

TADEUSZ WŁOSTOWSKI

*Instytut Biologii filia UW w Białymstoku
Świerkowa 20B, 15-950 Białystok*

METALOTIONEINA A PODZIAŁ KOMÓRKI

WSTĘP

Metalotioneinę (MT) po raz pierwszy odkryto w korze nerki końskiej jako małowczątkowe białko zawierające kadm (MARGOSHES, VALLEE 1957). Mimo upływu już prawie 40 lat od odkrycia MT, jej dokładna funkcja pozostaje ciągle nie znana. Z dotychczasowych badań wynika, że MT może być białkiem wielofunkcyjnym — co wiąże się najprawdopodobniej z obecnością licznych grup sulfhydrylowych w cząsteczce tego białka (BREMNER i BEATTIE 1990). Tak więc sugeruje się udział MT między innymi w detoksykacji metali ciężkich, takich jak kadm i rtęć, oraz w metabolizmie cynku i miedzi (PIOTROWSKI i MOGILNICKA 1976; BREMNER i BEATTIE 1990). Istnieją dane doświadczalne wskazujące na to, że białko to może być również jednym ze składników systemu antyoksydacyjnego komórki, funkcjonującego jako tak zwany zmiatacz wolnych rodników (SATO i BREMNER 1993). Badania ostatnich lat sugerują także, że MT może uczestniczyć w podziale komórki. Tej ostatniej funkcji jest poświęcony w głównej mierze niniejszy artykuł.

CHARAKTERYSTYKA METALOTIONEINY

Cechą charakterystyczną struktury pierwszorzędowej MT są powtórzone sekwencje aminokwasowe Cys-X-Cys oraz Cys-Cys. Reszty cysteinowe stanowią około 30% wszystkich reszt aminokwasowych, wśród których brak jest aminokwasów aromatycznych (KÄGI i SCHÄFFER 1988). Ze względu na różny stopień pokrewieństwa z MT końską, którą traktuje się jako standardową, wyróżniono trzy klasy tego białka (FOWLER i współaut. 1987). Klasa I obejmuje białka o dużym stopniu homologii właśnie z MT końską. Należy tutaj MT wszystkich kręgowców, a także niektórych bezkręgowców, na przykład krabów, *Drosophila*, mięczaków oraz MT niektórych grzybów. Przyjmuje się, że klasa I miała wspólnego przodka, który charakteryzował się strukturą zbliżoną do MT z *Neurospora crassa* (MÜNGER i współaut. 1985). Białko to składa się jedynie z 25 aminokwasów i strukturalnie oraz funkcjonalnie odpowiada połowie MT od końca N u innych organizmów. Klasa II obejmuje białka o niskim stopniu pokrewieństwa z MT

końską. MT zaliczoną do klasy II stwierdzono między innymi u nicieni, szkarłupni, drożdży, sinic i roślin okrytonasiennych. Przypuszcza się, że białko to powstało niezależnie od MT klasy I. Klasa III obejmuje polipeptydy składające się z podjednostek γ -glutamylcysteinowych i występuje głównie u grzybów i roślin obok MT klasy I lub II.

Klasa I MT charakteryzuje się znacznym polimorfizmem. W tkankach kręgowców zwykle występują dwie izoformy MT oznaczane jako I i II, kodowane przez dwa różne geny i różniące się pojedynczym ładunkiem elektrycznym (KÄGI i SCHÄFFER 1988). Jednak u niektórych gatunków ptaków, płazów i ryb występuje tylko jedna forma MT. Ostatnio u człowieka i myszy wykryto trzecią izoformę MT, występującą tylko w mózgu (w astrocytach), która składa się z 68 aminokwasów i jest o 7 aminokwasów dłuższa od izoformy I i II (PALMITER i współaut. 1992).

Pod względem strukturalnym i funkcjonalnym MT klasy I składa się z dwóch różnych domen; domeny β , obejmującej łańcuch polipeptydowy od pierwszego do trzydziestego aminokwasu od końca N oraz z domeny α , obejmującej łańcuch od końca C. U *N. crassa* występuje tylko domena β (MÜNGER i współaut. 1985, KÄGI i SCHÄFFER 1988, BREMNER i BEATTIE 1990).

Domena β wiąże 3 atomy kadmu lub cynku, natomiast domena α wiąże 4 atomy tych pierwiastków. W wiązaniu metali uczestniczą wszystkie grupy sulfhydrylowe reszt cysteinowych. Badania nad rekonstytucją tioneiny — a więc białka pozbawionego metali, wykazały ponadto, że domena β wykazuje szczególne powinowactwo do jonów miedzi, wiążąc 6 atomów tego pierwiastka, natomiast domena α preferuje wiązanie kadmu i cynku, chociaż przy nadmiarze jonów miedzi wokół cząsteczki, kadm i cynk mogą być wypierane i zastępowane przez miedź. MT grzybów wiąże *in vivo* tylko jony miedzi, co funkcjonalnie odpowiada domenie β u ssaków (KÄGI i SCHÄFFER 1988, BREMNER i BEATTIE 1990).

