Struktura i funkcija metalotioneina

Poljak, Karolina

Undergraduate thesis / Završni rad

2018

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Department of biology / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Odjel za biologiju**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:181:670427

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-21**

ODJEL ZA BIOLOGIJU
Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Repository / Repozitorij:

Repository of Department of biology, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek

zir.nsk.hr

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Sveučilište J.J. Strossmayera u Osijeku
Odjel za biologiju
Preddiplomski studij biologije

Karolina Poljak

Struktura i funkcija metalotioneina

Završni rad

Osijek, 2018.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA **Završni rad**

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Odjel za biologiju
Preddiplomski sveučilišni studij Biologija
Znanstveno područje: Prirodne znanosti
Znanstveno polje: Biologija

STRUKTURA I FUNKCIJA METALOTIONEINA

Karolina Poljak

Rad je izrađen: Zavod za biokemiju i ekofiziologiju biljaka

Mentor: Dr.sc. Rosemary Vuković**,** doc.

Kratak sažetak: Metalotioneini (MT) su unutarstanični proteini male molekulske mase koji zbog visokog sadržaja cisteina imaju visok afinitet za vezanje teških metala. Imaju specifičan aminokiselinski sastav, koji uključuje mnogo cisteina, i pretežno bez aromatskih aminokiselina i histidina. Prisutni su kod prokariota i eukariota, a u biljkama i sisavcima podijeljeni su u četiri skupine: MT-1, MT-2, MT-3 i MT-4). MT štite stanice i organe od trovanja kadmijem i drugim teškim metalima, služe kao antioksidansi, antiupalni i antiapoptotički čimbenici, te služe kao zaštita od oksidacijskog stresa. Prekomjerna ekspresija MT-a povezana je sa starenjem te može dovesti do mnogih bolesti poput raka, dijabetesa i raznih neurodegenerativnih bolesti.

Jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi: metalotioneini, teški metali, kadmij, cink, neurodegenerativne bolesti

Rad je pohranjen: na mrežnim stranicama Odjela za biologiju te u Nacionalnom repozitoriju završnih i diplomskih radova Nacionalne i sveučilišne knjižnice u Zagrebu.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek

Department of Biology

Undergraduate university study programme in Biology

Scientific Area: Natural sciences

Scientific Field: Biology

STRUCTURE AND FUNCTION OF METALLOTHIONEINS

Karolina Poljak

Thesis performed at: Subdepartment of plant ecophysiology and biochemistry

Supervisor: dr.sc. Rosemary Vuković, PhD, Asst. Prof.

Short abstract: Metallothioneins (MT) are intracellular low molecular weight proteins that, due to their high cysteine content, have high affinity for heavy metal binding. They have a specific amino acid composition, that includes many cysteines, mostly with no aromatic amino acids or histidine. They are present in prokaryotes and eukaryotes, and in plants and mammals, they are divided into four groups: MT-1, MT-2, MT-3 and MT-4. Metallothioneins are preventing cells and organs toxicity induced by cadmium and other metal ions, they can haveantioxidative, anti-inflammatory and antiapoptotic factors and can protect against oxidative stress. Excessive metallothionein expression is associated with ageing and can lead to many diseases such as cancer, diabetes, and various neurodegenerative diseases.

Original in: Croatian

Key words: metallothioneins, heavy metals, cadmium, zinc, neurodegenerative diseases

Thesis deposited: on the Department of Biology website and the Croatian Digital Theses Repository of the National and University Library in Zagreb.

KRATICE

MT - metalotioneini

Cys - cistein

His - histidin

Tyr - tirozin

Phe - fenilalanin

Lys - lizin

NMR – nuklearna magnetna rezonanca

Cd – kadmij

Zn - cink

Cu - bakar

ROS – reaktivne kisikove tvari

SOD - superoksid-dismutaza

RNS - reaktivne dušikove tvari

SADRŽAJ

1. UVOD 6
2. STRUKTURA METALOTIONEINA 7
2.1. STRUKTURA METALOTIONEINA KOD BILJAKA 7
2.2. STRUKTURA METALOTIONEINA KOD SISAVACA 8
3. FUNKCIJA METALOTIONEINA 10
3.1. DETOKSIKACIJA METALNIH IONA 10
3.2. METALOTIONEINI SPRJEČAVAJU STANIČNU TOKSIČNOST UZROKOVANU IONIMA Cd 10
3.3. METALOTIONEINI SPRJEČAVAJU STANIČNU TOKSIČNOST DRUGIM IONIMA 12
3.4. ULOGA METALOTIONEINA U UVJETIMA OKSIDACIJSKOG STRESA 13
3.5. METALOTIONEINI I PROLIFERACIJA STANICA 15
3.6. METALOTIONEINI KAO ANTIOKSIDANSI 15
3.7. METALOTIONEINI KAO ANTIAPOPTOTIČKI I ANTIUPALNI FAKTOR 16
4. EKSPRESIJA GENA METALOTIONEINA I REGULACIJA SINTEZE 16
5. METODE MJERENJA METALOTIONEINA 18
6. METALOTIONEINI I BOLESTI 19
6.1. METALOTIONEINI I STARENJE 19
6.2. METALOTIONEINI I NEURODEGENERATIVNE BOLESTI 19
6.3. METALOTIONEINI I RAK 20
6.4. METALOTIONEINI I DIJABETES 20
7. ZAKLJUČAK 22
8. LITERATURA 23

1. UVOD

Metalotioneini (MT) su neenzimski, unutarstanični proteini male molekulske mase koji vežu metale. Bogati su cisteinom (Cys), ali ne sadrže histidin (His). Zbog visokog sadržaja metala i slučajne bioorganske strukture klasificirani su kao metaloproteini. Imaju visok afinitet za vezanje kationa, tako vežu esencijalne (cink - Zn, bakar - Cu, selen - Se) i neesencijalne (kadmij - Cd, živu - Hg, srebro - Ag, arsen - As) teške metale pomoću tiolnih skupina Cys ostataka, koji mogu činiti i do 30 % aminokiselinskog sadržaja pojedinog proteina (Shamsi i Fatima 2014).

Godine 1957. izolirani su prvi MT iz kore bubrega konja (Margoshes i Vallee 1957). Prisutni su kod prokariota i eukariota te su pronađeni u mnogim tkivima različitih vrsta kralježnjaka i beskralježnjaka (većinom mekušaca i rakova). Biološke uloge MT-a još uvijek nisu u potpunosti određene. S obzirom na kapacitet za vezanje metala smatra se da imaju ulogu u kontroli homeostaze esencijalnih metala (prije svega Cu i Zn) koje otpuštaju kada su potrebni enzimima i u drugim metaboličkim ulogama. Neesencijalni metali mogu istisnuti esencijalne metale iz veznih mjesta MT-a te je primijećeno da povećana indukcija MT-a pojačava toleranciju organizma na toksične teške metale. Stoga se smatra da su MT, također uključeni i u detoksikaciju viška esencijalnih i neesencijalnih metala u organizmu (Wang i sur. 2014).

