

258 Obsah metalothioneinu v buňkách neuroblastomu ve vztahu k rezistenci vůči platinovým cytostatikům.

Hraběta J.¹, Figová K.¹, Eckschlager T.¹, Průša R.², Baščík O.³, Křížková S.³, Adam V.³, Cinatl J.⁴, Michaelis M.⁴, Kizek R.³

1) *Klinika dětské hematologie a onkologie*

2) *Ústav klinické biochemie a patobiochemie UK 2LF a FN Motol,*

3) *Ústav chemie a biochemie MZLU v Brně*

4) *Institut für Medizinische Virologie, Klinikum der J. W. Goethe-Universität, Frankfurt am Main, Germany*

Úvod

Metalothioneiny (MT) jsou intracelulární, nízkomolekulární proteiny (6,5 kDa) bohaté na cystein. Byly poprvé popsány v roce 1957 jako proteiny vázící kadmium (Margoses and Valle, 1957). V současné době je známo 15 MT rodin a 38 MT podrodin. MT jsou strukturálně konzervativní proteiny s velkým stupněm sekvenční homologie, kterou nacházíme mezi většinou obratlovců i bezobratlých živočichů. Tyto proteiny mají klíčovou roli při udržování homeostázy iontů kovů v organismech. V buňkách jsou lokalizovány v cytoplasmě i subcelulárních organelách jako jsou mitochondrie, lysozomy a/nebo v jádře. Význam přítomnosti MT v různých buněčných kompartmentech není zcela vysvětlen. Jejich buněčná lokalizace je ovlivňována fází buněčného cyklu – MT jsou v G0/G1 fázi buněčného cyklu lokalizovány v cytoplasmě, ale v časně S-fázi jsou rychle translokovány do jádra (Nagel and Valle, 1995). Zdá se, že intranukleární lokalizaci MT ovlivňuje také oxidativní stres, UV záření či expozice látkám poškozujícím DNA. Z těchto důvodů se lze domnívat, že MT se mohou podílet na DNA reparativních mechanismech a/nebo chránit DNA před poškozením (Ghoshal and Jakob, 2001). MT mají neuroprotektivní účinky a významně snižují hladiny prozánětlivých cytokinů a reaktivních forem kyslíku v nervové tkáni. Geny pro MT jsou u člověka lokalizovány v oblasti 16q12-22. V současné době jsou u člověka známy 4 hlavní izoformy MT (MT I-IV), MT I je kódován 11 geny (MT I-A, -B, -E, -F, -G, -H, -I, -J, -K, -L a -X) a každá další izoforma MT jedním genem (MT-II A gen, MT-3 gen a MT-4 gen) (Ghoshal and Jacob, 2001). Transkripce MT genů je regulována „*Metal-regulatory transcription factor-1*“ (MTF-1). Transkripce MT je iniciována vazbou MTF-1 na „*metal responsive elements*“ v promotorové oblasti MT genu (Gunes et al, 1998). Hlavní biologickou funkcí MT je detoxikace těžkých kovů. MT vyvazují ionty kovů a charakteristickým způsobem je inaktivují nebo transportují do metabolicky neaktivních kompartmentů buňky. Významným regulačním prvkem vazebných vlastností MT je glutathion (γ -glutamyl-cysteinylglycin), který ovlivňuje oxidačně redukční vlastnosti sulfhydrylových skupin MT. Často diskutovanou otázkou je schopnost MT transportovat atomy kovů k apoenzymům a jejich aktivní zapojení do homeostázy esenciálních prvků. Schopnost MT transportovat kov do regulačních proteinů má význam v procesu karcinogeneze a pravděpodobně souvisí s inhibicí některých proapoptotických proteinů (p53, caspasa-3) (Cherian and Apostolova, 2000). MT I je exprimován v místech probíhající angiogeneze a jeho transkripce je pod kontrolou „*Vascular endothelial zinc finger 1*“ transkripčního faktoru. Snížení exprese MT I inhibuje angiogenezi *in vitro* a i *in vivo* modelech (Miyashita H and Sato Y 2005). V posledním desetiletí byly publikovány práce, které dokumentují význam MT u některých nádorových onemocnění. U maligního melanomu je zvýšená exprese MT spojena se zvýšeným rizikem progresu onemocnění a zkrácením celkové délky přežití. Zvýšená exprese MT u tohoto nádoru je signifikantní a nezávislý prediktivní faktor a koreluje s ostatními používanými prognostickými znaky (Clarkova stupnice, velikost nádoru, ulcerace, lokalizace, věk) (Weinlich et al, 2006). Prognosticky významné bylo zjištění exprese MT též u karcinomu prsu, jícnu, močového měchýře a některých dalších nádorů (Cherian et al, 2003, Jin et al, 2004).