Obecność dwu odmiennych strukturalnie i funkcjonalnie domen potwierdzają także badania nad strukturą genu MT. Gen strukturalny MT jest genem mozaikowym, składającym się z 3 eksonów i 2 intronów (HAMER 1986, KÄGI i SCHÄFFER 1988). Eksony I i II łącznie kodują sekwencje aminokwasów domeny β , natomiast ekson III koduje całą domenę α . Okazało się, że krótki łańcuch MT z *N. crassa* również jest kodowany przez dwa eksony, co potwierdza bliskie pokrewieństwo MT tych grzybów z domeną β kręgowców (MÜNGER i współaut. 1985).

EKSPRESJA GENU METALOTIONEINY

Szczególną własnością MT jest jej indukowalność. Już na początku lat sześćdziesiątych wykazano, że kadm indukuje syntezę MT w wątrobie ssaków (PISCATOR 1964). Późniejsze badania w pełni potwierdziły to pierwsze spostrzeżenie. W wielu laboratoriach udowodniono, że oprócz kadmu syntezę MT indukują także inne metale, na przykład cynk, miedź, rtęć, srebro, bizmut (KÄGI i SCHÄFFER 1988, BREMNER i BEATTIE 1990). Poza metalami syntezę tego białka stymulują także niektóre hormony, takie jak glukokortykoidy i katecholaminy, jak również szereg czynników związanych ściśle z układem odpornościowym

i stanem zapalnym, na przykład interleukina 1, interleukina 6, endotoksyna (HAMER 1986).

Stosując inhibitory syntezy RNA (na przykład aktynomycyna D) i białka (cykloheksimid) wykazano, że kontrola syntezy MT odbywa się na poziomie transkrypcji. Założono więc, że induktor, na przykład metal, wiąże się ze swoistym jądrowym czynnikiem regulującym, tak zwanym *trans*-aktywującym, po czym powstały kompleks rozpoznaje określoną sekwencję nukleotydów w promotorze, zwaną *cis*-aktywującą, inicjując w ten sposób transkrypcję genu MT (HAMER 1986). Istotnie, w regionie promotorowym genu MT wykryto charakterystyczne sekwencje nukleotydowe MRE wrażliwe na metale ciężkie (ang. metal responsive element). Podstawowa sekwencja MRE składa się z siedmiu nukleotydów (TGCA/GCNC) i jest konserwatywna ewolucyjnie (STUART i współaut. 1985). Sekwencje te mogą występować w jednym promotorze w kilku kopiach. Poza sekwencjami MRE w regionie promotorowym MT wykryto również swoiste sekwencje wiążące glukokortykoidy połączone z receptorem (GRE) oraz miejsca wiążące czynniki transkrypcji, takie jak SP-1, AP-1 i AP-2 (KOIZUMI i współaut. 1991).

Ostatnio podjęto również próbę zidentyfikowania i scharakteryzowania jądrowych czynników *trans*-aktywujących, oddziałujących swoiście z sekwencjami MRE w regionie promotorowym. Najlepiej poznanymi czynnikami są ACE1 u drożdży *Saccharomyces cerevisiae* i AMT1 u *Candida glabrata* (BUCHMANN i współaut. 1989, THIELE 1992, ZHOU i współaut. 1992). W obu przypadkach jest to białko zawierające na końcu N 11 reszt cysteinowych, które wiążą 6 atomów miedzi. To wiązanie miedzi powoduje taką zmianę konformacyjną białka, że staje się możliwa jego interakcja z DNA w promotorze. Również w komórkach zwierzęcych stwierdzono jądrowe czynniki regulujące (MRP, MRF, MTF-1, MBF-1, MEP-1, ZRF, p39), które do swej aktywności wymagają albo jonów cynku, albo kadmu (IMBERT i współaut. 1989, ANDERSEN i współaut. 1990, KOIZUMI i współaut. 1992, LABBE i współaut. 1993). Jak dotąd w komórkach zwierzęcych, w przeciwieństwie do drożdży, nie stwierdzono czynników *trans*-aktywujących, oddziałujących swoiście z jonami miedzi. Dotychczasowe badania wskazują, że w komórkach zwierzęcych i ludzkich najprawdopodobniej występują różnorodne czynniki regulujące, zarówno swoiste tkankowo, jak i swoiste dla poszczególnych izoform MT oraz poszczególnych jonów metali.