2. STRUKTURA METALOTIONEINA

2.1. STRUKTURA METALOTIONEINA KOD BILJAKA

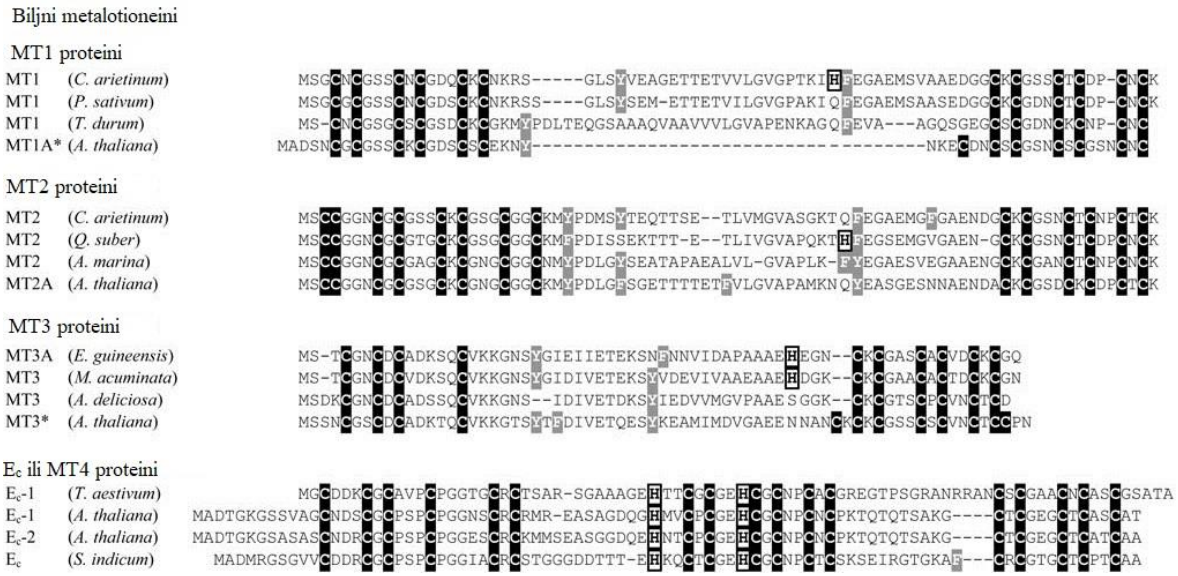
MT sisavaca otkriveni su prije više od 50 godina, dok su MT u biljkama otkriveni nešto kasnije, prije otprilike 32 godine. Prvi MT u biljkama otkriveni su u najranijoj fazi klijanja pšenice (*Triticum aestivum*) kod koje se 20-25% ukupnog Cys ugrađuje u protein koji se naziva protein E_c (od engl. *early cysteine-labeled*) (Lane i sur. 1987).

Početkom 1990-ih pokušavala se dobiti prekomjerna ekspresija metalotioneina 2 (MT-2) iz graška (*Pisum sativum*) u bakteriji *Escherichia coli*, ali je to istraživanje otežano zbog djelomične proteolitičke razgradnje (Kille i sur. 1991). U narednih 10 godina, otkriveno je sve više biljnih genskih sekvenci MT-a te su provedena daljnja istraživanja genske ekspresije MT-a (Freisinger 2011).

Biljni MT imaju nisku molekulsku masu (približno 5 – 10 kDa), te imaju karakterističan slijed aminokiselina, npr. Cys-Cys i Cys-Xaa-Cys (Xaa označava bilo koju aminokiselinu različitu od Cys) i karakteristične značajke kompleksa metal-tiol (Freisinger 2011).

MT biljaka podijeljeni su u četiri skupine: MT-1, MT-2, MT-3 i MT-4 ili E_c (Slika 1). Skupine MT-1, MT-2 i MT-3 u biljkama sadrže aromatske aminokiseline tirozin (Tyr) i fenilalanin (Phe). Dok MT sisavaca uvijek sadrže 20 ostataka Cys, u biljnim je MT-ima sadržaj Cys manji i pokazuje veću raznolikost u različitim podskupinama. Tako, E_c ili MT-4 imaju 17 ostataka Cys i imaju najveći sadržaj tiolnih skupina, MT-2 imaju 14 ostataka Cys, MT-1 imaju 12, a MT-3 imaju samo 10 ostataka Cys (Slika 1). MT najveće molekulske mase su MT-2 (približno 7,9 kDa), nakon čega slijedi protein E_c (približno 7,7 kDa), zatim MT-1 (približno 7,6 kDa) i MT-3 (približno 6,8 kDa) (Freisinger 2011). Navedene razlike u molekulskoj masi uglavnom potječu iz tzv. veznih (engl. *linker*) regija koje čini niz aminokiselina razvučene konformacije, a koje povezuju dva područja proteina bogata Cys. Kod sisavaca te vezne regije sadrže samo tri aminokiseline, dok su kod biljnih MT-a znatno duže. U tim veznim regijama nalaze se aromatske aminokiseline, koje su netipične za „klasične“ MT-e. Biljni MT (MT-1, MT-2 i MT-3) imaju dvije regije bogate Cys. Šest Cys ostataka smještenih na C-terminalnim krajevima, a u svakoj podobitelji organizirani su u vrlo očuvanom uzorku (CxCxxxCxCxxCxC) (Freisinger 2011). Nasuprot tome, broj i raspored ostataka Cys u N-terminalnom dijelu karakteristični su za svaku skupinu i koriste se kao glavni čimbenik razlikovanja. Proteini E_c sadrže tri regije bogate Cys , a sve su jasno odvojene veznim regijama. Ove vezne regije znatno su kraće od onih pronađenih u drugim biljnim MT-ima (MT-1, MT-2 i MT-3), ali s 12-15 aminokiselina ipak su izrazito duže nego

kod sisavaca. Vidljiva su i dva potpuno konzervirana ostatka His u već spomenutoj podobitelji E_c, koji se nalaze u blizini i unutar središnjeg dijela regije bogate Cys (Freisinger 2011).



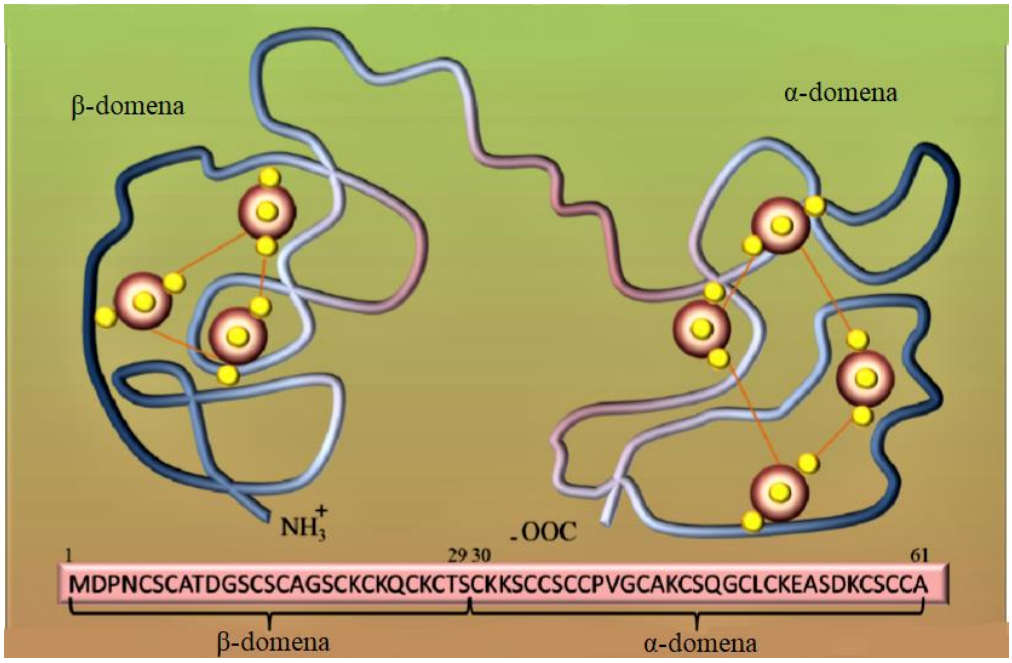
Slika 1. Metalotioneini biljaka podijeljeni su u četiri skupine (MT1, MT2, MT3 i MT4 ili E_C). Ostaci Cys su označeni crnom pozadinom, a aromatske aminokiseline sivom pozadinom. Sekvence označene zvjezdicom predstavljaju iznimke u inače vrlo konzerviranom rasporedu Cys unutar skupine MT. U uročnjaku (*Arabidopsis thaliana* MT-1A), vezna regija je dodatno reducirana na samo sedam aminokiselina (preuzeto i prilagođeno prema Freisinger, 2011).

