

252 Thioly a nádorová onemocnění, vidíme veškeré souvislosti?

Adam V.¹, Křížková S.¹, Fabrik I.^{1,2}, Šobrová P.¹, Stejskal K.^{1,2}, Zítka O.^{1,2}, Hraběta J.³, Eckschlager T.³, Kukačka J.⁴, Průša R.⁴, Horáková Z.⁵, Binková H.⁵, Horna A.⁶, Kizek R.^{1,*}

1) Ústav chemie a biochemie, Agronomická fakulta, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně

2) Katedra biochemie, Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita, Brno

3) Klinika dětské hematologie a onkologie, II. Lékařská fakulta, Univerzita Karlova, Praha

4) Ústav klinické biochemie a patobiochemie, II. Lékařská fakulta, Univerzita Karlova, Praha

5) Klinika otorinolaryngologie a chirurgie hlavy a krku, Fakultní nemocnice u sv. Anny v Brně

6) Radanal s.r.o., Pardubice

*) Korespondenční autor: kizek@sci.muni.cz

Klíčová slova

Thiolové sloučeniny – nádorová onemocnění – analytické metody – elektrochemické metody – glutathion – metallothionein

Úvod

Síra existuje v mnoha oxidačních stavech, což z ní dělá velmi univerzální prvek nezbytný v mnoha biologických sloučeninách a systémech [1]. Nejvíce aktivní a zároveň redukovanou formou síry v biomolekulách je thiolová skupina (-SH). Můžeme ji nalézt ve velkém množství biologicky aktivních látek jako je aminokyselina cystein, neproteinová aminokyselina homocystein a mnoho dalších. Thiolové sloučeniny mají velké množství biologických funkcí jako jsou například kontrola genové exprese [1], signalizace a detoxikace těžkých kovů [2,3]. Kromě toho mohou také sloužit jako markery mnoha různých onemocnění [4]. A navíc jejich vztah k nádorovým onemocněním je v poslední době stále častěji diskutovanou otázkou.

Glutathion

Jedním ze nejjednodušších thiolů obsažených v živých organismech je esenciální aminokyselina cystein. Podílí se významně na struktuře bílkovin (tvoří disulfidové můstky) a na udržení přiměřeného oxidačně-redukčního prostředí v buňce jakou sou-

část všudypřítomného tripeptidu nazvaného glutathion (GSH). Tento peptid objevil M. J. de Rey Pailhade na konci devatenáctého století a nazval jej jako „hydrogénant le soufre“. Své dnes používané jméno získal prostřednictvím F. G. Hopkinse v roce 1921, který se nejvíce zasloužil o studium této velmi zajímavé molekuly. Bohužel se tento držitel Nobelovy ceny nejvíce zapsal do historie nejen jako velkán biochemie, ale také pro svůj omyl při určování primární sekvence GSH. Nejdříve navrhnul, že GSH je dipeptid skládající se z glutamové kyseliny a cysteinu. Až o pár let později a především pod tlakem jiných autorů přijal, že kromě výše zmíněných aminokyselin obsahuje také glycin [5]. GSH jako všudypřítomný thiol je životně důležitý intra- a extra-celulární antioxidant, který hraje klíčovou roli v kontrole signalizačních procesů, detoxikaci některých xenobiotik, těžkých kovů a mnoha dalších. GSH se vyskytuje především v redukované formě, pokud je enzym zvaný glutathion reduktáza, který jej z jeho oxidované formy redukuje, aktivní a schopný být navozen v podmínkách oxidativního stresu. A proto je poměr mezi redukovanou a oxidovanou formou glutathionu často používán jako marker buněčné toxicity [3,6-8]. Ve spojitosti s tímto tvrzením není tedy překvapením, že mnoho základních dějů v buněčné regulaci jako fosforylace proteinů a jejich vazba na transkripční faktory na DNA jsou silně ovlivňovány redoxní rovnováhou, zejména pak rovnováhou mezi -SH a S-S. Proto endogenní glutathionový a thioredoxinový systém mohou být považovány za efektivní regulátory redox-sensitivní genové exprese [4,9-11]. Sulfhydrylová skupina GSH je vysoce reaktivní a je obvykle konjugována k dalším molekulám jako oxid dusnatý [12,13]. A právě nitrosylace glutathionu může sloužit jako signální událost anebo jako depozice oxidu dusnatého v podobě S-nitroglutathionu.