METALOTIONEINA JAKO BIAŁKO CYKLU KOMÓRKOWEGO

Ostatnie badania przypisują istotną, jeśli nawet nie nadrzędną rolę kinazie białkowej C w modulowaniu poziomu MT w komórce (GARRET i współaut. 1992, XIONG i współaut. 1992, ARIZONO i współaut. 1993). Wiele danych eksperymentalnych wskazuje, że kinaza białkowa C moduluje poziom MT w komórce poprzez indukcję i modyfikację chemiczną dwóch białek kodowanych przez proto-onkogeny komórkowe *c-fos* i *c-jun*, dla których w promotorze genu MT wykryto swoiste sekwencje wiążące heterodimer składający się z białka Fos i Jun, a określany jako czynnik transkrypcyjny AP-1 (na przykład LEE i współaut. 1987, BAUKNECHT i współaut. 1993). Przyjmuje się, że to właśnie określone aktywatory kinazy

białkowej C są odpowiedzialne za intensywną syntezę MT obserwowaną, na przykład, w wątrobie ssaków w okresie ich rozwoju płodowego i postnatalnego oraz w regenerującej wątrobie osobników dorosłych (TOHYAMA i współaut. 1993). Okazało się ponadto, że w warunkach fizjologicznych, a więc przy braku określonego zewnętrznego induktora, MT jest syntetyzowana głównie w komórkach przechodzących przez cykl mitotyczny, na przykład w spermatogoniach nabłonka płciowego, w komórkach nabłonkowych rogówki, siatkówki i jelita cienkiego (NISHIMURA i współaut. 1989a, b, 1990, 1991). Badania te jednocześnie wykazały, że ilość MT, mierzona intensywnością reakcji immunohistochemicznej, jest zależna od częstości, z jaką dzielą się komórki. Komórki dzielące się rzadko zawierają mniej tego białka niż komórki dzielące się częściej; komórki znajdujące się w fazie spoczynkowej G_0 w ogóle nie wykazują obecności MT (NISHIMURA i współaut. 1991).

Stosując metody immunohistochemiczne wykazano ponadto istotne zróżnicowanie w wewnątrzkomórkowym rozmieszczeniu tego białka. Na przykład, w wątrobie noworodków szczurzych i ludzkich MT znajduje się nie tylko w cytoplazmie, lecz także w jądrach komórkowych (PANEMANGALORE i współaut. 1983, NARTEY i współaut. 1987a). Podobnie w większości komórek regenerującej wątroby białko to podlega przemieszczeniu do jądra komórkowego już po 3 godzinach od momentu częściowej hepatektomii (TOHYAMA i współaut. 1993). Celem bliższego poznania związku pomiędzy MT a cyklem komórkowym, TSUJIKAWA i współpracownicy (1991) stymulowali hepatocyty w hodowli pierwotnej za pomocą nabłonkowego czynnika wzrostu (EGF) i insuliny a następnie techniką immunofluorescencji pośredniej śledzili ewentualne zmiany lokalizacji tego białka wewnątrz komórek. Okazało się, że MT w fazie G_1 jest obecna przede wszystkim w cytoplazmie hepatocytów, podczas gdy na początku fazy S znajduje się głównie w jądrze komórkowym. W szczytowym okresie fazy S białko to ponownie znajdowało się w cytoplazmie. Dane te wyraźnie wskazują, że MT może pełnić określoną rolę w podziale komórki, zwłaszcza na granicy fazy G_1 /S cyklu komórkowego.

Badania z zastosowaniem technik immunohistochemicznych, jakkolwiek bardzo ważne, nie dostarczyły jednak informacji dotyczącej, na przykład, formy w jakiej MT występuje na terenie cytoplazmy i jądra komórkowego, a więc czy tworzy ona kompleks z cynkiem, miedzią czy też z obydwoma tymi pierwiastkami oraz jaką pełni tam funkcję. Odpowiedź na to pytanie, przynajmniej częściową, przyniosły badania biochemiczne. Już w 1978 roku wykazano, że MT obecna w cytoplazmie komórek regenerującej wątroby tworzy kompleks z cynkiem (OHTAKE i współaut. 1978). Podobnie w szybko rosnącej wątrobie płodu i noworodków szczurzych i ludzkich z MT znajdującą się w cytoplazmie jest związany głównie cynk z domieszką miedzi (MASON i współaut. 1980; RIORDAN i RICHARDS 1980, KLEIN i współaut. 1991), przy czym u świnki morskiej, chomika syryjskiego i cieląt ten stosunek jest odwrotny (HARTMAN i WESER 1977, BAKKA i WEBB 1981, LUI 1987). W nowszych badaniach okazało się, że skład pierwiastkowy MT, jak również jej rozmieszczenie wewnątrzkomórkowe mogą podlegać istotnym zmianom podczas rozwoju pre- i postnatalnego ssaków. Na przykład, w wątrobie nornicy rudej wykazano, że w cytoplazmie MT tworzy kompleks głównie z cynkiem, przy czym stężenie tego kompleksu gwałtownie maleje pomiędzy

1 a 5 dniem po urodzeniu (WŁOSTOWSKI 1992). Ten zanik MT cytoplazmatycznej ma miejsce akurat w momencie poprzedzającym intensywny wzrost wątroby oraz w okresie gwałtownego wzrostu stężenia miedzi w jądrach komórkowych, przy równoczesnym obniżeniu stężenia tego pierwiastka w cytoplazmie. Stwierdzono jednocześnie, że większość MT znikającej z cytoplazmy pomiędzy 1 a 3 dniem po urodzeniu została zmagazynowana w jądrach komórkowych, przy czym białko to na terenie jądra komórkowego tworzyło kompleks głównie z miedzią, co wskazuje, że nastąpiła wymiana cynku na miedź w cząsteczce MT albo podczas translokacji, albo na terenie jądra komórkowego.