2.2. STRUKTURA METALOTIONEINA KOD SISAVACA

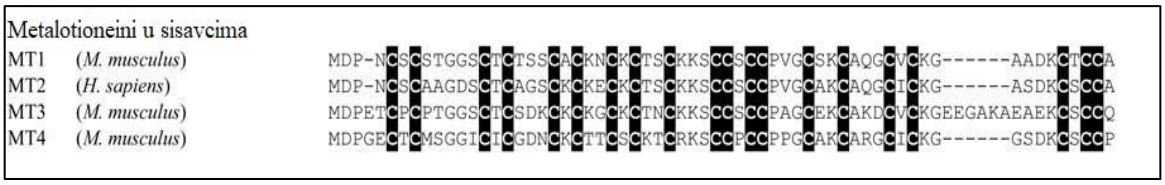
MT bez metala posjeduju pretežno neuređenu strukturu. Međutim, nakon vezanja metalnih iona dolazi do nastanka dobro definirane proteinske strukture. Prva opisana trodimenzionalna struktura MT-a sisavaca bila je struktura MT-2 koja je otkrivena nuklearnom magnetskom rezonancom (NMR) i rendgenskom kristalografijom. Kristalne strukture proteina Cd_5,Zn_2-MT-2 izoliranog iz štakora i NMR strukture proteina $^{113}Cd_7$-MT-2 iz zeca, štakora i čovjeka, kao i struktura ^{113}Cd7-MT-1 iz miša imaju identične strukture kompleksa metal-tiol i približno jednake polipeptidne globularne strukture. Stoga, monomerni proteini posjeduju oblik zvona, jednake veličine i gotovo sferične C- terminalne α-domene i N-terminalne β-domene, svaka s promjerom od 15-20 Å koje u svojim centrima sadrže odgovarajuća četiri i tri metalna klastera: $M_4^{II}Cys_{11}$ i $M_3^{II}Cys_9$. U oba su klastera

metalni ioni tetraedarno koordinirani s tiolatnim liganadima, a dvije su proteinske domene povezane s fleksibilnom veznom regijom sastavljenom od konzerviranog segmenta Lys-Lys (ostaci 30 i 31) u sredini polipeptidnog lanca (Vašák 2005).

Cjelokupne trodimenzionalne strukture su također opisane za kralježnjake koji nisu sisavci i za tri beskralježnjaka: Cd_7-MT u ribama (*Notothenia coriiceps*), Cd_6-MT-1 u plavom raku (*Callinectes sapidus*), Cd_6-MT-1 u jastogu (*Homarus americanus*) i Cd_7-MTu morskom ježincu (*Strongylocentrotus purpuratus*). Analogno MT-ima u sisavaca, sve ove strukture su monomerni proteini sastavljeni od dvije globularne domene, od kojih svaka obuhvaća metal-tiolni klaster: u MT-ima rakova dva klastera 3-metal-tiolat i klaster 3- i 4-metal-tiolat u ribi ili morskom ježincu (Slika 2) (Vašák 2005).



Slika 2. Struktura metalotioneina, prikaz C- terminalne α-domene i N-terminalne β-domene koje u svojim centrima sadrže odgovarajuća četiri i tri metalna klastera. Crvene velike kuglice su metalni atomi (npr. Zn), a male žute kuglice su atomi S (preuzeto i prilagođeno prema Ruttkay-Nedecky 2013).



Slika 3. Metalotioneini sisavaca podijeljeni su u četiri skupine (MT1, MT2, MT3 i MT4). Ostaci Cys su označeni crnom pozadinom (preuzeto i prilagođeno prema Freisinger, 2011).

3. FUNKCIJA METALOTIONEINA

3.1. DETOKSIKACIJA METALNIH IONA

Dokazano je da proteini MT-1 i MT-2 vežu različite jednovalentne i dvovalentne metalne ione. Uočeno je da se MT mogu povezati sa 7 - 9 dvovalentnih iona (npr. Zn ili Cd). Međutim, oni također mogu vezati do 12 iona Cu ili čak 18 iona Hg u eksperimentalnim uvjetima. MT mogu istodobno povezivati različite metalne ione. Također je zabilježena spontana oligomerizacija putem disulfidnih veza α-domena MT-a. Za većinu toksičnih iona, kao što su Cd, Pb i Hg, u većini je istraživanja uočeno da posjeduju veću afektivnost prema MT-ima. Ti metalni ioni mogu zamijeniti Zn ili druge ione metalne vezane za MT-e, što može dovesti do promjena u ključnim staničnim procesima kao što je transkripcija ili translacija. Zaštitni učinak proteina MT-1 i MT-2 u većini je slučajeva uglavnom posredovan otpuštanjem iona Zn iz tih molekula što dovodi do povećanja sinteze novih molekula MT-a. Nadalje, oslobođeni ioni Zn suprotstavljaju se prooksidativnom učinku drugih toksičnih metala (kao npr. Cd) pomicanjem redoks stanja prema redukcijskom, odnosno antioksidacijskom učinku molekula MT-1 i MT-2 (Dziegiel i sur. 2016).

3.2. METALOTIONEINI SPRJEČAVAJU STANIČNU TOKSIČNOST UZROKOVANU IONIMA Cd

Životinje i ljudi unose ione Cd u kontaminiranoj hrani ili udisanjem peludi. Nakon gutanja, kationi Cd se apsorbiraju iz probavnog trakta i prenose u jetre, bubrege i testise. U otrovanim organima, ioni Cd pokazuju svoje citotoksične učinke povećanjem sinteze reaktivnih kisikovih tvari (ROS, od engl. *reactive oxygen species*), uslijed čega dolazi do peroksidacije lipida, oštećenja DNA i denaturacije proteina. Poznati su i akutni učinci trovanja Cd, npr. plućni edem, krvarenje, zatajenje jetre i lezije testisa, kao i kronični učinci, npr. nefrotoksičnost, osteotoksičnost i imunotoksičnost (Dziegiel i sur. 2016).

Eksperimentalni podaci pokazuju kako predtretman životinja s malom količinom Cd povećava otpornost na vrlo visoke doze Cd, koje bi u normalnim uvjetima mogle izazvati staničnu smrt. Izolacijom jetrenih substaničnih frakcija iz tih životinja dva sata nakon ubrizgavanja smrtonosne doze Cd, ustanovljene su smanjene razine Cd u jezgrama, mitohondrijima i endoplazmatskom retikulumu te povišene razine u citosolu. Ioni Cd u citoplazmi bili su vezani za MT-e, koji su bili znatno inducirani predtretmanom životinja Cd (Goering i Klaassen 1983). Daljnjim je istraživanjem potvrđeno da visoke razine jetrenih MT-a smanjuju hepatotoksični učinak Cd u novorođenim i odraslim štakorima (Mukhopadhyay i sur. 2009).

Porast razine MT-1 i MT-2 također je zabilježen u plućima, nakon tretmana Cd putem inhalacije. Kao što je dokazano u jetri, izloženost niskim dozama Cd inducira stvaranje MT-a u plućima mužjaka štakora, što rezultira povećanom tolerancijom tih životinja na veće toksične doze ovog metalnog iona. Najistaknutija promjena u epitelnim stanicama pluća koja su tretirana Cd jest promjena ekspresije MT-a, koji mogu izdvojiti ione Cd te tako smanjiti naknadne citotoksične učinke ROS-a. Iako su se stanice prilagodile povećanju koncentracije Cd povećanjem ekspresije MT-1 i MT-2, one su također pokazale smanjenu sposobnost popravka DNA te postale otpornije na apoptozne podražaje. Ljudske stanice pluća koje su tretirane Cd stječu fenotip sličan onom stanicama raka, a ova pojava je popraćena povećanjem ekspresije MT-1 i MT-2. Ta se transformacija pojavljuje unatoč sposobnosti stanica da se prilagode kroničnoj izloženosti Cd. Doista, povećanje ekspresije MT-1 i MT-2 u plućnim alveolarnim stanicama popraćeno je smanjenom apoptozom ovih stanica i može potaknuti razvoj tumora (Hart i sur. 2001). Kronično trovanje Cd i indukcija ekspresije MT-1 i MT-2 moglo bi tako doprinijeti procesu karcinogeneze, sasvim različito od zaštitne uloge ovih proteina u normalnim stanicama (Dziegiel i sur. 2016).

