

Rola metalotionein i kadmu w rozwoju raka piersi

Role of metallothioneins and cadmium in breast carcinogenesis

EWA FORMA, MAGDALENA BRYŚ

Katedra Cytobiochemii, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska
Uniwersytet Łódzki

Streszczenie

Metalotioneina (MT) została po raz pierwszy odkryta ponad 50 lat temu, jako białko wiążące kadm w nerce konia. Metalotioneiny są grupą powszechnie występujących białek o niskiej masie cząsteczkowej, wysokiej zawartości reszt cysteiny, których grupy tiolowe wiążą jony takich metali jak kadm (Cd), cynk (Zn) i miedź (Cu). U ssaków wyróżnia się cztery izoformy metalotioneiny oznaczone jak MT-1 – MT-4. Do podstawowych funkcji metalotionein zalicza się utrzymanie homeostazy metali ciężkich, ochronę przed ich toksycznym działaniem, a także ochronę przed stresem oksydacyjnym. Kadm, który został zakwalifikowany do substancji karcynogennych I klasy, może między innymi stymulować proliferację komórek, hamować naprawę uszkodzeń DNA, zaburzać proces apoptozy oraz promować rozwój nowotworów w licznych tkankach. Kadm znajdujący się w środowisku naturalnym pochodzi ze źródeł naturalnych, jak i antropogenicznych, przy czym ilość kadmu dostająca się do środowiska w wyniku działalności człowieka od 3 do 10 razy przekracza ilości kadmu pochodzące ze źródeł naturalnych. Kadm akumuluje się w organizmie człowieka, a jego okres biologicznego półtrwania wynosi od 10 do 30 lat. Zarówno akumulacja Cd, jak i zaburzenia ekspresji metalotionein mogą mieć związek z rozwojem wielu typów nowotworów, w tym raka piersi.

Słowa kluczowe: metalotioneiny, kadm, rak piersi.

Abstract

Metallothionein (MT) was first discovered over 50 years ago, as a cadmium-binding protein in the kidney of a horse. Metallothioneins are a class of

Adres do korespondencji: dr Ewa Forma; Katedra Cytobiochemii, Uniwersytet Łódzki;
90-236 Łódź; ul. Pomorska 141/143; e-mail: eforma@biol.uni.lodz.pl,
Tel.: + 48 42 6354371; Fax: +48 42 6354484

ubiquitously occurring cysteine and metal-rich proteins of low molecular weight, containing sulfur-based metal clusters formed with zinc (Zn), cadmium (Cd), and copper (Cu). In mammals, four distinct MT isoforms designated MT-1 – MT-4 are identified. The major physiological functions of metallothioneins include the homeostasis of essential metals Zn and Cu and the protection against oxidative stress and toxic effects of heavy metals such as Cd. Cadmium, which has been classified as class I carcinogen, can stimulate cell proliferation, inhibit DNA repair, impair apoptosis and promote the development of cancer in a number of tissues. Significant quantities of Cd are introduced into the environment both by natural and anthropogenic activities, with anthropogenic activities contributing 3–10 times more Cd to the environment than natural activities. Cadmium accumulates in the human body with a long biological half-life ranging from 10 to 30 years. Cd accumulation and the aberrant expression of MTs have been found to be associated with the development of many types of cancers, including breast cancer.

Key words: metallothioneins, cadmium, breast cancer.

Wstęp

Metalotioneiny (MTs, ang. *metallothioneins*) to grupa wewnątrzkomórkowych białek charakteryzujących się niską masą cząsteczkową (6 – 7 kDa) oraz wysoką zawartością reszt cysteiny, które stanowią około 30% wszystkich aminokwasów budujących łańcuch polipeptydowy. W białkach tych brak jest aminokwasów aromatycznych oraz histydyny [1, 2]. MT mają zdolność do wiązania różnych jonów metali, w tym cynku, kadmu, rtęci, miedzi, ołowiu i srebra [2]. Białka te odpowiadają za homeostazę jonów cynku i miedzi, detoksykację metali ciężkich (zwłaszcza Cd i Hg) oraz ochronę przed uszkodzeniami oksydacyjnymi i apoptozą [3, 4]. Kadm jest związkiem karcynogennym wykazującym negatywny wpływ na wiele procesów komórkowych. Jony kadmu biorą udział we wszystkich etapach transformacji

nowotworowej [5-7]. Związek metalotionein i kadmu z procesem karcynogenezy analizowano w odniesieniu do wielu typów nowotworów, w tym raka płuc, prostaty, jelita grubego, wątroby oraz nerek [8-13].

Klasyfikacja metalotionein

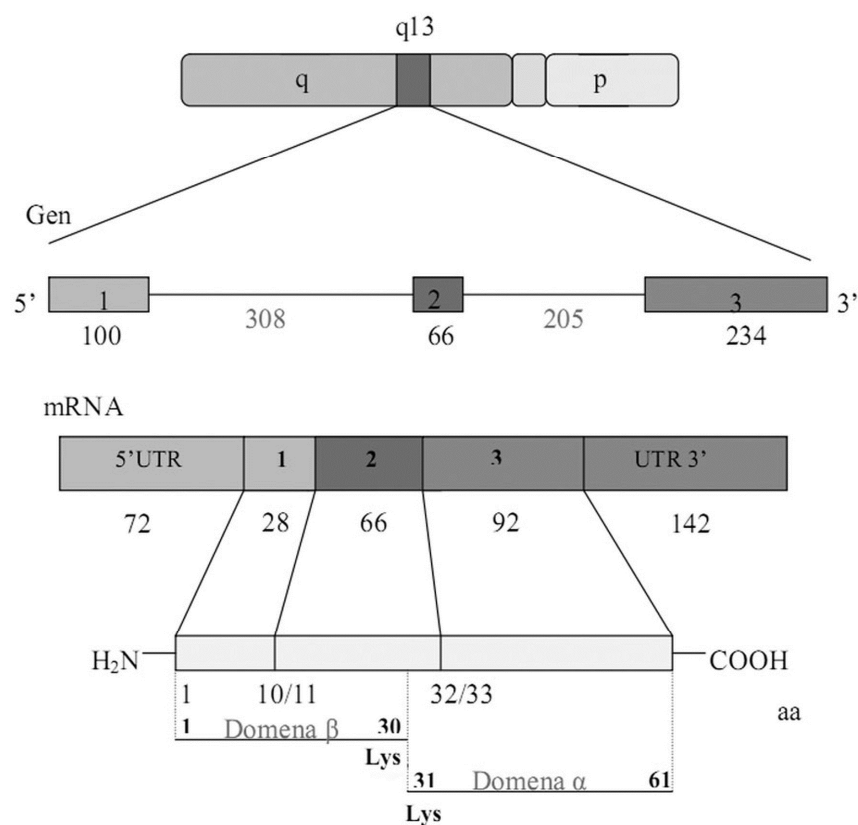
Podział metalotionein na rodziny, podrodziny, podgrupy i izoformy opiera się na podobieństwie sekwencji i pokrewieństwie filogenetycznym. Metalotioneiny podzielono na 4 grupy: MT-1, MT-2, MT-3 oraz MT-4. Geny *MT-1* kodują szereg izoform (MT-1A, -B, -E, -F, -G, -H, -I, -J, -K, -L, -X), natomiast pozostałe białka z rodziny metalotionein kodowane są przez pojedyncze geny (*MT-2A*, *MT-3* i *MT-4*) [3].