Biorąc pod uwagę powyższe dane oraz wyniki badań TSUJIKAWA i współpracowników (1991) można przypuszczać, że podstawową funkcją MT w podziale komórki jest transport jonów miedzi z cytoplazmy do jądra komórkowego na granicy fazy G₁/S cyklu komórkowego (WŁOSTOWSKI 1993). Z kolei jony miedzi nagromadzone w ten sposób w jądrze komórkowym mogą uczestniczyć w syntezie DNA jądrowego, ponieważ, jak wskazują dotychczasowe badania, niedobór tego pierwiastka powoduje zahamowanie inkorporacji [³H]-tymidyny (LUKASIEWICZ i PROHASKA 1983, DAVIS i współaut. 198, KRAMER i współaut. 1988). Jakkolwiek dokładna rola jonów miedzi w syntezie DNA jądrowego pozostaje problemem otwartym, to jednak można przypuszczać, że jedną z możliwych funkcji miedzi w tym procesie jest denaturacja podwójnej spirali DNA w miejscu inicjacji widełek replikacyjnych. Dotychczasowe badania wskazują bowiem, że spośród jonów metali jedynie jony miedzi powodują dysocjację podwójnej spirali DNA na dwa pojedyncze łańcuchy (przegląd SZKOLNIK 1980, LIPPERT 1992). Ze względu jednak na tę właściwość miedzi, nie jest pożądana obecność zbyt dużych ilości wolnych jonów tego pierwiastka na terenie jądra komórkowego. Na szczęście większość jonów miedzi na terenie jądra komórkowego jest właśnie związana z MT (RIORDAN i RICHARDS 1980, WŁOSTOWSKI 1992).

Ponieważ jony miedzi związane z tym białkiem tracą swoją reaktywność chemiczną (THIELE i współaut. 1986), nie można więc wykluczyć, że podstawową funkcją MT obecnej w jądrze komórkowym jest wiązanie i detoksykacja nadmiernej ilości wolnych jonów tego metalu. Mówiąc o funkcji MT na terenie jądra komórkowego, nie sposób pominąć poglądu niektórych autorów, sugerujących udział tego białka przede wszystkim w zaopatrywaniu niektórych enzymów w cynk (MESKEL i współaut. 1993), oraz w usuwaniu jonów tego pierwiastka z czynników transkrypcyjnych, regulujących ekspresję określonych genów (ZENG i współaut. 1991). Jak widać, dokładna funkcja fizjologiczna MT na terenie jądra komórkowego na granicy fazy G₁/S cyklu komórkowego budzi jeszcze wiele wątpliwości i wymaga dalszych badań.

METALOTIONEINA A NOWOTWORY

Komórki nowotworowe charakteryzują się wysoką częstością podziałów, dlatego też można oczekiwać, że również w tych komórkach powinna występować MT, której poziom jest regulowany głównie przez produkty proto-onkogenów komórkowych *c-fos* i *c-jun*. Istotnie, duże ilości MT znaleziono w komórkach nowotworów tarczycy (NARTEY i współaut. 1987b), pęcherza moczowego (BAHN-

SON i współaut. 1991), piersi (SCHMID i współaut. 1993) i skóry (ZELGER i współaut. 1993) u człowieka. Podobnie jak w komórkach normalnych, również w przypadku komórek rakowych wykazano istotne zróżnicowanie w wewnątrzkomórkowym rozmieszczeniu tego białka. Na przykład, w komórkach wymienionych nowotworów MT znaleziono zarówno w cytoplazmie, jak i w jądrach komórkowych. Rodzi się przy tym pytanie, jaka jest funkcja fizjologiczna MT w cytoplazmie i jądrze komórkowym oraz jaki jest jej ewentualny wpływ na skuteczność terapii nowotworów.