Na základě zmíněných faktů není překvapením, že GSH může ovlivnit léčbu různých onemocnění včetně nádorových [14,16]. U maligních nádorů v porovnání se zdravou tkání bylo prokázáno, že mnohočetná rezistence na léky („multidrug resistance“) v mnoha případech koreluje s vysokou hladinou GSH [17]. Zvýšená hladina GSH byla zjištěna u řady nádorových onemocnění v různých typech tkání např. kostní dřevě, prsu, střeva, hrtanu a plic [12]. Tyto výsledky vedly k navržená experimentů s buněčnými nádorovými liniemi. Bylo ukázáno, že hladiny GSH stoupla desetinásobně po vývoji rezistence u buněk získaných z nádorů vaječníků v porovnání s hladinou ve vzorcích, které nebyly vystaveny působení alkylujících činidel.

Jeden z hlavních důvodů takového nárůstu může být interakce GSH s protirakovinovými léčivými na bázi platiny [18]. Mezi dnes nejpoužívanější, na platině založené cystostatika patří cisplatina, karboplatina a oxaliplatina [19-23]. Právě karboplatina a oxaliplatina byly vyvinuty jako léčiva druhé popř. třetí generace, které mají překonávat rezistenci na cisplatinu. Studium interakcí těchto léčiv s glutathionem získává na významu nejen z pohledu pochopení vlastního fungování léčiva, ale také z pohledu překonání rezistence, která je u těchto léčiv jednou z hlavních komplikací jejich použití. A navíc by mohly tyto výsledky využity i při návrhu postupů pro léčbu rakoviny založený na modulaci či kontrole změn obsahu a syntéze GSH [24-27].

Metalothionein

Jedním z dalších a neméně zajímavých thiolů z pohledu studia vztahu k nádorovým onemocněním jsou metalothioneiny (MT). Tyto proteiny patří do skupiny intracelulárních, nízkomolekulárních na cystein bohatých proteinů o molekulové hmotnosti od 6–10 kDa [28]). Ze strukturních modelů lze předpokládat, že molekula MT se skládá ze dvou vazebných domén a, které jsou složeny z cysteinových klastrů. Lidské MT patří do I. třídy metalothioneinů a jsou kódovány rodinou genů vytvářejících 10 isoform. Vzniklé proteiny jsou rozděleny do čtyř skupin: MT-1, MT-2, MT-3 a MT-4. MT-1 protein existuje ve více isoformách, respektive MT-1 protein vytváří více subtypů kódovaných sadou MT-1 genů (MT-1A, MT-1B, MT-1E, MT-1F, MT-1G, MT-1X). V organismu dospělých jedinců jsou nejvíce zastoupeny dvě isoformy MT (MT-1A, MT-2A), které se exprimují ve většině lidských tkání, v mozkové tkáni je přítomna pouze isoforma MT-3 (někdy označována jako růstový inhibiční faktor – GIF). V dlaždicovém epitelu je hojně zastoupena isoforma MT-4. MT-1 a MT-2 isoformy jsou obvykle exprimovány v lidském organismu ve velmi nízkých koncentracích.

Ačkoliv je MT připisována řada biologických funkcí, je většina z nich úzce spjata s jejich schopností vázat kovy [29]. A proto mohou organismu nejen chránit před toxicitou, kterou těžké kovy způsobují, ale také mohou sloužit jako donátor zinečnatých nebo mědnatých iontů do metalo-enzymů nebo transkripčních faktorů [28]. Mohou také sloužit jako ochrana proti oxidativnímu poškození pro svůj vysoký obsah cysteinu. Kromě těchto funkcí zůstává stále otázkou jejich vztah k buněčné proliferaci a diferenciaci [30].