Struktura metalotionein

Metalotioneina została po raz pierwszy wyizolowana z nerki konia przez Margoshesa i Vallee'a w 1957 r., jako niskocząsteczkowe białko wiążące kadm. W 1990 roku dzięki zastosowaniu spektroskopii NMR i krytalografii rentgenowskiej określono trójwymiarową strukturę metalotioneiny [14, 15]. Geny metalotionein znajdują się na długim ramieniu chromosomu 16 (16q13) [15]. MT-1 i MT-2A zbudowane są z 61, MT-3 z 68, a MT-4 z 62 reszt aminokwasowych. MT-3 jest najdłuższą izoformą metalotionein w ludzkich komórkach. Różnica w długości łańcucha polipeptydowego między MT-1/MT-2A a MT-3 związana jest z obecnością w tej ostatniej izoformie reszty treoniny w pozycji 5 i heksapeptydu o charakterze kwaśnym poniżej pozycji 53, których brak jest w MT-1 i MT-2A. Podobnie jak w MT-3, tak i w MT-4 w pozycji 5 znajduje się reszta kwasu glutaminowego, której brak jest w pozostałych izoformach. MT-3 wykazuje 70% zgodność sekwencji

z MT-1/MT-2A, natomiast MT-4 różni się od MT-1 i MT-2A większością aminokwasów niebędących resztami cysteiny [14, 16-19]. W cząsteczkach MT nie występują aminokwasy aromatyczne [1, 2]. Wszystkie izoformy MT zawierają w swojej strukturze 20 konserwatywnie zachowanych reszt cysteiny, znajdujących się w obrębie charakterystycznych sekwencji: Cys-x-Cys, Cys-x-y-Cys i Cys-Cys, gdzie x i y to aminokwasy inne niż Cys [14, 20, 21]. Obecność dwóch konserwatywnych reszt proliny, znajdujących się w charakterystycznej dla MT-3 sekwencji Cys-Pro-Cys-Pro, zawartej między pozycją 6 i 9 łańcucha białkowego decyduje o aktywności biologicznej MT-3 [14, 17, 18]. Atomy siarki grup tiolowych reszt cysteiny biorą udział w koordynacyjnym wiązaniu jonów metali dwuwartościowych (Zn^{2+} , Cd^{2+} , Hg^{2+} , Pb^{2+}) i jednowartościowych (Cu^+ , Ag^+) [3]. Pierwszą izoformą MT, której struktura trójwymiarowa została poznana była pochodząca z wątroby szczura MT-2A [14, 18]. Późniejsze badania wykazały, że w analogiczny do MT-2A sposób zbudowane są pozostałe izoformy MT. W cząsteczce metalotioneiny wyróżnia się dwie globularne domeny odpowiadające za wiązanie metali (Ryc. 1). W N-końcowej części MT-2A znajduje się domena β , odpowiadająca resztom aminokwasowym od 1 do 30. W domenie tej znajduje się 9 reszt cysteiny, które uczestniczą w koordynacyjnym wiązaniu trzech jonów metali, co można opisać stechiometrycznie $M_3^{II}S_9$, gdzie M^{II} to jon metalu na drugim stopniu utlenienia, a S to atom siarki grupy tiolowej Cys biorący udział w wiązaniu metali. C-kończącą część białka stanowi domena α składająca się z aminokwasów od 31 do 61. W domenie tej znajduje się 11 reszt cysteiny wiążących cztery jony metali grupy II – stechiometrycznie $M_4^{II}S_{11}$. Wymiana metali w domenie β zachodzi szybciej niż w domenie α , ponieważ jest ona bardziej reaktywna.

Chromosom 16



Ryc. 1. Schemat genu, mRNA oraz białka metalotioneiny 2A.

Domeny MT połączone są konserwatywnym segmentem, składającym się z dwóch reszt lizyny znajdujących się w pozycjach 30 i 31 i pełniącym funkcję ruchomego zawiasu. W MT-4 w pozycji 30 (region zawiasu), zamiast występującej w innych izoformach reszty lizyny, znajduje się reszta argininy. W MT 20 reszt cysteiny pozwala na związanie 7 jonów Zn^{2+} , Cd^{2+} , Hg^{2+} lub 12 jonów Cu^+ (jony Cu^{2+} nie są wiązane przez MT). MT niezawierająca jonów

nosi nazwę apo-MT lub tioneiny. Cechuje ją nieuporządkowana struktura, wysoka niestabilność i podatność na utlenianie oraz proteolizę. Związanie jonów metali przez apo-MT powoduje wzrost stabilności termodynamicznej i oporności na trawienie proteolityczne, co w konsekwencji prowadzi do akumulacji metali związanych przez MT [18, 20, 22-24].

Charakterystyka poszczególnych izoform metalotionein

Metalotioneiny MT-1 i MT-2

MT-1 i MT-2 ulegają ekspresji we wszystkich tkankach ssaków, przy czym najwyższe ich stężenie obserwuje się w hepatocytach [3, 25]. Wysoki poziom ekspresji MT-1 i MT-2 charakterystyczny jest również dla komórek nerki, trzustki i jelita [26]. Wysokie stężenie tych białek w wątrobie sugerować może, iż główną funkcją MT-1 i MT-2 jest detoksykacja metali ciężkich (zwłaszcza Cd), utrzymanie homeostazy cynku i miedzi oraz ograniczenie uszkodzeń oksydacyjnych [27]. MT-2A wykazuje wyższy poziom ekspresji niż MT-1 w tkankach ludzkich [20]. Stężenie MT-1 i MT-2A wzrasta w czasie proliferacji i różnicowania komórek, co może być związane ze wzrostem zapotrzebowania na cynk, który jest niezbędnym składnikiem enzymów i czynników transkrypcyjnych, kluczowych dla tych procesów. Metalotioneiny są białkami cytoplazmatycznymi, jednakże w czasie proliferacji i różnicowania ulegają przejściowej translokacji do jądra komórkowego dostarczając cynk do miejsc zwiększonego zapotrzebowania [15, 20, 25, 27, 28]. Najwyższe stężenie MT-1 i MT-2A w jądrze komórkowym występuje w późnej fazie G1 oraz w fazie S [29]. Ekspresja MT-1 i MT-2A, w przeciwieństwie do ekspresji dwóch pozostałych lizoform, tj. MT-3 i MT-4, indukowana jest przez wiele czynników

chemicznych i fizycznych, w tym przez metale, stres oksydacyjny, hormony (głównie glukokortykoidy), cytokiny oraz promieniowanie [19, 25, 30, 31].

Metalotioneina MT-3

Izofорма MT-3 po raz pierwszy została zidentyfikowana jako czynnik hamujący wzrost komórek nerwowych (GIF, ang. *growth inhibitory factor*). W wyniku dalszych badań czynnik GIF zaliczono do rodziny metalotionein jako izofর্মę MT-3 [3, 32]. Ekspresję tego białka obserwuje się przede wszystkim w neuronach i astrocytach mózgu, szczególnie w korze mózgu, hipokampie oraz ciele migdałowatym [2]. Obniżony poziom ekspresji MT-3 w neuronach mózgu występuje u osób cierpiących na chorobę Alzheimera [3, 14]. Bardzo niski poziom ekspresji MT-3 charakterystyczny jest dla komórek trzustki, jelita, żołądka, serca i nerki. [20, 25, 32, 33]. Jak wykazały badania prowadzone na myszach transgenicznych przez Quaię i wsp. [34] nadekspresja MT-3 w tkankach zlokalizowanych poza ośrodkowym układem nerwowym wywołuje efekt letalny w wyniku atrofii trzustki. MT-3 uważana jest za niespecyficzny inhibitor procesu proliferacji [14, 35].

Metalotioneina MT-4

Izofорма MT-4 jest najpóźniej odkrytym białkiem zaliczanym do metalotionein i najmniej poznanym. MT-4 ulega ekspresji w nabłonku wielowarstwowym płaskim, gdzie prawdopodobnie pełni funkcje w regulacji stężenia jonów cynku w czasie procesu różnicowania się komórek [14, 15, 27, 32, 36]. Ekspresję MT-4 zaobserwowano w komórkach błony śluzowej jamy ustnej, języka i nosogardzieli, górnej części żołądka oraz w skórze [2, 27].

Funkcje metalotionein

Zasadniczą funkcją metalotionein, wynikającą z ich budowy, jest utrzymywanie homeostazy jonów metali niezbędnych dla prawidłowego metabolizmu, detoksykacja ustroju z metali toksycznych oraz ochrona przed uszkodzeniami oksydacyjnymi [1, 19, 25].