O ile nie ma jeszcze dokładnej odpowiedzi na pierwszą część pytania — można jedynie przypuszczać, że funkcja ta jest identyczna z funkcją jaką pełni MT w komórkach zdrowych przechodzących przez cykl mitotyczny (poprzedni rozdział) — o tyle uzyskano już w dużym stopniu odpowiedź na drugą część powyższego pytania. Badania ostatnich lat wyraźnie wskazują, że wraz ze wzrostem stężenia tego białka w komórkach nowotworów maleje szansa wyleczenia choroby nowotworowej chemio- i radioterapią (KASAHARA i współaut. 1991, CHERIAN i współaut. 1993, ZELGER i współaut. 1993). Innymi słowy MT obecna w komórkach rakowych czyni je opornymi na leki przeciwnowotworowe. Oporność ta polega najprawdopodobniej na wiązaniu chemicznych środków przeciwnowotworowych przez MT, takich jak cisplatyna, dzięki czemu tracą one swoją reaktywność (KASAHARA i współaut. 1991, CHERIAN i współaut. 1993, SATOH i współaut. 1993a). Ponadto przypuszcza się, że oporność ta może polegać na inaktywacji przez to białko wolnych rodników generowanych w komórce przez leki przeciwnowotworowe i naświetlanie. Na domiar złego okazało się, że same środki antyrakowe indukują syntezę MT w komórkach nowotworowych, przyczyniając się do zwiększenia ich oporności (WOOD i współaut. 1993). Aby przełamać tę oporność należy więc stosować coraz większe dawki leku, które niestety wywołują na ogół ujemne skutki uboczne w postaci uszkodzenia zdrowych tkanek, głównie nerek, serca i szpiku kostnego a nawet indukują proces nowotworzenia w tych tkankach (NAGANUMA i współaut. 1987, 1988, KALDOR i współaut. 1988, SATOH i współaut. 1988, 1993b). Jest to poważna przeszkoda w skutecznej terapii nowotworów. Idealnym sposobem leczenia choroby nowotworowej byłoby zlikwidowanie MT w komórkach nowotworowych a zwiększenie jej poziomu w komórkach normalnych tak, aby białko to chroniło komórki zdrowe przed toksycznym oddziaływaniem leków przeciwnowotworowych, a nie czyniło tego w przypadku komórek rakowych. Ostatnie wyniki badań są pełne optymizmu zrealizowania tej właśnie idei. Wykazano mianowicie, na razie tylko u zwierząt laboratoryjnych, że propargylglicyna, będąca inhibitorem szlaku syntezy cysteiny, skutecznie hamuje syntezę MT w komórkach rakowych, nie wywierając jednocześnie ujemnego wpływu na indukcję syntezy tego białka, na przykład przez cynk w nerkach (SATOH i współaut. 1993a). Wykazano ponadto, że sole bizmutu indukują syntezę MT w sercu i nerkach, lecz nie stymulują jej produkcji w nowotworach (NAGANUMA i współaut. 1987, 1988). Jak dotąd, nie jest znana przyczyna tak odmiennego, lecz korzystnego dla pacjenta, reagowania nowotworów i tkanek normalnych na traktowanie ich propargylglicyną i solami bizmutu. Dzięki zastosowaniu propargylglicyny, soli cynku i cisplatyny udało się w dużym stopniu zniszczyć raka pęcherza moczowego u myszy laboratoryjnej,

nie wywołując przy tym zaburzeń w funkcji zdrowych tkanek (SATO i współaut. 1993a).

Wykorzystując ten właśnie sposób manipulowania zawartością MT w komórkach rakowych i zdrowych można nawet zastosować w chemioterapii bardziej zabójcze leki przeciwnowotworowe niż stosowane dotychczas. Jednym z kandydatów tego typu leków jest kadm (WAALKES i współaut. 1993). Należy jednak podkreślić, że jest to metal bardzo toksyczny tylko w stosunku do tych komórek, które w cytoplazmie nie zawierają MT. Obecność MT w komórce sprawia zaś, że kadm jest silnie wiązany przez to białko, dzięki czemu traci on swoją reaktywność (PIOTROWSKI i MOGILNICKA 1976, KÄGI i SCHÄFFER 1988). Zwiększając więc poziom MT w komórkach zdrowych a zmniejszając jej stężenie w komórkach nowotworowych przy użyciu, na przykład propargylglicyny i soli bizmutu, i podając następnie odpowiednią dawkę kadmu, jedynie komórki rakowe powinny ulec zniszczeniu. Tego rodzaju chemioterapię z użyciem kadmu jako leku przeciwnowotworowego zastosowano z powodzeniem w przypadku raka płuc u myszy laboratoryjnej (WAALKES i współaut. 1993). Autorzy cytowanych prac sugerują zastosowanie propargylglicyny i soli bizmutu także w chemioterapii niektórych chorób nowotworowych u człowieka i być może na pierwsze wyniki nie trzeba będzie zbyt długo czekać.

Reasumując, metalotioneina, której dokładna funkcja fizjologiczna w podziale komórki nie jest jeszcze poznana, okazała się być dużą przeszkodą w skutecznej terapii nowotworów. Im wyższy jest bowiem poziom tego białka w komórkach rakowych, tym gorsza jest prognoza dla pacjenta. Należy jednak mieć nadzieję, że myśl ludzka pokona niebawem i tę przeszkodę.

METALLOTHIONEIN AND CELL PROLIFERATION

Summary

Metallothionein (MT) is a low-molecular weight, cysteine-rich, metal-binding protein found in a variety of organisms, from the animal and plant kingdoms, to fungi and some prokaryotes. MT exhibits a strong affinity for, and is inducible by, various metals (cadmium, zinc, copper, mercury, bismuth) and hormones, as well as by some nonmetallic chemicals and physical stress.

The MT protein has been implicated in the detoxification of toxic metals, in the metabolism of zinc and copper, as well as in the scavenging of free radicals; MT can also be involved in cell proliferation.