Životinjski modeli i istraživanja *in vitro* omogućuju određivanje mogućih uloga MT-1 i MT-2 u zaštiti bubrega od trovanja Cd. Ioni Cd mogu ući u tubularne stanice bubrega putem bazalnih i tubularnih staničnih membrana. Akutna nefrotoksičnost opažena je ubrizgavanjem kompleksa Cd i MT-a (Cd-MT) kod miševa. Međutim, u ovom eksperimentalnom modelu, akutni učinci trovanja Cd bili su uzrokovani štetnim djelovanjem kompleksa Cd-MT nakon njegova ulaska iz primarnog urina u stanice proksimalnih tubula (Nordberg i sur. 1975). Iako znatno manje akumuliraju Cd u bubrezima, miševi s inaktiviranim genima za MT-e pokazuju puno brže i teže oštećenje funkcije bubrega, u odnosu na divlji tip miševa, što ukazuje na zaštitnu ulogu MT-a. Većina zaštitnih učinaka može se vidjeti u bubrežnim stanicama proksimalnh tubula, koje eksprimiraju veće razine

MT-1 i MT-2 u usporedbi s stanicama distalnih tubula. Osim toga, *in vitro* istraživanje je pokazalo da je vezani kompleks Cd-MT bio manje toksičan od $CdCl_2$ za stanice proksimalnih tubula štakora, kao i za stanice proksimalnih tubula svinje (Liu i sur. 1994). Uloga Cd i kompleksa Cd-MT u kroničnoj nefrotoksičnosti ispitana je primjenom jednake količine Cd u obliku $CdCl_2$ ili kompleksa Cd-MT tijekom 10 mjeseci na mužjacima štakora. U ovom istraživanju, životinje tretirane s $CdCl_2$ pokazale su mnogo veću nefrotoksičnost, dok je skupina tretirana kompleksom Cd-MT pokazala neznatno povećanje aktivnosti mokraćne γ-glutamil-transpeptidaze. Slobodni intracelularni ioni Cd su odgovorni za nefrotoksične učinke, a ne kompleks Cd-MT (Groten i sur. 1994).

Pokazalo se da MT štite koštano tkivo od toksičnih učinaka uzrokovanih Cd. Kao u slučaju hepatotoksičnosti i nefrotoksičnosti, miševi s inaktiviranim genima za MT-e pokazali su preosjetljivost na ozljede kostiju uzrokovane Cd, u odnosu na divlji tip miševa. Osteociti su stanice koje su najviše pogođene izloženosti Cd, jer su u ovom tipu stanica zabilježene povećane razine MT-1/2 kao odgovor na Cd (Dziegiel i sur. 2016).

3.3. METALOTIONEINI SPRJEČAVAJU STANIČNU TOKSIČNOST DRUGIM IONIMA

Osim prema ionima Cd, molekule MT-a posreduju u otpornosti prema još nekoliko toksičnih metalnih iona, kao što su ioni As, Pb, Hg, Cu i Cr. Međutim, zaštitna uloga MT-a protiv navedenih toksičnih iona manje je proučavana u odnosu na ione Cd. MT su uključeni u zaštitu od As, koji je odgovoran za brojne toksične i kancerogene učinke. Anorganski As može se prevesti u toksičnije metilirane spojeve As, koji su snažni kancerogeni te uzrokuju tumore kože, pluća i mokraćnog mjehura. Spojevi arsena mogu se vezati se na tiolne skupine MT-a pri niskim pH vrijednostima od 3,5, kao i pri fiziološkom pH, što upućuje na to da molekule MT-1 i MT-2 mogu detoksicirati ione As. Štoviše, dokazano je da arsenat inducira sintezu MT- i MT-2 (Dziegiel i sur. 2016). Pokazano je da molekule MT-1 i MT-2 štite bubrege, jetru i pluća od djelovanja spojeva As u eksperimentalnim uvjetima. U obje studije, ozbiljnost lezija u tim organima bila je znatno veća kod miševa s inaktiviranim genima za MT-e u usporedbi s kontrolnim životinjama (Liu i sur. 2000; Jia i sur. 2004).

Miševi s inaktiviranim genima MT-a su osjetljiviji na toksičnost uzrokovanu Pb, pri čemu izloženost ovom metalu značajno smanjuje funkciju bubrega u usporedbi s divljim tipom miševa. Štoviše, transgeni su miševi akumulirali manje Pb u bubrezima nego divlji tip miševa, te nisu stvorili olovna inkluzijska tijela**.** S obzirom na čestu generaciju tumora testisa

i na preneoplastične lezije bubrega i mokraćnog mjehura, transgeni miševi su osjetljiviji na izloženost u ranoj životnoj dobi (Dziegiel i sur. 2016).

Također se pokazalo da MT-1 i MT-2 djeluju kao zaštitna sredstva protiv Hg, snažnog neurotoksina (Monnet-Tschudi i sur. 2006). Ioni Hg imaju visok afinitet prema tiolnim skupinama raznih proteina, što dovodi do njihove inaktivacije. Također je do sada dokazano da MT-1 i MT-2 smanjuju toksične učinke intoksikacije bakrom u jetri, središnjem živčanom sustavu, bubrezima i koži (Dziegiel i sur. 2016).

Dokazano je da MT-1 i MT-2 vežu ione Cu u dvije nasljedne bolesti koje utječu na metabolizam, a to su Wilsonova bolest i Menkeova bolest. Wilsonova bolest je rijedak nasljedni sindrom koji se pojavljuje, s izmijenjenim metabolizmom Cu koji je karakteriziran taloženjem Cu u jetri, mozgu i rožnici. Analiza jetre bolesnika, na koju je utjecala Wilsonova bolest, pokazala je da su ioni Cu vezani za MT-1 i MT-2 molekule. Prema eksperimentalnim podacima dobivenim na štakorima koji nose mutaciju sličnu onoj kod Wilsonove bolesti, MT-1 i MT-2 vežu većinu slobodnih iona Cu u lizosomima, gdje se vremenom transformiraju, što dovodi do naknadne nekroze hepatocita zbog oksidacijskog oštećenja (Dziegiel i sur., 2016). Ovo saznanje omogućilo je stvaranje preventivne terapije, koja se temelji na kroničnoj primjeni Zn, koji indirektno djeluje kao kompetitivni inhibitor ulaska Cu u krvotok. U ovoj terapiji, ioni Zn povećavaju zalihe molekula MT-1 i MT-2 u enterocitima, koji uklanjaju višak apsorbiranih iona Cu, što u konačnici sprječava njihov ulazak u krvotok i naknadna oštećenja jetre i središnjeg živčanog sustava (Hoogenraad 2006).

3.4. ULOGA METALOTIONEINA U UVJETIMA OKSIDACIJSKOG STRESA

MT-1 i MT-2 imaju ulogu u smanjenju učinaka oksidacijskog stresa, do kojeg dolazi uslijed prekomjernog nastanka slobodnih radikala kao što su ROS ili RNS (reaktivne dušikove jedinke, od engl. *reactive nitrogen species*). Ove kratko živuće molekule karakterizira prisutnost barem jednog nesparenog elektrona i mogu se stvarati nakon djelovanja raznih fizikalnih čimbenika (UV, gama ili rendgensko zračenje, kemijske reakcije katalizirane metalima) ili tijekom različitih bioloških procesa (upalne reakcije, stanično disanje). Slobodni radikali mogu biti korisni u upalnim i imunološkim reakcijama, ali proizvedeni u suvišku, mogu dovesti do oštećenja različitih staničnih struktura, što u konačnici dovodi do stanične smrti ili neoplastične transformacije. Pokazano je da njihovi

štetni učinci mogu biti izbalansirani antioksidacijskim molekulama kao što su i izooblici MT-1 i MT-2 (Krizkova i sur. 2009, 2012).

Tiolna skupina MT-1 i MT-2 odgovorna je za redoks potencijal tih molekula, a ovisi o stabilnosti vezanja Zn i tiola, što opet modulira mobilnost iona Zn i njihovog prijenosa na druge proteine ovisne o Zn. Indukcija ekspresije MT-1 i MT-2 slobodnim radikalima, dovela je do zaključka da ti proteini mogu zaštititi stanice od oksidacijskog stresa. Antioksidacijska svojstva MT-1 i MT-2 potvrđena su brojnim istraživanjima *in vitro* i *in vivo*. Antioksidacijska svojstva omogućuju proteinima MT-1 i MT-2 smanjenje oštećenja DNA uzrokovana hidroksilnim radikalima (Dziegiel i sur. 2016). MT imaju sposobnost prijenosa iz citoplazme u jezgru i taj prijenos ovisi o redoks stanju jezgre. Budući da redoks status može utjecati na stanični ciklus, smatra se da molekule MT-1 i MT-2 mogu zaštititi jezgru stanice od suvišnih slobodnih radikala i time regulirati i osigurati napredovanje staničnog ciklusa (Takahashi i sur. 2005).