Udział metalotionein w homeostazie cynku

Cynk odgrywa ważną rolę w metabolizmie i jest niezbędny dla prawidłowego funkcjonowania organizmu człowieka [33]. Cynk jest kofaktorem ponad 300 enzymów, w tym dehydrogenazy mleczanowej, fosfatazy zasadowej, anhidrazy węglanowej, dysmutazy ponadtlenkowej i dehydrogenazy alkoholowej. Bierze on udział w tworzeniu motywu palca cynkowego (ZF, ang. *zinc finger motif*), który występuje w białkach wiążących się z DNA, w tym w czynnikach transkrypcyjnych oraz receptorach dla hormonów sterydowych, hormonów tarczycy, kalcytriolu i retinoidów, które po związaniu ligandu pełnią funkcje czynników transkrypcyjnych [4, 23, 27, 37-39]. Najwyższe stężenie cynku występuje w wątrobie, nerce, siatkówce, prostatie i mięśniach [4, 40]. Głównymi wewnątrzkomórkowymi białkami wiążącymi cynk są metalotioneiny, które pełnią ważną funkcję w regulacji pobierania, dystrybucji, magazynowania i uwalniania Zn [3, 4, 33]. W utrzymaniu homeostazy Zn^{2+} bierze udział układ metalotioneina/tioneina. Wzrost dostępności cynku indukuje syntezę tioneiny i prowadzi do formowania metalotioneiny. Cynk uwalniany jest z MT wówczas, gdy obniża się stężenie wolnego Zn [4, 23, 27]. Uwalnianie cynku z MT może zachodzić na drodze utleniania grup tiolowych reszt cysteiny. W procesie tym ważną rolę pełni glutation. Układ zredukowany/utleniony glutation (GSH/GSSG) moduluje uwalnianie cynku z Zn_7 -MT w zależności od stężenia

Zn i statusu redoks [19, 23, 27, 38, 41]. Liczne badania *in vitro* wykazały, że układ metalotioneina/tioneina poprzez uwalnianie lub wiązanie Zn^{2+} wpływa na aktywność białek zależnych od cynku i może modulować zdolność wiązania się czynników transkrypcyjnych, zawierających motyw palca cynkowego, z DNA [33, 41, 42]. Wiązanie jonów cynku przez tioneinę prowadzi również do aktywacji enzymów, których aktywność hamowana jest przez ten metal [41, 42].

Wiązanie kadmu przez metalotioneiny

Metalotioneiny uczestniczą w detoksykacji metali ciężkich dzięki zdolności wiązania różnych metali, w tym toksycznych metali ciężkich, do których zaliczamy kadm i rtęć. MT wykazują wyższe powinowactwo do metali takich jak Cd i Hg niż do Zn. Dzięki temu metale ciężkie zatrzymywane są we wnętrzu cząsteczek tych białek, co chroni komórkę przed ich toksycznym działaniem [2-4, 25, 35, 43]. Kadm jest metalem toksycznym występującym w środowisku naturalnym w glebie, w wodzie i powietrzu. Do organizmu kadm dostaje się wraz z pożywieniem, dymem tytoniowym i zanieczyszczonym powietrzem. Również wykonywanie pewnych zawodów wiąże się z narażeniem na wyższe stężenia Cd w miejscu pracy [5, 6, 44-49]. W 1993 roku Cd został uznany za związek karcynogeny dla ludzi [45, 46, 50-53]. Kadm charakteryzuje się bardzo długim okresem biologicznego półtrwania ocenianym u ludzi na 10 – 30 lat [50, 54, 55]. W następstwie długotrwałej ekspozycji na kadm, metal ten gromadzi się w organizmie - głównie w wątrobie i nerkach. Nerki są najważniejszym narządem docelowego działania kadmu. W komórkach cewek nerkowych kadm gromadzi się w postaci związanej z metalotioneina, a po przekroczeniu tzw. stężenia krytycznego powoduje dysfunkcje cewek nerkowych, a następnie zwłóknienie śródmiąższowe nerek [48, 55, 56]. Kadm

wpływa na proliferację, różnicowanie się komórek, apoptozę oraz inne procesy komórkowe. Zaburzenia tych mechanizmów są bezpośrednio zaangażowane w proces karcynogenezy [7, 50]. Liczne badania wykazały wpływ kadmu na rozwój raka płuc, prostaty, nerki, wątroby i żołądka. [50, 53, 57]. Ponieważ kadm cechuje wyższe powinowactwo do metalotionein niż cynk dlatego też wypiera cynk z tych białek [2, 4, 18, 20]. W konsekwencji prowadzi to do zaburzenia homeostazy cynku, co wpływa niekorzystnie na proces transkrypcji, proliferacji i różnicowania komórek [5, 6, 30, 39, 50, 58]

Regulacja ekspresji genów metalotionein

Ekspresja najlepiej poznanych MT-1 i MT-2 jest indukowana przez liczne metale, cytokiny i hormony [20]. Wzrost stężenia MT-1 i MT-2 wiąże się z odpowiedzią na różnego typu czynniki stresowe pochodzenia wewnętrznego np. stany zapalne, jak i zewnętrznego np. ekspozycja na działanie metali ciężkich takich jak Cd [2, 25].

Struktura regionów regulatorowych genów *MT-1* i *MT-2*

Rdzeń promotora genów *MT-1* i *MT-2* zawiera sekwencję TATA oraz region inicjatorowy, do których przyłącza się czynnik transkrypcyjny IID (TFIID, ang. *transcription factor IID*) będący częścią kompleksu preinicjacyjnego uczestniczącego w transkrypcji [25]. W regionie promotorowym znajdują się sekwencje odpowiedzi na: (1) glukokortykoidy (GRE; ang. *glucocorticoid responsive element*), (2) jony metali (MRE; ang. *metal responsive element*), (3) stres oksydacyjny (ARE; ang. *antioxidant responsive element*) oraz sekwencja aktywowana przez czynnik transkrypcyjny STAT (ang. *signal transducers and activator of transcription*). W komórkach

człowieka region promotorowy *MT* zawiera sześć sekwencji MRE [2, 25, 35]. W regionie promotorowym wszystkich genów *MT* znajduje się motyw bogaty w pary GC (GGGGCGGGG), z którym łączą się czynniki transkrypcyjne z rodziny Sp, w tym białko Sp1 (ang. *specificity protein 1*) [25].

Regulacja ekspresji genów *MT-1* i *MT-2* przez jony metali

Geny *MT-1* i *MT-2* w przeciwieństwie do genów *MT-3* i *MT-4* są silnie indukowane w komórkach ssaków przez jony metali włączając w to Zn^{2+} , Cd^{2+} , Hg^{2+} i Cu^{+} . Metale te wiążą się z MT. Nikiel i kobalt również zdolne są do indukcji transkrypcji MT jednakże nie wiążą się z tymi białkami [25, 59]. W regulacji ekspresji genów *MT-1* i *MT-2* przez metale ciężkie biorą udział sekwencje MRE, które są również konieczne do transkrypcji tych genów na poziomie podstawowym. Sekwencje MRE (CTNTGC(G/A)CNCGGCCC) obecne są w wielu kopiach w regionach promotorowych genów *MT* u ssaków. Z sekwencjami MRE oddziałuje zależny od cynku czynnik transkrypcyjny MTF-1 (ang. *metal responsive transcription factor 1*) [2, 25, 54, 60-64]. MTF-1 po raz pierwszy został opisany przez Westina i Schaffnera w 1988 roku jako białko wiążące się z sekwencją MRE, wymagające podwyższonego stężenia Zn do optymalnego wiązania się z DNA. Brak czynnika MTF-1 daje efekt letalny na poziomie rozwoju zarodkowego. Czynnikiem ten niezbędny jest do rozwoju wątroby w życiu płodowym oraz odpowiedzi na stres [25, 64-69]. Gen kodujący ludzki czynnik MTF-1 znajduje się na krótkim ramieniu chromosomu 1 (1p33) i koduje białko zbudowane z 753 aminokwasów. W N-końcowej części MTF-1 znajduje się sześć motywów palca cynkowego (ZF, ang. *zinc finger*) typu Cys2-His2, które odpowiadają za wiązanie się z sekwencjami MRE. W C-końcowej części białka znajduje się domena transaktywacyjna obejmująca