Certain tumour types have a high content of MT. Although the exact physiological role of MT in rapidly proliferating tumour cells is unknown, the protein appears to be responsible for an acquired anticancer multidrug resistance.

LITERATURA

- ANDERSEN R. D., TAPLITZ S. J., OBERBAUER A. M., CALOME K. L., HERSCHMAN H. R., 1990. *Metal-dependent binding of nuclear factor to the rat metallothionein-I promoter*. Nucl. Acids Res. 18, 6049-6050.
- ARIZONO K., PETERSON K. L., BRADY F. O., 1993. *Inhibitors of Ca^{2+} channels, calmodulin and protein kinases prevent A23187 and other inductions of metallothionein mRNA in EC3 rat hepatoma cells*. Life Sci. 53, 1031-1037.
- BAHNSON R. R., BANNER B. F., ERNSTOFF M. S., LAZO J. S., CHERIAN M. G., BANERJEE D., CHIN J. L., 1991. *Immunohistochemical localization of metallothionein in transitional cell carcinoma of the bladder*. J. Urol. 146, 1518-1520.

- BAKKA A., WEBB M., 1981. *Metabolism of zinc and copper in the neonates: changes in the concentrations and contents of thionein-bound Zn and Cu with age in the liver of the newborn of various mammalian species*. *Biochem. Pharmacol.* 30, 721-725.
- BAUKNECHT T., ANGEL P., KOHLER M., KOMMOSS F., BIRMELIN F., PFLEIDERER A., WAGNER E., 1993. *Gene structure and expression analysis of the epidermal growth factor receptor, transforming growth factor- α , myc, jun, and metallothionein in human ovarian carcinomas*. *Cancer* 71, 419-429.
- BREMNER I., BEATTIE J. H., 1990. *Metallothionein and the trace minerals*. *Annu. Rev. Nutr.* 10, 63-83.
- BUCHMANN C. P., SKROCH J., WELCH J., FOGEL S., KARIN M., 1989. *The CUP2 gene product, regulator of yeast metallothionein expression, is a copper-activated DNA-binding protein*. *Mol. Cell. Biol.* 9, 4091-4095.
- CHERIAN M. G., HUANG P. C., KLAASSEN C. D., LIU Y. P., LONGFELLOW D. G., WAALKES M. P., 1993. *National Cancer Institute workshop on the possible roles of metallothionein in carcinogenesis*. *Cancer Res.* 53, 992-925.
- DAVIS M. A., JOHNSON W. T., BRISKE-ANDERSON M., KRAMER T. R., 1987. *Lymphoid cell functions during copper deficiency*. *Nutr. Res.* 7, 211-222.
- FOWLER B. A., HILDERBRAND C. E., KOJIMA Y., WEBB M., 1987. *Nomenclature of metallothionein*. *Experientia (suppl.)* 52, 19-22.
- GARRET S. H., XIONG X., ARIZONO K., BRADY F. O., 1992. *Phorbol ester induction of rat hepatic metallothionein in vivo and in vitro*. *Int. J. Biochem.* 24, 1669-1676.
- HAMER D., 1986. *Metallothionein*. *Ann. Rev. Biochem.* 55, 913-951.
- HARTMANN H. J., WESER U., 1977. *Copper-thionein from fetal bovine liver*. *Biochim. Biophys. Acta* 491, 211-216.
- MBERT J., ZAFARULLAH M., CULOTTA V. C., GEDAMU L., HAMER D., 1989. *Transcription factor MBF-I interacts with metal regulatory elements of higher eucaryotic metallothionein genes*. *Mol. Cell. Biol.* 9, 5315-5323.
- KÄGI J. H. R., SCHÄFFER A., 1988. *Biochemistry of metallothionein*. *Biochemistry* 27, 8509-8515.
- KALDOR J. M., DAY N. E., HEMMINKI K., 1988. *Quantifying the carcinogenicity of antineoplastic drugs*. *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.* 24, 703-711.
- KASAHARA K., FUJIWARA Y., NISHO K., OHMORI T., SUGIMOTO Y., KOMIYA K., MATSUDA T., SAJO N., 1991. *Metallothionein content correlates with the sensitivity of human small cell lung cancer cell lines to cisplatin*. *Cancer Res.* 51, 3237-3242.
- KLEIN D., SCHOLTZ P., DRASCH G. A., MÜLLER-HÖCKER J., SUMMER K. H., 1991. *Metallothionein, copper and zinc in fetal and neonatal human liver, changes during development*. *Toxicol. Lett.* 56, 61-67.
- KOIZUMI S., OTSUKA F., YAMADA H., 1991. *A nuclear factor that interacts with metal responsive elements of a human metallothionein gene*. *Chem. Biol. Interact.* 80, 145-157.
- KOIZUMI S., YAMADA H., SUZUKI K., OTSUKA F., 1992. *Zinc-specific activation of a HeLa cell nuclear protein which interacts with a metal responsive element of the human metallothionein-II gene*. *Eur. J. Biochem.* 210, 555-560.
- KRAMER T. R., JOHNSON W. T., BRISKE-ANDERSON M., 1988. *Influence of iron and the sex of rats on hematological, biochemical and immunological changes during copper deficiency*. *J. Nutr.* 118, 214-221.
- LABBE S., LAROCHE L., MAILHOT D., SEGUIN C., 1993. *Purification of mouse MEP-1, a nuclear protein which binds to the metal regulatory elements of genes encoding metallothionein*. *Nucl. Acids Res.* 21, 1549-1554.
- LEE W., HASLINGER A., KARIN M., TJAN R., 1987. *Activation of transcription by two factors that bind promoter and enhancer sequences of the human metallothionein gene and SV40*. *Nature* 325, 368-372.
- LIPPERT B., 1992. *From cisplatin to artificial nucleases — the role of metal ion-nucleic acid interactions in biology*. *BioMetals* 5, 195-208.
- LUI E. M. K., 1987. *Metabolism of copper and zinc in the liver and bone of the perinatal guinea-pig*. *Comp. Biochem. Physiol.* 86C, 173-183.
- LUKASIEWICZ O. A., PROHASKA J. R., 1983. *Lymphocytes from copper deficient mice exhibit decreased mitogen reactivity*. *Nutr. Res.* 3, 335-341.
- MARGOSHES M., VALLEE B. L., 1957. *A cadmium protein from equine kidney cortex*. *J. Am. Chem. Soc.* 79, 4813-4814.
- MASON R., BAKKA A., SAMARAWICKRAMA G. P., WEBB M., 1980. *Metabolism of zinc and copper in the neonates, accumulation and function of (Zn, Cu)-metallothionein in the liver of the newborn rat*. *Br. J. Nutr.* 45, 375-389.