Iako istraživanja *in vitro* pokazuju antioksidacijsku ulogu MT-1 i MT-2, eksperimenti *in vivo* nisu potvrdili rezultate *in vitro* istraživanja. Korištenje miševa s inaktiviranim genima za MT-e omogućilo je analizu uloge izoformi MT-a u *in vivo* uvjetima. Razine antioksidacijskih proteina i molekula (superoksid-dismutaza, katalaza ili glutation-peroksidaza i glutation), nakon izlaganja oksidacijskom stresu izazvanom gama zračenjem ili 2-nitropropanom, nisu se razlikovale u miševima s inaktiviranim genima za MT-e u odnosu na miševe divljeg tipa. Razina oksidacijskih oštećenja DNA, lipida i proteina u jetri oba tipa miša bile su slične, iako su razine MT-1 i MT-2 u jetri miša divljeg tipa značajno porasle. Nadalje, kada su miševi bili izloženi zračenju cijelog tijela, nisu zabilježene nikakve razlike, čak ni kada su životinje podvrgnute predretmanu Zn kako bi se povećala ekspresija MT-1 i MT-2 (Conrad i sur. 2000).

Nadalje, pokazalo se da MT-1 i MT-2 štite stanicu od oštećenja DNA u jetri i koštanoj srži kod miševa s visokim udjelom masti. Proteini MT-1 i MT-2 također imaju zaštitne učinke na želučanu mukozu tijekom upale uzrokovane bakterijom *Helicobacter pylori*. Miševi koji prekomjerno eksprimiraju MT-1 i MT-2 bili su relativno otporni na oksidacijski stres. Također, pokazano je da su miševi s inaktiviranim genima za MT-e podložniji karcinogenezi kože i jetre induciranoj oksidacijskim stresom. MT-1 i MT-2 omogućuju otpornost stanica raka na određene kemoterapeutike, kao što su irinotekan, adriamicin i doksorubicin, kao i na radioterapiju (Dziegiel i sur. 2016).

3.5. METALOTIONEINI I PROLIFERACIJA STANICA

Visoke razine proteina MT-1 i MT-2 pronađene su u aktivnim i proliferativnim tkivima, bilo normalnim ili bolesnim. U normalnim tkivima visoke razine proteina MT-1 i MT-2 dokazane su imunohistokemijskom analizom, u folikulima dlake zdrave kože i u bazalnom sloju stanica epidermisa (Zamirska i sur. 2012). Također je dokazano da molekule MT-1 i MT-2 posreduju u pravilnom zarastanju rana na koži, što je popraćeno promjenama razina iona Zn u proliferativnim stanicama kao i u serumu (Iwata i sur. 1999). Ioni Zn mijenjaju nekoliko procesa jer djeluju kao kofaktori za mnoge proteine, npr. metaloproteinaze u matriksu i faktore transkripcije, osiguravajući time njihov pravilan rad. Svojstvo vezanja metala, omogućava proteinima MT-1 i MT-2 da djeluju kao mogući donori iona Zn za enzime koji ovise o Zn i transkripcijskim faktorima koji funkcioniraju putem svojih Zn-domena. Stoga, proteini MT-1 i MT-2 imaju ključnu ulogu u procesima kao što su replikacija, transkripcija i translacija (Dziegiel i sur. 2016).

Gore spomenuta zapažanja odgovaraju promjenama u lokaciji MT-1 i MT-2 u odnosu na stupnjeve staničnog ciklusa. U stanicama mirovanja (G0 faza), MT se može detektirati u citoplazmi, dok u stanicama koje se dijele, MT se prebacuju u jezgru. Nadalje, visoka ekspresija MT-a u citoplazmi zabilježena je u kasnoj G1 fazi i na prijelazu G1 faze u S fazu, dok je najveća koncentracija MT-1 i MT-2 u staničnoj jezgri zabilježena u S i G2 fazama (Dziegiel i sur. 2016). Podaci dobiveni iz normalnih stanica potvrđeni su eksperimentima *in vitro* na papilarnom karcinomu štitnjače i anaplastičnom karcinomu štitnjače. Utvrđeno je da je ekspresija MT-1 i MT-2 inducirana Cd povezana s promjenama u staničnom ciklusu, što dovodi do porasta udjela stanica u S i G2 fazi te se smanjuje broj stanica u G0 i G1 fazi (Liu i sur. 2007, 2009).

3.6. METALOTIONEINI KAO ANTIOKSIDANSI

MT su bitan dio stanične obrane od oksidacijskog stresa, od apoptoze uzrokovane oksidacijskim stresom, kao i apoptoze neovisne o oksidacijskom stresu. Istraživanja pokazuju da su antioksidacijska svojstva MT-a povećana u prisutnosti iona Zn (Shamsi i Fatima 2014).

U usporedbi s drugim antioksidansima koji su specifično djelotvorni protiv određenog oštećenja, npr. enzim superoksid-dismutaza protiv superoksidnog radikala, katalaza protiv vodikovog peroksida i glutation-peroksidaze protiv vodikovog peroksida i lipidnih peroksida, MT su djelotvorani antioksidansi protiv velikog raspona slobodnih

radikala koje čine hidroksil radikal i peroksinitrit. MT kao moćni antioksidansi mogu spriječiti komplikacije dijabetesa suzbijanjem oksidacijskih oštećenja do kojih dolazi u dijabetesu (Shamsi i Fatima 2014).

3.7. METALOTIONEINI KAO ANTIAPOPTOTIČKI I ANTIUPALNI FAKTOR

Najnovija istraživanja pokazala su da povećana ekspresija MT-a u stanicama izaziva antiapoptotičke učinke, a nedostatak MT-a povećava osjetljivost na programiranu staničnu smrt nakon izlaganja određenim antitumorskim lijekovima (Shamsi i Fatima 2014).

MT također imaju ulogu protuupalnog agensa, uključujući zaštitu od ozljede jetre, alergijskog odgovora i oksidacijske ozljede pluća. Istraživanje je pokazalo da MT štite od koagulacijskih poremećaja i višestrukih oštećenja organa, uključujući ozljedu pluća induciranu lipopolisaharidom, barem djelomično, putem inhibicije lokalne ekspresije proinflamatornih citokina. S druge strane, čini se da su stanice sisavaca koje eksprimiraju višak MT-a otpornije na toksične učinke dušikovog oksida. Kao dobro poznata činjenica, jetra ima visoku razinu iona Zn i vezane ione Cu na molekulama MT-a te ima veliki kapacitet za regeneraciju, a čini se kako su MT-i uključeni u regeneraciju hepatocita nakon djelomične hepatektomije i kemijskih ozljeda (Shamsi i Fatima 2014).

4. EKSPRESIJA GENA METALOTIONEINA I REGULACIJA SINTEZE

Molekularna istraživanja mišjih i ljudskih gena za MT-e omogućila su identifikaciju i prepoznavanje njihove ekspresije u različitim tkivima te su omogućile opisivanje glavnih regulacijskih mehanizama njihove sinteze. Kod miševa postoje samo četiri gena za MT-e lokalizirana na kromosomu 8 (MT-1, MT-2, MT-3 i MT-4). Kod ljudi je do sada identificirano 17 gena za MT-e na q13 regiji kromosoma 16. Od tih gena, 13 ih je za MT-1 i dva za MT-2, dok su dva gena za svaki MT-3 i MT-4. Istraživanja ukazuju da najmanje 10 gena kodira funkcionalne MT-e: MT-1A, MT-1B, MT-1E, MT-1F, MT-1G, MT-1H, MT-1X, MT-2A, MT-3 i MT-4 (Slika 3.).

U novije vrijeme, novi funkcionalni član MT-a identificiran je u jetri kao MT-1M. MT-1C, MT-1D, MT-1L, MT-1J, MT-1K, MT-1L i MT-2B smatraju se pseudogenima kod ljudi, budući da nisu identificirani nikakvi odgovarajući proteini. Međutim, njihova funkcionalnost, u većini slučajeva, ostaje nepoznata (Dziegiel i sur. 2016). Dodatno, MT-sličan 5 (MTL-5) koji je usko povezan s drugim izooblicima MT-a, identificiran je u

testisima miševa na području q13 kromosoma 11. Proizvod ovog gena, nazvan tesmin, diferencijalno regulira mejozu kod muških i ženskih stanica (Olesen i sur. 2004). Struktura i mogući mehanizmi regulacije gena za MT prikazani su na slici 4.