region bogaty w aminokwasy kwaśne, region bogaty w reszty proliny oraz region bogaty w reszty seryny i treoniny. W N-końcowej części MTF-1, bezpośrednio przed motywami ZF znajduje się sekwencja lokalizacji jądrowej (NLS, ang. *nuclear localization signal*), uczestnicząca w translokacji czynnika MTF-1 z cytoplazmy do jądra komórkowego. W regionie bogatym w aminokwasy kwaśne zlokalizowany jest sygnał eksportu jądrowego (NES, ang. *nuclear export signal*) [25, 60, 65-68, 70]. W wyniku działania czynników stresowych takich jak hipoksja, stres oksydacyjny czy ekspozycja na działanie metali, MTF-1 ulega translokacji z cytoplazmy do jądra komórkowego, gdzie bierze udział w regulacji transkrypcji *MT-1* i *MT-2* poprzez bezpośrednie lub pośrednie oddziaływanie z czynnikami transkrypcyjnymi związanymi z RNA polimerazy II [25, 62, 68, 70, 71]. Wiązanie MTF-1 do MRE wymaga wysycenia cynkiem motywów palca cynkowego. Wysokie stężenie metali ciężkich (Cd, Hg) może powodować wypieranie cynku z wewnątrzkomórkowych białek odpowiadających za jego magazynowanie, w wyniku czego wzrasta pula wolnego cynku zdolnego do aktywacji MTF-1. Wolne jony Zn wiążą się z MTF-1 dzięki czemu wzrasta zdolność wiązania się tego czynnika z DNA, co z kolei prowadzi do aktywacji transkrypcji genów *MT* [25, 62, 65, 67, 72, 73]. Ekspresja metalotionein na poziomie podstawowym regulowana jest także przez czynnik transkrypcyjny Sp1, który zawiera trzy motywy palca cynkowego, a jego aktywność zależy od stężenia wolnych jonów Zn^{2+} [25]. Kadm silniej indukuje transkrypcję genów *MT* niż wynikałoby to ze wzrostu siły wiązania MTF-1 z DNA. Sugeruje to, że Cd aktywuje ekspresję *MT* przez mechanizmy niezależne od wzmocnienia oddziaływania MTF-1/DNA. Kadm ma wyższy potencjał oksydacyjny niż cynk i indukuje zjawisko stresu oksydacyjnego oraz spadek stężenia glutationu. Stres oksydacyjny wywołany

ekspozycją na Cd może powodować aktywację transkrypcji genów *MT-1* i *MT-2A* bezpośrednio przez sekwencję ARE, na którą nachodzi sekwencja wiązania czynnika transkrypcyjnego USF (ang. *upstream stimulatory factor*). W warunkach stresu oksydacyjnego dochodzi do zwiększenia dostępności Zn w wyniku utlenienia grup tiolowych MT, co powoduje uwolnienie jonów tego metalu. Kadm wypiera Zn z MT zwiększając tym samym pulę dostępnego cynku zdolnego do wiązania się z motywami palca cynkowego MTF-1 [25, 41, 74, 75]. Oprócz Cd również jony Cu, Pb, Ag, Hg i Bi mogą wypierać Zn z MT [20].

Ważną rolę w regulacji ekspresji genów *MT-1* i *MT-2* odgrywa fosforylacja czynnika MTF-1 [61, 62, 70, 72]. W warunkach fizjologicznych MTF-1 ulega konstytutywnej fosforylacji na resztach seryny i treoniny [60, 65, 71, 73, 76]. Jony metali ciężkich, takie jak Zn i Cd, powodują wzrost poziomu fosforylacji MTF-1. W proces ten zaangażowane są kinaza białkowa C (PKC, ang. *protein kinase C*), kinaza białkowa fosforylująca N-koniec białka Jun (JNK, ang. *Jun N-terminal kinase*), 3-kinaza fosfatydyloinozytolu (PI3K, ang. *phosphoinositol-3 kinase*), kinaza tyrozynowa, II kinaza kazeiny (CK II, ang. *casein kinase II*) oraz szlak sygnałowy z udziałem jonów Ca^{2+} [25, 61, 62, 68, 77]. Analiza sekwencji MTF-1 wykazała obecność konserwatywnie zachowanych potencjalnych miejsc fosforylacji przez PKC, CK II, kinazę tyrozynową i JNK [62, 76, 78]. Indukcja ekspresji genów *MT-1* i *MT-2* przez metale obejmuje trzy zasadnicze etapy, tj. translokację MTF-1 z cytoplazmy do jądra komórkowego, związanie się MTF-1 z sekwencjami MRE oraz aktywację transkrypcji [62, 65]. Wyniki badań sugerują, że poziom fosforylacji MTF-1 może mieć wpływ na translokację tego czynnika transkrypcyjnego do jądra komórkowego oraz na aktywację transkrypcji genów, których ekspresja regulowana jest przez MTF-1. W wyniku ekspozycji komórek na działanie Cd^{2+} i Zn^{2+} dochodzi do nagromadzenia

ufosforylowanej formy MTF-1 w jądrze komórkowym. Zjawisko to może mieć związek z fosforylacją tyrozyny w pozycji 140 łańcucha polipeptydowego, która znajduje się za sekwencją NLS, obejmującą aminokwasy od 133 do 139 (KRKEVKR) [62, 70, 71]. Wzrost poziomu fosforylacji MTF-1 może odgrywać również ważną rolę w indukcji ekspresji genów *MT-1* i *MT-2* przez metale ciężkie. Potwierdzeniem roli fosforylacji w aktywacji transkrypcji genów przez MTF-1 są wyniki badań, których celem było określenie wpływu inhibitorów kinaz białkowych na poziom ekspresji *MT-1* i *MT-2*. Zastosowanie inhibitorów PKC, II kinazy kazeiny i kinazy tyrozynowej prowadziło do zablokowania indukowanej cynkiem i kadmem transkrypcji genów *MT-1* i *MT-2*. Inhibitory kinaz białkowych nie wpływały natomiast na wiązanie się MTF-1 z DNA. Sugeruje to, że wiązanie się białka MTF-1 z MRE jest konieczne, ale niewystarczające do aktywacji transkrypcji genów *MT-1* i *MT-2A* [62, 71, 76]. Kadm poprzez stymulację aktywności licznych kinaz białkowych prowadzi do zaburzenia wielu szlaków transdukcji sygnałów. Wynikiem tych zmian może być wzrost aktywności czynników transkrypcyjnych i nieprawidłowa ekspresja wielu genów. Do czynników transkrypcyjnych, których aktywność wzrasta w wyniku fosforylacji indukowanej przez kadm należy między innymi MTF-1 [68, 73, 77]. Czynnikiem MTF-1 uczestniczy również w regulacji ekspresji ZnT1 (ang. *zinc transporter 1*), α -fetoproteiny, C/EBP α (ang. *CCAAT-enhancer binding protein α*), syntazy γ -glutamylocysteiny (γ -GCS, ang. *γ -glutamylcystein synthase*) oraz γ -glutamylotranspeptydazy [37, 65, 67, 69].

Indukcja ekspresji genów *MT-1* i *MT-2* w wyniku stresu oksydacyjnego

Indukcja ekspresji *MT-1* i *MT-2* w wyniku stresu oksydacyjnego zachodzi z udziałem sekwencji ARE (TGACNNNGC). Na sekwencję ARE nakłada się sekwencja odpowiedzialna za wiązanie się czynnika transkrypcyjnego USF, zwanego także MLTF (ang. *adeno major late transcription factor*). USF/MLTF jest białkiem wiążącym się z DNA dzięki obecności motywu heliks-pętla-heliks (HLH) [25, 59, 67, 79]. Występują trzy izoformy USF, tj. USF-1, USF-2a i USF-2b. USF-1 (42 kDa) i USF-2 (44 kDa) kodowane są przez odrębne geny. W wyniku alternatywnego składowania pierwotnego transkryptu powstają dwie izoformy USF-2 (USF-2a i USF-2b) [75, 80]. Sekwencje ARE biorą udział w regulacji ekspresji genów związanych z odpowiedzią na stres oksydacyjny poprzez oddziaływanie z czynnikiem Nrf-2 (ang. *NF-E2-related factor 2*). Związanie Nrf-2 z sekwencją ARE powoduje ekspresję genów regulowanych przez tę sekwencję, w tym *MT*. Ekspresja tych genów ulega represji w wyniku przyłączenia białek Fos (ang. *Finkel-Biskis-Jinkins murine osteosarcoma*) i Fra-1 (ang. *Fos-related antygen-1*). Innymi genami, których transkrypcja regulowana jest przez sekwencję ARE jest gen podjednostki Ya S-transferazy glutationowej, gen UDP-glukuronylotransferazy oraz inne geny kodujące enzymy biorące udział w drugiej fazie detoksykacji ksenobiotyków [25, 59, 81].