A právě ochranná role MT proti oxidativnímu stresu a toxicitě těžkých kovů naznačuje možnou funkční roli těchto proteinů v růstu a přežití nádorových buněk. Je známo, že je řada faktorů zahrnuta ve vzniku a vývoji rezistence na protinádorovou léčbu a exprese MT v nádorech by mohla být jedním z nich. MT mohou „ulehčit“ růst nádoru dvěma potenciálními mechanismy. Může sloužit jako donor zinku k různým transkripčním faktorům včetně tumor supresorových genů, které produkují např. protein p53. *In vitro* studie ukázali, že MT jsou schopny modulovat transkripční aktivaci Sp1, neboli transkripčního faktoru zinkových prstů [31]. Což potvrzuje možnou výměnu zinku mezi MT a dalšími proteiny zapojených do buněčného růstu. Translokace MT do buněčného jádra během proliferativní fáze (G1-S) buněčného cyklu u lidských nádorů také podporuje myšlenku role MT jako donora zinku během rakovinového bujení. Kromě toho, MT jsou známy jako zhášeče volných kyslíkových radikálů. A proto druhý mechanismus spojení MT a rakoviny může ležet v tom, že MT jsou schopny chránit buňky před radiací a chemoterapeutickými léčivými prostřednictvím svých volných SH skupin schopných reagovat s radikály. Vztah MT a tumor supresorového genu p53 byla studována u řady lidských nádorů. Statisticky významná asociace mezi expresí MTs a p53 byla objevena v buňkách karcinomu plic [32]. V další práci nebyla objevena korelace mezi expresí MT a p53 ve zhoubném epitelu hrtanu a karcinomu močो-

vého měchýře [29,33]. In vitro studie ukázaly, že MT jsou schopny modulovat konformaci a transkripční aktivitu genu a proteinu p53 prostřednictvím chelatace zinku.

Dalším a neméně zajímavým směrem je studium vztahu koncentrace či exprese MTs a vznikem a průběhem jednotlivých nádorových onemocnění. Nejnovější výzkumy naznačují, že existuje vztah mezi množstvím metalothioneinu a rychlostí rozvoje zhoubného nádoru [35-37]. Dále se v poslední době objevují pokusy charakterizovat množství MTs v různých typech nádorů a získané výsledky jsou velkým příslibem do budoucna [38,39].

Závěr

Vztah thiolových látek a nádorových onemocněních lze studovat ve dvou rovinách a to z pohledu léčby anebo diagnostiky. Jak je v příspěvku ukázáno thioly jako redukováný glutathion a metallothionein mohou a s největší pravděpodobností také hrají klíčovou roli při tvorbě rezistence na léčbu rakoviny. Jejich řízená exprese v organismu by tedy mohla výrazným způsobem zlepšit nejen průběh léčby, ale také její celkový příznivý výsledek. Co se týče druhé roviny studia, je stále otázkou, jestli mohou být thioly použity jako markery různých malignit. Výsledky získané v této oblasti jsou rozporuplné, ale potenciál jejich využití pro praxi v případě úspěšné korelace i s jedním typem nádorů je velmi slibný.

Poděkování: Příspěvek vznikl za podpory grantů Běh Terryho Foxe 2007, Liga proti rakovině Praha 2006, GAAV IAA401990701 a VUP 2007.