Geni MT-a sastoje se od tri eksona, ekson 1 kodira α-domenu, dok eksoni 2-3 kodiraju β-domenu. Regulatorni mehanizmi MT-1 i MT-2 su do sada najbolje poznati. Dokazano je da ove izooblike inducira nekoliko tvari i agensa, npr. teški metali, steroidi, čimbenici rasta, citokini, slobodni kisikom i dušikovi radikali. U području promotora gena *MT-1* i *MT-2* zabilježeno je nekoliko elemenata koji odgovaraju na metale (MRE), glukokortikoide (GRE) i elemenata antioksidacijskog odgovara (ARE) (Campagne i sur. 2000; Bi i sur. 2004).

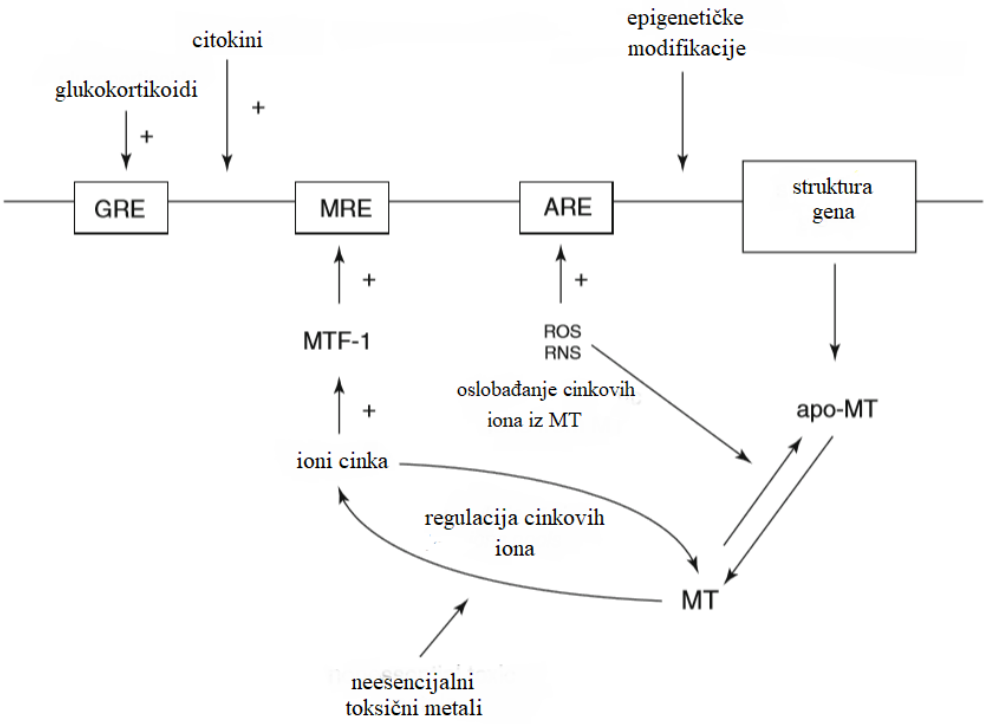
Čini se da su ioni metala, posebice ioni Zn koji se prirodno pojavljuju u organizmu, najsnažniji pobuđivači ekspresije gena *MT-1* i *MT-2*. Dokazano je da se ioni Zn vežu na transkripcijski faktor-1 reguliran metalima (MTF-1, od engl. *metal-regulatory transcription factor-1*), koji ulazi u interakciju s DNA putem svojih šest C_2H_2 Zn domena na sekvenci MRE u promotorskim regijama gena *MT-1* i *MT-2*. Ovo vezanje rezultira iniciranjem transkripcije gena (Dziegiel i sur. 2016).

Toksikološke studije pokazale su da metalni ioni, osim iona Zn, također mogu izazvati ekspresiju gena *MT-1* i *MT-2*. Povećane količine MT-1 i MT-2 pronađene su u jetri, bubrezima i crijevima pokusnih životinja nakon izloženosti Cd, Hg ili Zn (Vašák i Meloni 2011). Iako su ti metalni ioni sposobni izazvati ekspresiju gena *MT-1* i *MT-2*, ovaj se mehanizam razlikuje od indukcije ionima Zn, budući da se vežu izravno na MTF-1. Neesencijalni metalni ioni ne mogu aktivirati MTF-1, ali zbog njihovog većeg afiniteta prema MT-1 i MT-2, oni mogu premještati ione Zn iz molekula MT-1 i MT-2 i vezati se na MTF-1, što dovodi do aktivacije transkripcije gena *MT-1* i *MT-2* (Dziegiel i sur. 2016).

Protein	Aa	1 10	20	30	40	50	60	68
MT-1A	61	MDPNCSCATG	GSCTCTGSCK	CKECKCTSCK	KSCCSCCPMS	CAKCAQGCIC	KGASEKCSCC	A
MT-1B	61	MDPNCSCTTG	GSCACAGSCK	CKECKCTSCK	KCCCSCCPVG	CAKCAQGCVC	KGSSEKCRCC	A
MT-1E	61	MDPNCSCATG	GSCTCAGSCK	CKECKCTSCK	KSCCSCCPVG	CAKCAQGCVC	KGASEKCSCC	A
MT-1F	61	MDPNCSCAAG	VSCTCAGSCK	CKECKCTSCK	KSCCSCCPVG	CSKCAQGCVC	KGASEKCSCC	D
MT-1G	62	MDPNCSCAAA	GVSCTCASSC	KCKECKCTSC	KKSCCSCCPV	GCAKCAQGCI	CKGASEKCSC	CA
MT-1H	61	MDPNCSCEAG	GSCACAGSCK	CKKCKCTSCK	KSCCSCCPLG	CAKCAQGCIC	KGASEKCSCC	A
MT-1X	61	MDPNCSCSPV	GSCACAGSCK	CKECKCTSCK	KSCCSCCPVG	CAKCAQGCIC	KGTSDKCSCC	A
MT-2A	61	MDPNCSCAAG	DSCTCAGSCK	CKECKCTSCK	KSCCSCCPVG	CAKCAQGCIC	KGASDKCSCC	A
MT-3	68	MDPETCPCPS	GGSCTCADSC	KCEGCKCTSC	KKSCCSCCPA	ECEKCAKDCV	CKGGEAAEAE	AEKCSCCQ
MT-4	62	MDPRECVCMS	GGICMCGDNC	KCTTCNCKTY	WKSCCPCCPP	GCAKCARGCI	CKGGSDKCSC	CP

β-domena α-domena

Slika 4. Sveobuhvatni prikaz aminokiselinskih sekvenci svih izooblika metalotioneina (MT) s vidljivom podjelom na α- i β-domenu (preuzeto i prilagođeno prema Dziegiel i sur. 2016).



Slika 5. Mogući mehanizmi regulacije ekspresije gena metalotioneina. ARE - antioksidacijski odgovor, GRE- element koji reagira na glukokortikoide, MTF-1 transkripcijski faktor-1 reguliran metalima, MRE – elementi koji odgovaraju na metale, ROS - reaktivne kisikove tvari, RNS - reaktivne dušikove tvari (preuzeto i prilagođeno prema Dziegiel i sur. 2016).

5. METODE MJERENJA METALOTIONEINA

MT se mogu izolirati iz prirodnih izvora, međutim, to često rezultira malom količinom izoliranih MT-a, te se u heterogenim preparatima može pronaći nekoliko izooblika što može otežati konačno tumačenje rezultata. Dodatni problem koji se često susreće jest izolacija proteolitičkih fragmenata. U nekim slučajevima nije bilo jasno je li to zbog proteolitičke degradacije tijekom postupka pročišćavanja ili je promatrana proteoliza također normalno prisutna *in vivo*.