Indukcja ekspresji genów *MT-1* i *MT-2* przez glukokortykoidy

Receptory glukokortykoidów (GR, ang. *glucocorticoid hormone receptor*) znajdują się na terenie cytoplazmy i związane są z białkami szoku cieplnego Hsp (ang. *heat shock protein*), które utrzymują GR w nieaktywnej formie. Glukokortykoidy przechodzą przez błonę komórkową i łączą się z nieaktywnymi monomerami GR, co powoduje odłączenie białek Hsp i

aktywację GR. Aktywowane monomery GR tworzą aktywne homodimery ulegające translokacji do jądra komórkowego, gdzie łączą się z sekwencjami GRE i aktywują transkrypcję. W ludzkich komórkach ekspresja *MT-2A* jest silniej indukowana przez glukokortykoidy niż *MT-1* [2, 25].

Rola metalotionein i kadmu w rozwoju nowotworów

Wpływ kadmu na regulację ekspresji genów i szlaki przekazywania sygnałów w komórce

Zaburzenia regulacji ekspresji genów stanowią podstawę procesu nowotworzenia. Jony kadmu indukują geny natychmiastowej odpowiedzi na mitogeny (IERG, ang. *immediate early response gene*), które kodują czynniki transkrypcyjne zaangażowane w proces proliferacji i różnicowania się komórek. Produkty białkowe genów IERG stymulują podziały komórek, a ich nadekspresja jest często obserwowana w wielu typach nowotworów [7, 49, 77]. Do genów IERG, których ekspresja indukowana jest przez kadm zalicza się komórkowe onkogeny Fos, Jun, Myc [7, 52, 61, 74]. Protoonkogeny Fos i Jun kodują białka tworzące czynnik transkrypcyjny AP-1 (ang. *activating protein 1*), który reguluje ekspresję wielu genów kontrolujących wzrost i różnicowanie się komórek [7, 53, 74, 82, 83]. Aktywacja protoonkogenów Jun i Fos przez kadm uważana jest za główny mechanizm transformacji nowotworowej indukowanej przez ten metal [7]. W wyniku ekspozycji na kadm dochodzi również do aktywacji innych czynników transkrypcyjnych takich jak MTF-1, USF, NF- κ B (ang. *nuclear factor κ B*), Nrf-2 i TFIIH (ang. *transcription factor IIIH*) [7, 52, 61, 74].

Jony kadmu indukują również ekspresję genów odpowiedzi na stres, do których zalicza się geny metalotionein i białek szoku cieplnego, białek biorących udział w odpowiedzi na stres oksydacyjny i kontrolujących syntezę glutationu [7, 44, 52]. Hsp to grupa zróżnicowanych białek o masie cząsteczkowej w granicach 25 – 110 kDa, odpowiadających za przeżycie komórki w warunkach stresu [7, 83]. Kadm powoduje powstawanie zdenaturowanych lub nieprawidłowo zwiniętych białek w wyniku zmiany ich struktury na drodze wiązania się z grupami tiolowymi lub poprzez podstawienie cynku. Pojawienie się w komórce białek o nieprawidłowej strukturze jest sygnałem prowadzącym do indukcji ekspresji białek Hsp [7].

Glutation oraz białka zawierające liczne grupy tiolowe odgrywają kluczową rolę w obronie komórki przed toksycznym działaniem kadmu [7, 49]. Kadm nie uczestniczy w reakcji Fentona, ponieważ w warunkach fizjologicznych nie jest ani donorem ani akceptorem elektronów, jednakże powoduje wzrost stężenia reaktywnych form tlenu (ROS, ang. *reactive oxygen species*) w sposób pośredni poprzez wpływ na system antyoksydacyjny komórki [7, 84]. Ważną rolę w usuwaniu ROS, powstających w wyniku działania kadmu, odgrywa peroksydaza glutationowa i reduktaza glutationowa, odpowiadające za cykl oksydoredukcyjny GSH. Jednakże kadm silnie hamuje aktywność peroksydazy glutationowej i innych enzymów, takich jak dysmutaza ponadtlenkowa i katalaza, które uczestniczą w usuwaniu wolnych rodników powstających w komórce w wyniku procesów fizjologicznych. Pod wpływem działania kadmu w komórce dochodzi do indukcji ekspresji genu γ -GCS oraz S-transferazy glutationowej. Enzymy te odpowiadają za syntezę glutationu, którego podwyższone stężenie umożliwia szybką i efektywną eliminację kadmu [6, 7, 44, 49, 74, 77]. Jony kadmu powodują również wzrost wewnątrzkomórkowego

stężenia Ca^{2+} . Jony wapnia wpływają bezpośrednio na ekspresję wielu genów poprzez czynnik transkrypcyjny CREB (ang. *cAMP-response element binding protein*). Kadm może również pośrednio uczestniczyć w aktywacji kinaz białkowych, które poprzez fosforylację określonych czynników transkrypcyjnych powodują wzrost ich aktywności. Do kinaz tych zalicza się kinazę białkową C, kinazę tyrozynową, CK II oraz kinazy rodziny MAPK (ang. *mitogen activated protein kinase*), tj. kinazy ERK (ang. *extracellular signal regulated kinase*), JNK i p38 [7, 49, 74, 77, 83].

Kadm a apoptoza

Apoptoza odgrywa istotną rolę w homeostazie komórkowej i embriogenezie. Prawidłowy przebieg tego procesu zapewnia właściwy wzrost i rozwój narządów oraz różnicowanie komórek. W wyniku apoptozy dochodzi również do eliminacji uszkodzonych i nieprawidłowych komórek [85, 86]. Apoptoza obejmuje szereg zmian morfologicznych, do których zaliczamy obkurczanie się komórek, kondensację chromatyny, fragmentację jądra komórkowego, powstawanie ciałek apoptotycznych oraz biochemicznych takich jak fragmentacja DNA, proteoliza białek strukturalnych i enzymatycznych [86-88]. Do inicjacji programowanej śmierci komórki może dojść w wyniku działania czynników uszkodzających DNA i zaburzających cykl komórkowy, aktywacji określonych receptorów błonowych, szoku cieplnego, stresu oksydacyjnego oraz promieniowania jonizującego [86]. Również jony kadmu mogą prowadzić do apoptozy [5, 7, 84, 89, 90]. Podatność na apoptozę indukowaną kadmem zależy od stężenia metalotionein, które wiążąc ten metal chronią komórkę przed jego toksycznym działaniem [90, 91]. W czasie apoptozy indukowanej jonami kadmu dochodzi do zwiększenia przepuszczalności błony mitochondrialnej, uwolnienia

cytochromu c oraz aktywacji prokaspazy 9. Kadm powoduje wzrost ekspresji proapoptotycznego białka Bad (ang. *Bcl-2 antagonist of cell death*), które powoduje niestabilność błony mitochondrialnej. Kadm zwiększa przepuszczalność błony mitochondrialnej w wyniku koordynacyjnego wiązania się z grupami tiolowymi białek budujących tę błonę oraz zaburza działanie łańcucha oddechowego, przez co wzrasta w komórce stężenie reaktywnych form tlenu. Antyoksydanty komórkowe, do których zaliczamy również MT chronią komórkę przed apoptozą indukowaną kadmem [7, 90, 92]. Zmiany zachodzące w czasie indukcji apoptozy przez kadm charakterystyczne są dla szlaku wewnętrznego, zwanego inaczej mitochondrialnym [85-87]. Ponadto, Aimola i wsp. [93] wykazali, że w komórkach nowotworowych prostaty kadm indukuje apoptozę zależną od białka p53.

Kadm a naprawa uszkodzeń DNA

Uszkodzenia DNA mogą powstawać w wyniku działania czynników egzogennych takich jak mutagenne związki chemiczne oraz promieniowanie jonizujące i UV. Endogennymi przyczynami uszkodzeń DNA są ROS powstające w łańcuchu oddechowym oraz błędy w procesie replikacji. Uszkodzenia te jeżeli nie zostaną usunięte powodują powstawanie mutacji, które mogą być przyczyną rozwoju nowotworu [7]. W każdej komórce istnieje szereg mechanizmów naprawy DNA, których zadaniem jest zachowanie integralności genomu. Kadm może przyczyniać się do wzrostu częstości powstawania mutacji poprzez hamowanie systemów naprawy DNA [7, 49, 53, 94]. Metal ten uniemożliwia rozpoznanie uszkodzeń DNA usuwanych za pomocą systemu NER (ang. *nucleotide excision repair*) poprzez wiązanie się z białkiem XPA (ang. *xeroderma pigmentosum, complementation group A*) odpowiedzialnym za

ten etap [7, 95, 96]. W wyniku utlenienia dGTP powstaje 8-okso-dGTP, którego obecność w DNA jest przyczyną transwersji AT→CG w czasie replikacji. Kadm może prowadzić do wzrostu liczby mutacji i rozwoju nowotworu poprzez hamowanie aktywności 8-okso-dGTPazy, odpowiadającej za usuwanie 8-okso-dGTP z DNA. [7, 49].

