkova/elanalmet/navody/uloha%209/9-Stripping%20DPV_navod.pdf>
- [22] BARD, A. J.; FAULKNER, L. R. *Electrochemical methods : Fundamentals and applications*. 2nd edition. New York : John Wiley&Sons, 2001. 833 s. ISBN 0471043729.
- [23] [online], [cit.2010-11-21]. Dostupné z WWW: <http://aix-lin.upol.cz/~jirovsky/IM_EM_2.pdf>
- [24] HEYROVSKY, M. Early polarographic studies on proteins. *Electroanalysis*. 2004, 16, s. 1067-1073
- [25] RASPOR, B. Elucidation of the mechanism of the Brdička reaction . *Journal of electroanalytical chemistry*. 2001, 503, s. 159-162

[26] ZELENÁ, J.; POTĚŠIL, D.; VACEK, J.; ADAM, V.; HRADECKÝ, J.; PRŮŠA, R.; KIZEK, R.; VOJTĚŠEK, B. Metallothionein jako prognostický marker nádorového onemocnění. *Klinická onkologie*. 2004, 17, 6, s. 190-195

[27] VAŠÁK, M.; MELONI, G. Metallothionein structure and reactivity. In *Metallothioneins in biochemistry and pathology*. : World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd. s. 3-26. Dostupné z WWW: <<http://www.worldscibooks.com/medsci/6663.html>>