MT se mogu mjeriti masenom spektrometrijom. Metode masene spektrometrije idealno su prikladne za proučavanje kompleksa metalnih iona kao što su Zn (II) i Cu (I), jer se ne oslanjaju na neke spektroskopske značajke. Također je važno napomenuti da se

oksidacijsko stanje MT-a *in vivo* može odrediti proteomskim metodama koje su otkrile da disulfidne veze postoje *in vivo* i da se njihov udio povećava u uvjetima oksidacijskog stresa.

MT se mogu mjeriti i NMR spektroskopijom koja pruža uvid u strukturne, ali i dinamičke informacije.

6. METALOTIONEINI I BOLESTI

6.1. METALOTIONEINI I STARENJE

MT su proteini koji uklanjaju slobodne radikale *in vitro*. Istraživanje iz 2010. godine pokazalo je korelaciju između velike količine MT-a i smanjenog unosa kalorija (CR) i inhibicije inzulinskog signalnog puta, a povećana ekspresija gena za MT-e uočena je u tkivima izgladnjelih miševa, dugo živućih patuljastih miševa, crva koji su držani pod CR uvjetima i dugo živućih mutiranih crva. Deregulacija MT-a u tim sustavima vjerojatno ima specifične učinke na rezultate starenja tkiva (Swindell 2010).

MT su standardni proteini odgovora na stres i mnoga su istraživanja ukazala na djelovanje MT-a kao odgovora na različite vrste stresa, kao što su toksičnost teškim metalima, toksičnost lijekovima, bakterijski endotoksini, virusne infekcije, alkilirajuća sredstva i dr. Antioksidacijski potencijal MT-a od posebnog je interesa u kontekstu biologije starenja s neusklađenim rezultatima i neizvjesnošću jesu li su *in vitro* nalazi relevantni za njegovu aktivnost *in vivo* (Shamsi i Fatima 2014).

.

6.2. METALOTIONEINI I NEURODEGENERATIVNE BOLESTI

Fiziološka uloga MT-a ostaje pitanje rasprave čak i nakon 60 godina otkrića. To je zbog funkcije u središnjem živčanom sustavu, gdje je teško povezati njegova poznata biokemijska svojstva, kao što su vezanje metala i uklanjanje slobodnih radikala kako bi zakomplicirali rad mozga. Postoji velik broj neurodegenerativnih bolesti povezanih s povećanom sintezom i smanjenom sintezom MT-a. Neke od bolesti navedene su u nastavku:

Parkinsonova bolest - MT-1 i MT-2 u mozgu mogu biti regulirani ionima Cd i Zn, endotoksinima, kaininskom kiselinom i 6-hidroksidopaminom (Shamsi i Fatima 2014). Istraživanje iz 2011. potvrdilo je ekspresiju MT-a u astrocitima u Parkinsonovoj bolesti te podupire neuro-zaštitnu ulogu MT-a za te stanice. Klasična teorija koja kaže da nigralni

astrociti nisu reaktivni u Parkinsonovoj bolesti očito su netočni. Međutim, moguće je da astrociti sami utječu na proces bolesti (Michael 2011).

Autizam - Toksičnost teških metala, posebice Hg, kod djece s poremećajem autističnog spektra već je dugo pitanje rasprave. Nakon izlaganja Hg može doći do pogoršanja imunološke, senzorske, neurološke, motoričke funkcije i ponašanja kod djeteta. Ove osobine su slične autizmu (Shamsi i Fatima 2014).

6.3. METALOTIONEINI I RAK

MT imaju poznatu ulogu u regulaciji programirane stanične smrti. Povećana razina MT-a je pronađena kako bi se spriječila apoptoza u staničnim kulturama. Stoga MT reguliraju intracelularnu koncentraciju iona Zn i ulaze u interakciju s nekim proteinima uključenim u apoptozu. Ion Zn sposoban je inhibirati mnoge proteine povezane s apoptozom, a također sprječava fragmentaciju DNA. MT također mogu regulirati biološku aktivnost proteina p53 putem izmjene iona Zn. Molekule MT-1 i MT-2 kontroliraju razinu, aktivnost i stanično mjesto transkripcijskog faktora NF-κB. NF-kB je potreban za zaštitu stanica od apoptotičke kaskade inducirane stimulansima kroz aktivaciju anti-apoptotičkih gena i protoonkogena kao što su *Bcl-2, c-myc* i *TRAF-1*. Osim toga, MT-1,bez metala tvori kompleks s p53. Protein p53 ima važnu ulogu u povećanju ekspresije elemenata ovisnih o metalu (Shamsi i Fatima 2014).

MT ima svojstva antioksidansa koji zajedno s glutationom može zaštititi lako oksidirajuće molekule od slobodnih radikala smanjujući razinu ROS-a. Proučavana je i uloga MT-a kao markera tumorske bolesti ili kao uzroka rezistencije u liječenju raka (Shamsi i Fatima 2014).

6.4. METALOTIONEINI I DIJABETES

Dijabetes je bolest koja je uzrokovana povećanim oksidacijskim stresom. Genski ili farmakološki porast ekspresije MT-a u srcu, bubrezima i drugim organima štiti organe od disfunkcije, poput kardiomiopatije i nefropatije zbog dijabetesa. Oksidacijski stres je korijen uzroka dijabetesa i njegovih komplikacija, a antioksidansi mogu spriječiti oboje. Upalna autoimuna reakcija posredovana T-stanicama uzrokuje uništavanje β-stanica zbog stvaranja ROS-a i RNS-a (Shamsi i Fatima, 2014).

Također, dokazano je da prekomjerna ekspresija MT-a u raznim metaboličkim organima reducira oksidacijski stres uzrokovan hiperglikemijom, dijabetičku kompleksnost

specifičnu za organe i oštećenje DNA kod eksperimentalnih životinja s dijabetesom, što je dodatno potkrijepljeno rezultatima dobivenih na miševima s inaktiviranim genima za MT-2. Nadalje, pokazalo se da dopuna s ionima Zn aktivira *in vivo* sintezu MT-a u pokusnim životinjama i da se smanjuju relevantne komplikacije kod dijabetesa u ljudi i životinjskih modela (Wang i sur. 1999).

7. ZAKLJUČAK

Više od pola stoljeća, istraživanja MT-a pokazuju kako je to sveprisutan protein koji regulira razinu metala u biljnom i životinjskom organizmu kao i u ljudskom tijelu. MT-i zbog neobičnih metal-tiolnih skupina i njihove izvanredne kinetičke labilnosti i kemijske reaktivnosti, predstavljaju jedinstvenu klasu metaloproteina. Trenutno dostupni eksperimentalni dokazi upućuju na to da ovi proteini mogu igrati ulogu u više bioloških procesa. Svaka promjena u ekspresiji MT-a uzrokuje anomalije uslijed promjena u koncentraciji metala, uključujući razne neurodegenerativne bolesti, dijabetes, starenje i rak. MT se mogu koristiti kao pokazatelji okolišne izloženosti metalima. Može služiti i za medicinsku uporabu te pomoći u izračunavanju dopuštene količine unosa ili izloženosti Cd. MT se koriste kao biomarker izloženosti Cd kod ljudi i također mogu biti korisni u procjeni rizika izloženosti drugim metalima.

Kako bi se otkrile nove te dodatno istražile već određene funkcije MT-a potrebne su nove metode istraživanja, sredstva i znanja. Za brojne bolesti je otkriveno kako MT djeluju na stanice te bi se trebalo istražiti kako bi reagirali na lijekove, što bi potaknulo napredovanje biomedicine. Otkrivanjem strukture i funkcije MT-a stvara se mogućnost za razvoj velikog broja grana znanosti.

8. LITERATURA

Bi, Y., Palmiter, R.D., Wood, K.M., Ma, Q. (2004) Induction of metallothionein I by phenolic antioxidants requires metal-activated transcription factor 1 (MTF-1) and zinc. Biochemical Journal 380 (Pt 3): 695–703.

Blindauer, C.A., Leszczyszyn, O.I. (2010) Metallothioneins: unparalleled diversity in structures and functions for metal ion homeostasis and more. Natural Product Reports 27: 720-741.

Calvo, J., Jung, H., Meloni, G. (2017) Copper metallothioneins. International Union of Biochemistry and Molecular Biology 69: 236-245.