Hamowanie metylacji DNA przez kadm

Metylacja wysp CpG jest procesem epigenetycznym prowadzącym do wyciszenia ekspresji określonych genów. Enzymem katalizującym metylację cytozyny w pozycji 5' jest metylotransferaza DNA [25, 97, 98]. Kadm powoduje spadek aktywności tego enzymu, co prowadzi do obniżenia poziomu metylacji DNA i nadekspresji protoonkogenów. Aktywacja onkogenów komórkowych jest jednym z podstawowych mechanizmów transformacji nowotworowej [7, 49].

Wpływ kadmu na adhezję międzykomórkową

E-kadheryna jest charakterystyczną dla komórek epitelialnych transbłonową glikoproteiną wiążącą jony wapnia i odpowiadającą za adhezję międzykomórkową. Domena wewnątrzkomórkowa E-kadheryny wiąże się z kateniną β , która oddziałuje z cytoszkieletem aktynowym. Część zewnątrzkomórkowa E-kadheryny zawiera miejsca wiązania jonów wapnia, które są niezbędne dla prawidłowego funkcjonowania tego białka oraz domeny odpowiedzialne za oddziaływanie kadheryna-kadheryna w przylegających komórkach [7, 99]. Jony Ca^{2+} w domenie zewnątrzkomórkowej mogą być wypierane przez Cd^{2+} . W wyniku tego dochodzi do zmiany konformacji tej domeny i zaburzenia adhezji międzykomórkowej. Osłabienie przylegania komórek ułatwia proces przerzutowania nowotworu. Zmiana konformacji

E-kadheryny w wyniku wyparcia jonów wapnia prowadzi również do odłączenia kateniny β od cytoszkieletu i jej translokację do jądra komórkowego, gdzie łącząc się z czynnikami transkrypcyjnymi wpływa na ekspresję protoonkogenów takich jak Jun i Myc. Zaburzenie ekspresji onkogenów komórkowych w wyniku uwolnienia kateniny β z kompleksów z E-kadheryny może stanowić ważny krok w procesie nowotworzenia [7, 100-104].

Udział kadmu i metalotionein w regulacji aktywności czynników transkrypcyjnych

Rola motywów palca cynkowego i jonów cynku w procesie karcynogenezy

Motyw palca cynkowego występuje w wielu grupach białek, do których zalicza się czynniki transkrypcyjne oraz białka systemów naprawy uszkodzeń DNA. Palce cynkowe stanowią domeny białkowe składające się najczęściej z 30 – 40 aminokwasów, a przestrzenna struktura tych domen utrzymywana jest przez koordynacyjne wiązanie cynku przez grupy tiolowe cystein i/lub pierścienie imidazolowe histydyn. Cynk nie oddziałują bezpośrednio z DNA, ale jest niezbędny dla utrzymania prawidłowej konformacji motywów ZF [96]. Struktura palców cynkowych może zostać zaburzona w wyniku podstawienia cynku przez kadm, który tworzy wysoce stabilne wiązania z grupami tiolowymi wchodzącymi w skład tych domen. Konsekwencją tego jest utrata zdolności wiązania się białek zawierających palce cynkowe z DNA i zaburzenia ekspresji genów i naprawy uszkodzeń DNA [89, 96]. Ważnym czynnikiem wpływającym na aktywność białek zawierających motyw ZF jest deficyt jonów cynku. W przypadku niedoboru tego pierwiastka obserwuje się wzrost częstości uszkodzeń DNA oraz ryzyka rozwoju nowotworu w wyniku działania związków karcynogennych [39]. Objawy niedoboru Zn w komórce niekoniecznie wynikają

z braku tego metalu w diecie, ale mogą być związane z nadekspresją MT, która powoduje obniżenie stężenia wolnych jonów cynku poprzez silne ich wiązanie [105].

Regulacja aktywności białka p53 przez kadm i metalotioneiny

Białko p53, będące produktem genu supresorowego, uczestniczy w odpowiedzi komórki na uszkodzenia DNA, hipoksję, stres oksydacyjny i aktywację onkogenów [106-108]. Białko p53 nazywane jest „strażnikiem genomu” ponieważ główną jego funkcją jest zachowanie integralności genomu. Jeżeli uszkodzenia DNA powstające w wyniku działania czynników stresowych są możliwe do usunięcia przez komórkę, to białko p53 prowadzi do zatrzymania cyklu komórkowego w fazie G1 lub G2 dając tym samym komórce czas na naprawę DNA. W przeciwnym wypadku białko p53 kieruje komórkę na drogę apoptozy [39, 106, 108-111]. Białko p53 jest czynnikiem transkrypcyjnym odgrywającym istotną rolę w regulacji cyklu komórkowego, naprawie uszkodzeń DNA oraz apoptozie [39, 112-115]. Białko p53 pełni funkcję inhibitora proliferacji komórek poprzez nasilenie ekspresji genów regulujących cykl komórkowy, np. genu p21, którego produkt jest inhibitorem kinaz zależnych od cyklin – CDK (ang. *cyclin-dependent kinases*) i decyduje o zatrzymaniu cyklu komórkowego w punkcie kontrolnym G1/S [107, 109, 115-118]. Białko p21 prowadzi do zahamowania replikacji oraz wpływa na naprawę uszkodzeń DNA w wyniku oddziaływania z białkiem PCNA (ang. *proliferating cell nuclear antigen*), które jest ważnym czynnikiem biorącym udział w systemach naprawy DNA poprzez wycinanie nukleotydów i zasad azotowych. [115, 117]. Ekspozycja komórek na działanie kadmu prowadzi do nasilenia ekspresji białka p53, a co za tym idzie również białka p21.

W wyniku wzrostu stężenia białka p21 dochodzi do obniżenia ekspresji CDK1, CDK2 oraz cykliny A i B, a tym samym do zatrzymania cyklu komórkowego w punkcie kontrolnym G2/M [116; 118, 119]. Białko p53 indukuje również ekspresję białka GADD45 (ang. *growth arrest and DNA damage 45*) odpowiedzialnego za zahamowanie wzrostu komórki i odpowiedź na uszkodzenia DNA w punkcie kontrolnym G2/M. Kolejnymi białkami, których ekspresja zależy od białka p53 jest białko 14-3-3 σ , uczestniczące w transdukcji sygnału prowadzącego do zatrzymania cyklu komórkowego w czasie przejścia komórki z fazy G2 do M oraz szereg białek proapoptotycznych, do których zalicza się białko Bax (ang. *Bcl-2-associated x protein*) regulujące przepuszczalność błony mitochondrialnej oraz receptor śmierci – Fas [29, 119]. Cynk ma zasadnicze znaczenie dla utrzymania prawidłowej konformacji i stabilności białka p53. Jony tego metalu wpływają również na powinowactwo p53 do specyficznych sekwencji DNA oraz na aktywność transkrypcyjną tego białka [29, 107, 108, 113, 120, 121]. Niedobór Zn może prowadzić do powstania uszkodzeń DNA indukujących ekspresję p53. Jednakże zbyt niski poziom cynku może prowadzić do nieprawidłowego formowania motywów ZF białka p53, co znacznie obniża zdolność wiązania się tego białka z DNA i prowadzi do zaburzeń ekspresji genów niezbędnych do naprawy powstałych uszkodzeń DNA. Badania prowadzone przez Méplan i wsp. [122] wykazały, że ekspozycja komórek na działanie kadmu prowadzi do zaburzenia prawidłowej struktury białka p53 i zahamowania jego wiązania z DNA. Inaktywacja p53 jest wynikiem podstawienia cynku przez kadm [29, 39, 58, 112]. Zahamowanie aktywności białka p53 przez kadm może odgrywać kluczową rolę w procesie nowotworzenia z udziałem tego metalu [122]. Do deficytu cynku w komórce może dochodzić na skutek nadekspresji apo-MT wywołanej stresem

oksydacyjnym i działaniem metali ciężkich [97, 113, 123]. Apo-MT-1 wiąże się z białkiem p53, co uniemożliwia wiązanie się tego ostatniego z DNA oraz chroni tioneinę przed degradacją. Apo-MT wiąże się za pomocą grup tiolowych z cynkiem obecnym w cząsteczce p53. Tioneina, poprzez chelatowanie Zn^{2+} , hamuje również aktywność innych czynników transkrypcyjnych takich jak TFIIA (ang. *transcription factor IIA*) i Sp1. Istnieją również doniesienia o bezpośrednim oddziaływaniu apo-MT z motywami palca cynkowego TFIIA [113]. Utrata funkcji białka p53 (w wyniku mutacji lub niedoboru cynku) prowadzi do niestabilności genetycznej, wzrostu aktywności proliferacyjnej komórki, braku kontroli cyklu komórkowego w punkcie kontrolnym G1/S oraz oporności na apoptozę [115].