- MESKEL H. H., CHERIAN M. G., MARTINEZ V. J., VEINOT L. A., FREI J. V., 1993. *Metallothionein as an epithelial proliferative compartment marker for DNA flow cytometry*. *Modern Pathol.* 6, 755-760.
- MÜNGER K., GERMAN U. A., LERCH K., 1985. *Isolation and structural organization of the Neurospora crassa copper metallothionein gene*. *EMBO J.* 4, 2665-2668.
- NAGANUMA A., SATOH M., IMURA N., 1987. *Prevention of lethal and renal toxicity of cis-diamminedichloroplatinum (II) by induction of metallothionein synthesis without compromising its antitumor activity in mice*. *Cancer Res.* 47, 983-987.
- NAGANUMA A., SATOH M., IMURA N., 1988. *Specific reduction of toxic side effects of Adriamycin by induction of metallothionein in mice*. *Jpn. J. Cancer Res.* 79, 406-411.
- NARTEY N. O., BANERJEE D., CHERIAN M. G., 1987a. *Immunohistochemical localization of metallothionein in cell nucleus and cytoplasm of fetal human liver and kidney and its changes during development*. *Pathology* 19, 233-238.
- NARTEY N. O., BANERJEE D., CHERIAN M. G., 1987b. *Immunohistochemical localization of metallothionein in human thyroid tumors*. *Am. J. Pathol.* 129, 177-182.
- NISHIMURA H., NISHIMURA N., TOHYAMA C., 1989a. *Immunohistochemical localization of metallothionein in developing rat tissues*. *J. Histochem. Cytochem.* 37, 715-722.
- NISHIMURA N., NISHIMURA H., TOHYAMA C., 1989b. *Localization of metallothionein in female reproductive organs of rat and guinea-pig*. *J. Histochem. Cytochem.* 37, 1601-1607.
- NISHIMURA H., NISHIMURA N., TOHYAMA C., 1990. *Localization of metallothionein in the genital organs of the male rat*. *J. Histochem. Cytochem.* 38, 927-933.
- NISHIMURA H., NISHIMURA N., KOBAYASKI S., TOHYAMA C., 1991. *Immunohistochemical localization of metallothionein in the eye of rats*. *Histochemistry* 95, 535-539.
- OHTAKE H., HASEGAWA K., KOGA M., 1978. *Zinc-binding protein in the livers of neonatal, normal and partially hepatectomized rats*. *Biochem J.* 174, 999-1005.
- PALMITER R. D., FINDLEY S. D., WHITMORE T. E., DURHAM D. M., 1992. *MT-III, a brain-specific member of the metallothionein gene family*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 6333-6337.
- PANEMANGALORE M., BANERJEE D., ONOSAKA S., CHERIAN M. G., 1983. *Changes in intracellular accumulation and distribution of metallothionein in rat liver and kidney during postnatal development*. *Dev. Biol.* 97, 95-102.
- PIOTROWSKI J. K., MOGILNICKA E. M., 1976. *Metallothioneina*. *Post. Biochem.* 22, 401-419.
- PISCATOR M., 1964. *On cadmium in normal human kidney together with a report on the isolation of metallothionein from livers of cadmium exposed rabbits*. *Nord. Hyg. Tidsk.* 45, 76-82.
- RIORDAN J. R., RICHARDS V., 1980. *Human fetal liver contains both zinc and copper-rich forms of metallothionein*. *J. Biol. Chem.* 255, 5380-5383.
- SATO M., BREMNER I., 1993. *Oxygen free radicals and metallothionein*. *Free Radical Biol. Med.* 14, 325-337.
- SATOH M., NAGANUMA A., IMURA N., 1988. *Involvement of cardiac metallothionein in prevention of Adriamycin induced lipid peroxidation in the heart*. *Toxicology* 53, 231-237.
- SATOH M., KLOTH D. M., KADHIM S. A., CHIN J. L., NAGANUMA A., IMURA N., CHERIAN M. G., 1993a. *Modulation of both cisplatin nephro-toxicity and drug resistance in murine bladder tumor by controlling metallothionein synthesis*. *Cancer Res.* 53, 1829-1832.
- SATOH M., KONDO Y., MITA M., NAKAGAWA I., NAGANUMA A., IMURA N., 1993b. *Prevention of carcinogenicity of anticancer drugs by metallothionein induction*. *Cancer Res.* 53, 4767-4768.
- SCHMID K. W., ELLIS I. O., GEE J. M. W., DARKE B. M., LEES W. E., KAY J., CRYER A., STARK J. M., HITTMAIR A., ČERNER D., DÖNSTER M., MARGREITER R., DAXENBICHLER G., NICHOLSON R. I., BIER B., BÖCKER W., JASANI B., 1993. *Presence and possible significance of immunocytochemically demonstrable metallothionein over-expression in primary invasive ductal carcinoma of the breast*. *Virchows Archiv. A. Pathol. Anat.* 422, 153-159.
- STUART G. W., SEARLE P. F., PALMITER R. D., 1985. *Identification of multiple metal regulatory elements in mouse metallothionein-1 promoter by assaying synthetic sequences*. *Nature* 317, 828-831.
- SZKOLNIK M., 1980. *Mikroelementy w życiu roślin*. PWRL, Warszawa, 411 str.
- THIELE D. J., 1992. *Metal-regulated transcription in eukaryotes*. *Nucl. Acids Res.* 20, 1183-1191.
- THIELE D. J., WALLING M. J., HAMER D., 1986. *Mammalian metallothionein is functional in yeast*. *Science* 231, 854-856.
- TOHYAMA C., SUZUKI J. S., HEMALRAAD J., NISHIMURA N., NISHIMURA H., 1993. *Induction of metallothionein and its localization in the nucleus of rat hepatocyte after partial hepatectomy*. *Hepatology* 18, 1193-1201.