Campagne, M.L., Thibodeaux, H., van Bruggen, N., Cairns, B., Lowe, D.G. (2000) Increased binding activity at an antioxidant-responsive element in the metallothionein-1 promoter and rapid induction of metallothionein-1 and -2 in response to cerebral ischemia and reperfusion. The Journal of Neuroscience 20: 5200–5207.

Carpene E., Andreani G., Isani G. (2007) Metallothionein functions and structural characteristics. Journal of Trace Elements in Medicine and Biology 1: 35-39.

Conrad, C.C., Grabowski, D.T., Walter, C.A., Sabia, M., Richardson, A. (2000) Using MT(-/-) mice to study metallothionein and oxidative stress. Free Radical Biology and Medicine 28: 447–462.

Dziegiel, P., Pula, B., Kobierzycki, C., Stasiolek, M., Podhorska-Okolow, M. (2016) Metallothioneins: Structure and Functions. Metallothioneins in Normal and Cancer Cells, Springer International Publishing Switzerland, str.3-20.

Freisinger, E. (2011) Structural features specific to plant metallothioneins. Journal of Biological Inorganic Chemistry 16: 1935-1945.

Goering, P.L., Klaassen, C.D. (1983) Altered subcellular distribution of cadmium following cadmium pretreatment: Possible mechanism of tolerance to cadmium-induced lethality. Toxicology and Applied Pharmacology 70: 195-203.

Groten, J.P., Koeman, J.H., van Nesselrooij, J.H., Luten, J.B., Fentener van Vlissingen, J.M., Stenhuis, W.S., van Bladeren, P.J. (1994) Comparison of renal toxicity after long-term oral administration of cadmium chloride and cadmium-metallothionein in rats. Fundamental Applied Toxicology 23: 544–552.

Hart, B.A., Potts, R.J., Watkin, R.D. (2001) Cadmium adaptation in the lung - a double-edged sword?. Toxicology 160: 65–70.

Hoogenraad, T.U. (2006) Paradigm shift in treatment of Wilson's disease: zinc therapy now treatment of choice. Brain and Development 28: 141-146.

Iwata, M., Takebayashi, T., Ohta, H., Alcalde, R.E., Itano, Y., Matsumura, T. (1999) Zinc accumulation and metallothionein gene expression in the proliferating epidermis during wound healing in mouse skin. Histochemistry and Cell Biology 112: 283–290.

Jia, G., Gu, Y.Q., Chen, K.T., Lu, Y.Y., Yan, L., Wang, J.L., Su, Y.P., Wu, J.C. (2004) Protective role of metallothionein (I/II) against pathological damage and apoptosis induced by dimethylarsinic acid. World Journal of Gastroenterology 10: 91-95.

Kille, P., Winge, D.R., Harwood, J.L., Kay, J. (1991) A plant metallothionein produced in E. coli. FEBS Letters 295: 171–175.

Krizkova, S., Adam, V., Kizek, R. (2009) Study of metallothionein oxidation by using of chip CE. Electrophoresis 30: 4029–4033.

Krizkova, S., Ryvolova, M., Hrabeta, J., Adam, V., Stiborova, M., Eckschlager, T., Kizek, R. (2012) Metallothioneins and zinc in cancer diagnosis and therapy. Drug Metabolism Reviews 44: 287–301.

Lane, B., Kajioka, R., Kennedy, T. (1987) The wheat-germ Ec protein is a zinc-containing metallothionein. Biochemistry and Cell Biology 65: 1001–1005.

Leszczyszyn, O.I., Imam, H.T., Blindauer, C.A. (2013) Diversity and distribution of plant metallothioneins: a review of structure, properties and functions. Metallomics 5: 1146-1169.

Liu, J., Liu, Y., Habeebu, S.M., Waalkes, M.P., Klaassen, C.D. (2000) Chronic combined exposure to cadmium and arsenic exacerbates nephrotoxicity, particularly in metallothionein-I/II null mice. Toxicology 147: 157–166.

Liu, J., Liu, Y., Klaassen, C.D. (1994) Nephrotoxicity of CdCl2 and Cd-metallothionein in cultured rat kidney proximal tubules and LLC-PK1 cells. Toxicology and Applied Pharmacology 128: 264–270.

Liu, Z.M., Chen, G.G., Shum, C.K., Vlantis, A.C., Cherian, M.G., Koropatnick, J., van Hasselt, C.A. (2007) Induction of functional MT1 and MT2 isoforms by calcium in anaplastic thyroid carcinoma cells. FEBS Letters 581: 2465–2472.

Liu, Z.M., Hasselt, C.A., Song, F.Z., Vlantis, A.C., Cherian, M.G., Koropatnick, J., Chen, G.G. (2009) Expression of functional metallothionein isoforms in papillary thyroid cancer. Molecular and Cellular Endocrinology 302: 92–98.

Margoshes, M., Vallee, B.L. (1957) A cadmium protein from equine kidney cortex. Journal of the American Chemical Society 79: 4813-4814.

Michael, G.J., Esmailzadeh, S., Moran, L.B., Christian, L., Pearce, R.K., Graeber, M.B. (2011) Up-regulation of metallothionein gene expression in parkinsonian astrocytes. Neurogenetics 12: 295-305.

Monnet-Tschudi, F., Zurich, M.G., Boschat, C., Corbaz, A., Honegger, P. (2006) Involvement of environmental mercury and lead in the etiology of neurodegenerative diseases. Reviews on Environmental Health 21: 105-117.

Mukhopadhyay, D., Mitra, A., Nandi, P., Varghese, A.C., Murmu, N., Chowdhury, R., Chaudhuri, K., Bhattacharyya, A.K. (2009) Expression of metallothionein-1 (MT-1) mRNA in the rat testes andliver after cadmium injection. Systems Biology Reproductive Medicine 55: 188–192.

Nordberg, G.F., Goyer, R., Nordberg, M. (1975) Comparative toxicity of cadmium-metallothionein and cadmium chloride on mouse kidney. Archives of Pathology and Laboratory Medicine 99:192–197

Nordberg, M., Nordberg, G.F. (2009) Metallothioneins: Historical Development and Overview. U: Sigel, A., Sigel, H., Sigel R.K.O (ur.) Metal Ions in Life Sciences. Royal Society of Chemistry, Sweden, str.1-29.

Olesen, C., Moller, M., Byskov, A.G. (2004) Tesmin transcription is regulated differently during male and female meiosis. Molecular Reproduction and Development 67: 116–126.

Ruttkay-Nedecky, B., Nejdl, L., Gumulec, J., Zitka, O., Masarik M., Eckschlager, T., Striborova, M., Adam, V., Kizck, R. (2013) The role of metallothionein in oxidative stress. International Journal of Molecular Sciences 14: 6044-6066.

Shamsi, T.N., Fatima, S. (2014) Metallothionein: classification, biochemical features and clinical applications. Journal of proteins and proteomics 5: 25-33.

Swindell, W. R. (2010) Metallothionein and the biology of aging. Ageing Research Reviews 10: 132-145.

Takahashi, Y., Ogra, Y., Suzuki, K.T. (2005) Nuclear trafficking of metallothionein requires oxidation of a cytosolic partner. Journal of Cellular Physiology 202: 563–569.

Vasák, M. (2005) Advances in metallothionein structure and functions. Journal of Trace Elements in Medicine and Biology 19: 13-17.

Vasák, M., Meloni, G. (2011) Chemistry and biology of mammalian metallothioneins. Journal of Biological Inorganic Chemistry 16: 1067-1078.

Wang, C.Y., Cusack, J.C. Jr., Liu, R., Baldwin, A.S. Jr. (1999) Control of inducible chemoresistance: enhanced anti-tumor therapy through increased apoptosis by inhibition of NF-kappaB. Nature Medicine 5: 412-417.

Wexler, P. (2014) Metallothionein. U: Abdollahi, M., Peqster, A., Gad, S.C., Greim, H., Harper, S., Moser, V.C., Ray, S., Tarazona, J., Wiegand, T.J. (ur.) Encyclopedia of Toxicology Third edition. Elsevier, London, str. 230-231.

Zamirska, A.., Matusiak, L., Dziegiel, P., Szybejko-Machaj, G., Szepietowski, J.C. (2012) Expression of metallothioneins in cutaneous squamous cell carcinoma and actinic keratosis. Pathology and Oncology Research 18: 849–855.