Literatura

- Moriarty-Craige SE, Jones DP. Extracellular thiols and thiol/disulfide redox in metabolism. *Annu Rev Nutr.* 2004;24:481-509.
- Meister A. Glutathione Metabolism and Its Selective Modification. *J Biol Chem.* 1988 Nov;263(33):17205-8.
- Townsend DM, Tew KD, Tapiero H. The importance of glutathione in human disease. Title: The importance of glutathione in human disease. 2003;57(3-4):145-55.
- Sen CK, Packer L. Antioxidant and redox regulation of gene transcription. *Faseb J.* 1996 May;10(7):709-20.
- Hopkins FG. On an autoxidisable constituent of the cell. Title: On an autoxidisable constituent of the cell. 1921;15(2):286-305.
- Carelli S, Ceriotti A, Cabibbo A, Fassina G, Ruvo M, Sitia R. Cysteine and glutathione secretion in response to protein disulfide bond formation in the ER. Title: Cysteine and glutathione secretion in response to protein disulfide bond formation in the ER. 1997;277(5332):1681-4.
- Locigno R, Castronovo V. Reduced glutathione system: Role in cancer development, prevention and treatment (Review). Title: Reduced glutathione system: Role in cancer development, prevention and treatment (Review). 2001;19(2):221-36.
- Noctor G, Foyer CH. Ascorbate and glutathione: Keeping active oxygen under control. Title: Ascorbate and glutathione: Keeping active oxygen under control. 1998;49:249-79.
- Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev.* 2002 Jan;82(1):47-95.
- Hayes JD, Pulford DJ. The glutathione S-Transferase supergene family: Regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 1995;30(6):445-600.
- Yegorova S, Yegorov O, Lou MF. Thioredoxin induced antioxidant gene expressions in human lens epithelial cells. *Exp Eye Res.* 2006 Oct;83(4):783-92.
- Balendiran GK, Dabur R, Fraser D. The role of glutathione in cancer. Title: The role of glutathione in cancer. 2004;22(6):343-52.
- Clancy RM, Levartovsky D, Leszczynskapiziak J, Yegudin J, Abramson SB. Nitric-oxide reacts with intracellular glutathione and activates the hexose-monophosphate shunt in human neutrophils - Evidence for S-nitrosoglutathione as a bioactive intermediary. *P Natl Acad Sci USA.* 1994;91(9):3680-4.
- Brabec V, Kasparkova J. Molecular aspects of resistance to antitumor platinum drugs. *Drug Resist Update.* 2002 Jun-Aug;5(3-4):147-61.
- Kasparkova J, Novakova O, Vrana O, Intini F, Natile G, Brabec V. Molecular aspects of antitumor effects of a new platinum(IV) drug. *Mol Pharmacol.* 2006 Nov;70(5):1708-19.
- Ramos-Lima FJ, Vrana O, Quiroga AG, Navarro-Ranninger CN, Halamikova A, Rybnickova H, et al. Structural characterization, DNA interactions, and cytotoxicity of new transplatin analogues containing one aliphatic and one planar heterocyclic amine ligand. *J Med Chem.* 2006 Apr;49(8):2640-51.
- Loe DW, Almquist KC, Deeley RG, Cole SPC. Multidrug resistance protein (MRP)-mediated transport of leukotriene C-4 and chemotherapeutic agents in membrane vesicles - Demonstration of glutathione-dependent vincristine transport. *J Biol Chem.* 1996 Apr;271(16):9675-82.
- Riddick DS, Lee C, Ramji S, Chinje EC, Cowen RL, Williams KJ, et al. Cancer chemotherapy and drug metabolism. *Drug Metab Dispos.* 2005 Aug;33(8):1083-96.
- Raymond E, Faivre S, Chaney S, Woynarowski J, Cvitkovic E. Cellular and molecular pharmacology of oxaliplatin. *Mol Cancer Ther.* 2002 Jan;1(3):227-35.