Regulacja aktywności czynnika NF- κ B przez metalotioneiny

NF- κ B/Rel (ang. *nuclear factor κ B/ viral oncogene v-rel homolog - reticuloendotheliosis*) jest to rodzina dimerycznych czynników transkrypcyjnych, charakteryzujących się obecnością homologicznej domeny Rel (RHD, ang. *Rel homology domain*). Domena RHD składa się z około 300 aminokwasów. W jej obrębie znajduje się miejsce wiązania się z DNA, sekwencja odpowiedzialna za dimeryzację, sygnał lokalizacji jądrowej oraz miejsce wiązania inhibitora I κ B (ang. *inhibitor κ B*) [124-126]. Klasyczny czynnik NF- κ B jest heterodimerem składającym się z podjednostki p65 i p50 [125-127]. Czynnik jądrowy κ B występuje w cytoplazmie w formie nieaktywnego kompleksu ze specyficznym białkiem inhibitorowym określanym jako I κ B. Aktywacja NF- κ B zachodzi w wyniku fosforylacji i ubikwityno-zależnej degradacji I κ B. Aktywny dimer p65/p50 ulega translokacji do jądra komórkowego, gdzie wiąże się z sekwencjami κ B w DNA [30, 74, 126].

Czynnikami aktywującymi NF- κ B są między innymi czynnik martwicy nowotworu (TNF α , ang. *tumor necrosis factor α*), promieniowanie, chemioterapeutyki, erytropoetyna, interleukina 1 [124-126]. Czynniki NF- κ B chroni komórkę przed apoptozą oraz pełni ważną rolę w kontroli proliferacji komórek i onkogenezie [30, 74, 126, 127]. Obok aktywności antyapoptotycznej czynniki NF- κ B wykazują również działanie proapoptyczne poprzez nasilenie ekspresji p53 [128].

Zaburzenia procesu aktywacji NF- κ B w wyniku destabilizacji I κ B zaobserwowano we wczesnych etapach transformacji nowotworowej. Białko NF- κ B uczestniczy w przekazywaniu sygnałów indukujących proliferację komórek. Czynniki ten bezpośrednio aktywuje protoonkogen *myc*. Interleukiny i czynniki wzrostu wpływają na podziały komórek poprzez aktywację NF- κ B [126]. Opisywany czynniki transkrypcyjny stymuluje proliferację komórek poprzez indukcję ekspresji genu cykliny D1 [124]. Ważnymi regulatorami aktywności NF- κ B są jony cynku i metalotioneiny. Badania prowadzone przez Kim i wsp. [30] wykazały, że wysokie stężenie Zn²⁺ hamuje wiązanie się NF- κ B z DNA. Wzrost ekspresji MT wywołuje spadek stężenia Zn, co prowadzi do przywrócenia zdolności wiązania się NF- κ B z DNA. Czynniki indukujące ekspresję MT przyczyniają się do aktywacji NF- κ B, a co za tym idzie do stymulacji proliferacji komórek i hamowania apoptozy. MT wiąże się z podjednostką p50 i ulega translokacji do jądra komórkowego w połączeniu z aktywnym czynnikiem NF- κ B. MT stabilizuje wiązanie czynnika jądrowego κ B z odpowiednimi sekwencjami DNA [30, 33, 78, 113]. Czynniki wpływające na poziom wolnych jonów cynku i ekspresję metalotionein pośrednio uczestniczą w regulacji aktywności transkrypcyjnej NF- κ B [105]. Do czynników

tych zaliczamy jony kadmu, reaktywne formy tlenu i azotu powstające w warunkach stresu oksydacyjnego [25, 35].

Metalotioneiny a nowotwory piersi

Spośród siedmiu funkcjonalnych izoform MT-1 w komórkach nowotworów piersi wykryto mRNA dla *MT-1A*, *MT-1E*, *MT-1F*, *MT-1G*, *MT-1H* i *MT-1X*. W guzach piersi ekspresji nie ulega *MT-1B*. Jednakże spośród wyżej wymienionych izoform metalotionein najwyższe stężenie osiągały *MT-1E* i *MT-1F* i te białka uznaje się za charakterystyczne dla przewodowego raka piersi [15, 21, 58, 129, 130]. Ekspresja *MT-1E* jest negatywnie skorelowana z obecnością receptora estrogenowego (ER, ang. *estrogen receptor*). Stężenie mRNA *MT-1E* w komórkach nowotworowych charakteryzujących się brakiem funkcjonalnego receptora estrogenowego jest wyższe niż w komórkach z prawidłowym ER [15, 58, 131, 132]. Ekspresja receptora estrogenowego jest ważnym czynnikiem prognostycznym w nowotworach piersi. Brak prawidłowo funkcjonującego receptora dla estrogenów świadczy o złym rokowaniu i oporności na terapię hormonalną. Estrogeny odgrywają istotną rolę w prawidłowym rozwoju piersi oraz wpływają na rozwój raka piersi [131, 133]. Aktywne receptory estrogenowe pełnią funkcję czynników transkrypcyjnych regulujących ekspresję genów mających wpływ na wzrost i proliferację komórek [131, 133, 134]. Przyjmuje się, że w przypadku ekspresji nieprawidłowego receptora estrogenowego, jego funkcje w regulacji proliferacji komórki przejmuje *MT-1E*. Stąd może wynikać podwyższona ekspresja tej izoformy w nowotworach piersi posiadających zmutowany ER [131]. *MT-1F* obok *MT-2* jest główną izoformą wpływająca na proliferację komórek przewodowego raka piersi [15, 58]. Znacząco wyższy poziom ekspresji *MT-1F* charakterystyczny jest dla nowotworów o większej złośliwości histologicznej. Sugeruje to, że *MT-1F*

wpływa na procesy różnicowania się komórek w przewodowym raku piersi. Wysoki poziom ekspresji MT-1F w komórkach nowotworowych wskazuje na gorsze rokowanie [130]. *MT-2A* osiąga najwyższe stężenie spośród wszystkich izoform MT ulegających ekspresji w nowotworach piersi [15, 21, 58]. Poziom ekspresji *MT-2* jest pozytywnie skorelowany z aktywnością proliferacyjną komórek. Wykazano, że nadekspresja *MT-2A* powoduje dwukrotny wzrost liczby podziałów komórkowych, podczas gdy w przypadku nadekspresji *MT-1E* i *MT-3* nie obserwowano takiego efektu [21]. Potwierdzeniem wpływu *MT-2A* na proliferację komórek jest korelacja między poziomem ekspresji tej izoformy metalotionein a ekspresją Ki-67, markera proliferacji [123]. Zarówno stężenie *MT-2A* jak i mRNA dla tej izoformy jest wyższe w nowotworach bardziej zaawansowanych niż w nowotworach w niższych stadiach rozwoju. Silna korelacja między ekspresją *MT-2A* a aktywnością proliferacyjną nowotworów piersi wskazuje na potencjalne znaczenie tej izoformy w procesie karcynogenezy [123]. Wojnar i wsp. [135] wykazali wyższy poziom ekspresji *MT-1* i *MT-2A* w rakach piersi w najwyższym stopniu zaawansowania w porównaniu do pozostałych nowotworów. Ponadto ekspresja *MT-1* i *MT-2* była pozytywnie skorelowana z ekspresją markerów proliferacji takich jak Ki-67 i MCM-2 [135, 136]. Na ryzyko zachorowania na raka piersi wydają się mieć również wpływ polimorfizmy pojedynczych nukleotydów stwierdzone w genach metalotionein [137]. *MT-4* nie ulega ekspresji ani w prawidłowych ani w nowotworowych komórkach raka piersi. Natomiast około 90% przypadków raka piersi wykazuje ekspresję *MT-3*, której nie obserwuje się w tkance prawidłowej [123, 138]. Obecność *MT-3* w komórkach guza świadczy o złym rokowaniu [15, 58, 138]. Nadekspresja tego białka jest przyczyną wysokiego stężenia apo-MT, co prowadzi do niedoboru cynku i zaburzenia fundamentalnych procesów komórkowych [15].