Chemorezistence nádorových onemocnění je jedním z hlavních důvodů neúspěšnosti protinádorové léčby. Je známo, že na rezistenci k protinádorovým léčivům se též podílejí intracelulární thiooly (glutathion, metalothioneiny). MT snižují cytotoxicitu cisplatinu a karboplatinu neutralizací Pt iontu a experimentální studie prokazují, že zvýšená exprese metalothioneinu se u některých nádorů (ependymom, ca jícnu a ORL oblasti) může podílet na rezistenci k těmto cytostatikům, ale bylo prokázáno, že snižují účinnost i některých dalších cytostatik (etoposid, 5-fluorouracil, irinotekan, BCNU) (Andrews et al, 1987; Bacolod et al, 2002).

MT jsou také důležité látky z hlediska ochrany proti radiačnímu a oxidačnímu stresu. Je tedy zřejmé, že MT se na vzniku rezistence nepodílejí pouze mechanistickým vyvázáním Pt iontu, ale i dalšími mechanismy.

Cíle

- 1) Na experimentálním modelu ověřit metodu elektrochemického vyšetření buněčného MT.
- 2) Určit hladiny MT v neuroblastomové buněčné linii a od ní odvozené linie rezistentní k cisplatině a jejich změny po inkubaci s cisplatinou a karboplatinou.

Metoda

Buněčné linie: UKF-NB-4 (připravena z recidivy neuroblastomu vysokého rizika do kostní dřeně, s amplifikací MYCN, del1p34.2-ter, del13iso17q) a od ní odvozená linie UKF-NB-4^(cdp) s *in vitro* navozenou rezistencí k cisplatině. Rezistence byla navozena dlouhodobou kultivací v mediu se stoupající koncentrací cisplatinu. Citlivost obou linií k cisplatině a karboplatině jsme stanovili MTT testem. IC50 cisplatinu byla téměř čtyřikrát vyšší a karboplatinu více než pětikrát vyšší u UKF-NB-4^(cdp) než

u UKF-NB-4. Linie UKF-NB-4^(cddp) měla na rozdíl od mateřské linie zmožení 16q13-22, kde se nacházejí geny pro MT a neamplifikovala gen MDR-1 ani zvýšeně neexprimovala P-glykoprotein (Bedrníček et al, 2005). Rezistentní linii UKF-NB-4^(cddp) jsme kultivovali 5 pasáží bez cisplatinu, za tu dobu tato linie neztratila svojí rezistenci k cisplatině ani karboplatině. Následně jsme přidávali cisplatinu a karboplatinu v koncentracích 0,01, 0,1 a 1,0 µg/ml, resp. 0,1, 1,0 a 10 µg/ml. Ve stejných koncentracích jsme přidali cis-platinu a karboplatinu k linii UKF-NB-4.

Elektrochemické stanovení MT: Vzorky jsme zmrazili kapalným dusíkem a homogenizovali za přidání 1 ml fosfátového pufru (pH 6,8). Po centrifugaci jsme je inkubovali 15 min při 99°C. Jako standard jsme použili MT z králíčích jater (Sigma Aldrich). Analýzu jsme prováděli adsorptivní přenosovou technikou s diferenční pulzní voltametří na přístroji AUTOLAB Analyser (Eco-Chemie) ve spojení s VA-Stand 663 (Metrohm) v klasickém tříelektrodovém uspořádání. Pracovní elektrodou byla visící rtuťová kapková elektroda s plochou 0,4 mm²; referenční Ag/AgCl/3M KCl a pomocnou grafitová elektroda. AdTS DPV parametry byly následující: počáteční potenciál -0,6 V, konečný potenciál -1,6 V, modulační čas 0,057 s, časový interval 0,2 s, potenciálový krok 1,05 mV/s, modulační amplituda 250 mV, Eads = 0 V, teplota 5°C.