VARIA

20. Raymond E, Chaney SG, Taamma A, Cvitkovic E. Oxaliplatin: A review of preclinical and clinical studies. *Ann Oncol.* 1998 Oct;9(10):1053-71.
21. Fuentes MA, Castilla J, Alonso C, Perez JM. Cisplatin biochemical mechanism of action: From cytotoxicity to induction of cell death through interconnections between apoptotic and necrotic pathways. *Curr Med Chem.* 2003 Feb;10(3):257-66.
22. Ong ST, Vogelzang NJ. Chemotherapy in malignant pleural mesothelioma: A review. *J Clin Oncol.* 1996 Mar;14(3):1007-17.
23. Weiss RB, Christian MC. New Cisplatin Analogs in Development - a Review. *Drugs.* 1993 Sep;46(3):360-77.
24. Estrela JM, Ortega A, Obrador E. Glutathione in cancer biology and therapy. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 2006;43(2):143-81.
25. Kauvar LM, Morgan AS, Sanderson PE, Henner WD. Glutathione based approaches to improving cancer treatment. *Chem-Biol Interact.* 1998 Apr 24;112:225-38.
26. Clynes M, Heenan M, Hall K. Human Cell-Lines as Models for Multidrug-Resistance in Solid Tumors. *Cytotechnology.* 1993;12(1-3):231-56.
27. Mitchell JB, Glatstein E. Radiation Oncology - Past Achievements and Ongoing Controversies. *Cancer Res.* 1991 Sep 15;51(18):S5065-S73.
28. Kagi JHR, Schaffer A. Biochemistry of Metallothionein. *Biochemistry.* 1988 Nov;27(23):8509-15.
29. Cherian MG, Jayasurya A, Boon-Huat B. Metallothioneins in human tumors and potential roles in carcinogenesis. *Mut Res.* 2003;533(1-2):201-9.
30. Cherian MG, Apostolova MD. Nuclear localization of metallothionein during cell proliferation and differentiation. *Cell Mol Biol.* 2000 Mar;46(2):347-56.
31. Zeng J, Vallee BL, Kagi JHR. Zinc Transfer from Transcription Factor-I α Fingers to Thionein Clusters. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991 Nov;88(22):9984-8.
32. Joseph MG, Banerjee D, Kocha W, Feld R, Stitt LW, Cherian MG. Metallothionein expression in patients with small cell carcinoma of the lung - Correlation with other molecular markers and clinical outcome. *Cancer.* 2001 Aug;92(4):836-42.
33. Ioachim EE, Charchanti AV, Stavropoulos NE, Athanassiou ED, Michael MC, Agnantis NJ. Localization of metallothionein in urothelial carcinoma of the human urinary bladder: An immunohistochemical study including correlation with HLA-DR antigen, p53, and proliferation indices. *Anticancer Res.* 2001 May-Jun;21(3B):1757-61.
34. Meplan C, Richard MJ, 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 Nov;19(46):5227-36.
35. Nakayama A, Fukuda H, Ebara M, Hamasaki H, Nakajima K, Sakurai H. A new diagnostic method for chronic hepatitis, liver cirrhosis, and hepatocellular carcinoma based on serum metallothionein, copper, and zinc levels. *Biological and Pharmaceutical Bulletin.* 2002;25(4):426-31.
36. Theocharis S, Karkantaris C, Philipides T, Agapitos E, Gika A, Margeli A, et al. Expression of metallothionein in lung carcinoma: correlation with histological type and grade. *Histopathology.* 2002;40:143-51.
37. Theocharis SE, Margeli AP, Klijanienko JT, Kouraklis GP. Metallothionein expression in human neoplasia. *Histopathology.* 2004;45(2):103-18.
38. Petrlova J, Blastik O, Prusa R, Kukacka J, Mikelova R, Stiborova M, et al. Determination of metallothionein content in patients with breast and colon cancer, and malignant melanoma. *Klinicka Onkologie.* 2006;19(2):138-42.
39. Prusa R, Svoboda M, Blastik O, Adam V, Zitka O, Beklova M, et al. Increase in content of metallothionein as marker of resistance to cisplatin treatment. *Clin Chem.* 2006 July 23-27;52(Suppl. 6):A174-A5.