- TSUJIKAWA K., IMAI T., KAKUTANI M., KAYAMORI Y., MIMURA T., OTAKI N., KIMURA M., FUKUYAMA R., SHIMIZU N., 1991. *Localization of metallothionein in nuclei of growing primary cultured adult rat hepatocytes*. FEBS Lett. 283, 239-242.
- WAALKES M. P., DIWAN B. A., WEGHORST C. M., WARD J. M., RICE J. M., CHERIAN M. G., GOYER R. A., 1993. *Further evidence of the tumor-suppressive effects of cadmium in the B6C3F1 mouse liver and lung: late stage vulnerability of tumors to cadmium and the role of metallothionein*. J. Pharmacol. Exp. Therap. 266, 1656-1663.
- WOOD D. P., KLEIN E., FAIR W. R., CHAGANTI R. S. K., 1993. *Metallothionein gene expression in bladder cancer exposed to cisplatin*. Modern Pathol. 6, 33-35.
- WŁOSTOWSKI T., 1992. *Postnatal changes in subcellular distribution of copper, zinc and metallothionein in the liver of bank vole (Clethrionomys glareolus): a possible involvement of metallothionein and copper in cell proliferation*. Comp. Biochem. Physiol. 103C, 285-290.
- WŁOSTOWSKI T., 1993. *Involvement of metallothionein and copper in cell proliferation*. BioMetals 6, 71-76.
- XIONG X., ARIZONO K., GARRETT S. H., BRADY F. O., 1992. *Induction of zinc metallothionein by calcium ionophore in vivo and in vitro*. FEBS Lett. 299, 192-196.
- ZELGER B., HITTMAIR A., SCHIR M., ÖFNER C., ÖFNER D., FRITSCH P. O., BÖCKER W., JASANI B., SCHMID K. W., 1993. *Immunohistochemically demonstrated metallothionein expression in malignant melanoma*. Histopathology 23, 257-264.
- ZENG J., HEUCHEL R., SCHAFFNER W., KÄGI J. H. R., 1991. *Thionein (apometallothionein) can modulate DNA binding and transcription activation by zinc finger containing factor Sp1*. FEBS Lett. 279, 310-312.
- ZHOU P., SZCZYPKA M. S., SOSINOWSKI T., THIELE D. J., 1992. *Expression of a yeast metallothionein gene family is activated by a single metalloregulatory transcription factor*. Mol. Cell. Biol. 12, 3766-3775.