Výsledek a diskuze

U „mateřské“ senzitivní linie UKF-NB-4 jsme neprokázali významnější vzestup metalothioneinů v žádném z časových intervalů (1 – 72 hodin) při žádné testované koncentraci cisplatinu (0,01, 0,1 a 1,0 µg/ml) ani karboplatinu (0,1, 1,0 a 10 µg/ml). U linie rezistentní k cisplatině jsme prokázali indukci metalothioneinů jak po cisplatině tak po karboplatině. Poněkud odlišná byla dynamika hladin intracelulárních metalothioneinů – po cisplatině bylo maximum jejich vzestupu mezi 6 a 24 hodinou, u karboplatinu byl vzestup rychlejší – maximum jsme prokazovali již v první hodině. Nejvyšší indukci jsme prokázali po nejnižších dávkách cisplatinu (0,01 µg/ml) a karboplatinu (0,1 µg/ml). Maximální zvýšení hladin metalothioneinů po cisplatině bylo o dva řády, po karboplatině bylo asi padesátinásobné.

Naše výsledky ukazují, že průkaz metalothioneinů v biotickém vzorku nebude přinášet informace o rezistenci k platinovým cytostatikům, podstatnější jsou jejich změny po vystavení účinkům těchto léků. Rovněž nález nejvyšší indukce metalothioneinů nejnižšími (subterapeutickými) koncentracemi naznačuje, že vyšší dávky platinových cytostatik mohou být účinné i u nádorů se schopností exprimovat metalothioneiny. Tento paradoxní jev, kdy nejvyšší účinek na indukci tvorby metalothioneinů má nejnižší dávka cytostatika si vysvětlujeme toxickými účinky vyšších dávek, které buňky poškozují do té míry, že mají omezenou schopnost proteosyntézy.

Závěry

- 1) Ověřili jsme použitelnost elektrochemické metody pro stanovení metalothioneinů v buňkách.
- 2) Buňky neuroblastomové linie s experimentálně navozenou rezistencí k cisplatině mají zmožení 16q13-22, kde se nacházejí geny pro MT a neexprimují P-glykoprotein ani neamplifikují gen MDR-1 (Bedrníček et al, 2005). Tato linie je rezistentní k cisplatině i karboplatině. Inkubace po dobu pěti pasáží bez cisplatinu nesnižuje rezistenci k cisplatině ani ke karboplatině.
- 3) Buňky neuroblastomové linie rezistentní k cisplatině mají schopnost odpovídat na expozici cisplatinou a karboplatinou zvýšením hladin MT. Tato schopnost je u linie na cisplatinu senzitivní vyjádřena podstatně méně.

Práce vznikla za podpory MŠMT VZ č. 0021620813

Literatura

1. Andrews PA, Murphy MP, et al. Metallothionein-mediated cisplatin resistance in human ovarian carcinoma cells. *Cancer Chemother Pharmacol* 19: 149-154, 1987.
2. Bacolod MD, Johnson SP, et al. Mechanisms of Resistance to 1,3-Bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea in Human Medulloblastoma and Rhabdomyosarcoma *Molecular Cancer Therapeutics*, 1:727- 736, 2002.
3. Bedrníček J, Vicha A, et al. Characterization of drug-resistant neuroblastoma cell lines by comparative genomic hybridization. *Neoplasma* 52:415-9, 2005.
4. Ghoshal K, Jacob ST. Regulation of metallothionein gene expression. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 66, 357-384, 2001.
5. Gunes C, Heuchel R, et al. Embryonic lethality and liver degeneration in mice lacking the metal-responsive transcriptional activator MTF-1. *EMBO J* 17:2846- 2854, 1998.
6. Cherian MG, Jayasurya A et al. Metallothioneins in human tumors and potential roles in carcinogenesis. *Mutat Res* 533: 201-209, 2003.
7. Cherian MG, Apostolova MD. Nuclear localization of metallothionein during cell proliferation and differentiation. *Cell Mol Biol* 46: 347-356, 2000.
8. Jin R, Bay BH, et al. Metallothionein 1F mRNA expression correlates with histological grade in breast carcinoma. *Breast Cancer Res Treat* 66: 265-272, 2001.
9. Margoses M, Valle BC. A cadmium binding protein for equine kidney cortex. *J Am Chem Soc*, 79:4813-4814, 1957.

V A R I A

10. Miyashita H, Sato Y. Metallothionein 1 is a downstream target of vascular endothelial zinc finger 1 (VEZF1) in endothelial cells and participates in the regulation of angiogenesis. *Endothelium*, 12:163-70, 2005.
11. Nagel WW, Valle BL. Cell cycle regulation of metallothionein in human colonic cancer cells. *Proc Natl Acad Sci*, 92: 579-583, 1995.
12. Weinlich G, Eisendle K, et al. Metallothionein – overexpression as a highly significant prognostic factor in melanoma: a prospective study on 1270 patients. *Br J Cancer* 9 4: 835-841, 2006.