Podsumowanie

Metalotioneiny to grupa powszechnie występujących białek, które uczestniczą w utrzymaniu homeostazy jonów metali ciężkich głównie cynku i kadmu, ochronie przed ich toksycznym działaniem oraz ochronie przed stresem oksydacyjnym. Zmiany ekspresji metalotionein oraz akumulacja jonów kadmu mogą prowadzić do zaburzenia wielu procesów komórkowych, takich jak proliferacja komórek, apoptoza, transmisja sygnału, odpowiedź na stres oksydacyjny, a tym samym przyczyniać się do rozwoju nowotworów, w tym raka piersi.

Praca finansowana w ramach Grantu Prezydenta Miasta Łodzi na realizację pracy magisterskiej o Łodzi dla Ewy Formy na projekt pt.: „Udział kadmu i polimorfizmu genu metalotioneiny w nowotworzeniu piersi kobiet z Łodzi i regionu łódzkiego”

Piśmiennictwo

1. Arriaga JM, Levy EM, Bravo AI, Bayo SM, Amat M, Aris M i wsp. Metallothionein expression in colorectal cancer: relevance of different isoforms for tumor progression and patient survival. *Hum Pathol.* 2012; 43: 197-208.
2. Sabolic I, Breljak D, Skarica M, Herak-Kramberger CM. Role of metallothionein in cadmium traffic and toxicity in kidneys and other mammalian organs. *Biometals.* 2010; 23: 897-926.
3. Babula P, Masarik M, Adam V, Eckschlager T, Stiborova M, Trnkova L i wsp. Mammalian metallothioneins: properties and functions. *Metallomics.* 2012; 4: 739-750.
4. Chasapis CT, Loutsidou AC, Spiliopoulou CA, Stefanidou ME. Zinc and human health: an update. *Arch Toxicol.* 2012; 86: 521-534.
5. Hartwig A. Mechanisms in cadmium-induced carcinogenicity: recent insights. *Biometals.* 2010; 23: 951-960.

6. Joseph P. Mechanisms of cadmium carcinogenesis. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2009; 238: 272-279.
7. Waisberg M, Joseph P, Hale B, Beyersmann D. Molecular and cellular mechanisms of cadmium carcinogenesis. *Toxicology.* 2003; 192: 95-117.
8. Werynska B, Pula B, Muszczynska-Bernhard B, Gomulkiewicz A, Piotrowska A, Prus R i wsp. Metallothionein 1F and 2A overexpression predicts poor outcome of non-small cell lung cancer patients. *Exp Mol Pathol.* 2012; 94: 301-308.
9. Forma E, Krzeslak A, Wilkosz J, Jozwiak P, Szymczyk A, Rozanski W i wsp. Metallothionein 2A genetic polymorphisms and risk of prostate cancer in a Polish population. *Cancer Genet.* 2012; 205: 432-435.
10. Gumulec J, Masarik M, Krizkova S, Hlavna M, Babula P, Hrabec R i wsp. Evaluation of alpha-methylacyl-CoA racemase, metallothionein and prostate specific antigen as prostate cancer prognostic markers. *Neoplasma.* 2012; 59: 191-201.
11. Yan DW, Fan JW, Yu ZH, Li MX, Wen YG, Li DW, Zhou CZ, Wang XL, Wang Q, Tang HM, Peng ZH. Downregulation of metallothionein 1F, a putative oncosuppressor, by loss of heterozygosity in colon cancer tissue. *Biochim Biophys Acta.* 2012; 1822: 918-926.
12. Schöpfer J, Drasch G, Schrauzer GN. Selenium and cadmium levels and ratios in prostates, livers, and kidneys of nonsmokers and smokers. *Biol Trace Elem Res.* 2010; 134: 180-187.
13. Sakamoto LH, DE Camargo B, Cajaiba M, Soares FA, Vettore AL. MT1G hypermethylation: a potential prognostic marker for hepatoblastoma. *Pediatr Res.* 2010; 67: 387-393.
14. Vašák M, Meloni G. Chemistry and biology of mammalian metallothioneins. *J Biol Inorg Chem.* 2011; 16: 1067-1078.
15. Cherian MG, Jayasurya A, Bay BH. Metallothioneins in human tumors and potential roles in carcinogenesis. *Mutat Res.* 2003; 533: 201-209.
16. Palacios O, Atrian S, Capdevila M. Zn- and Cu-thioneins: a functional classification for metallothioneins? *J Biol Inorg Chem.* 2011; 16: 991-1009.
17. Cai B, Zheng Q, Teng XC, Chen D, Wang Y, Wang KQ i wsp. The role of Thr5 in human neuron growth inhibitory factor. *J Biol Inorg Chem.* 2006; 11: 476-482.
18. Romero-Isart N, Vašák M. Advances in the structure and chemistry of metallothioneins. *J Inorg Biochem.* 2002; 88: 388-396.
19. Vašák M. Advances in metallothionein structure and functions. *J Trace Elem Med. Biol.* 2005; 19: 13-17.

20. Coyle P, Philcox JC, Carey LC, Rofe AM. Metallothionein: the multipurpose protein. *Cell Mol Life Sci.* 2002; 59: 627-647.
21. Jin R, Huang J, Tan PH, Bay BH. Clinicopathological significance of metallothioneins in breast cancer. *Pathol Oncol Res.* 2004; 10: 74-79.
22. Sutherland DE, Summers KL, Stillman MJ. Noncooperative metalation of metallothionein 1a and its isolated domains with zinc. *Biochemistry.* 2012; 51: 6690-700.
23. Maret W. The function of zinc metallothionein: a link between cellular zinc and redox state. *J Nutr.* 2000; 130(5S Suppl): 1455-1458
24. Rigby KE, Stillman MJ. Structural studies of metal-free metallothionein. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004; 325: 1271-1278.
25. Haq F, Mahoney M, Koropatnick J. Signaling events for metallothionein induction. *Mutat Res.* 2003; 533: 211-226.
26. Davis SR, Cousins RJ. Metallothionein expression in animals: a physiological perspective on function. *J Nutr.* 2000; 130: 1085-1088.
27. Tapiero H, Tew KD. Trace elements in human physiology and pathology: zinc and metallothioneins. *Biomed Pharmacother.* 2003; 57: 399-411.
28. Jayasurya A, Bay BH, Yap WM, Tan NG, Tan BK. Proliferative potential in nasopharyngeal carcinoma: correlations with metallothionein expression and tissue zinc levels. *Carcinogenesis.* 2000; 21: 1809-1812.
29. Méplan 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; 19: 5227-5236.
30. Kim CH, Kim JH, Lee J, Ahn YS. Zinc-induced NF-kappaB inhibition can be modulated by changes in the intracellular metallothionein level. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2003; 190: 189-196.
31. Tanji K, Irie Y, Uchida Y, Mori F, Satoh K, Mizushima Y i wsp. Expression of metallothionein-III induced by hypoxia attenuates hypoxia-induced cell death in vitro. *Brain Res.* 2003; 976: 125-129.
32. Thirumoorthy N, Shyam Sunder A, Manisenthil Kumar K, Senthil Kumar M, Ganesh G, Chatterjee M. A review of metallothionein isoforms and their role in pathophysiology. *World J Surg Oncol.* 2011; 9: 54.
33. Vasák M, Hasler DW. Metallothioneins: new functional and structural insights. *Curr Opin Chem Biol.* 2000; 4: 177-183.
34. Quaife CJ, Kelly EJ, Masters BA, Brinster RL, Palmiter RD. Ectopic expression of metallothionein-III causes pancreatic acinar cell necrosis in transgenic mice. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1998; 148: 148-157.

35. Sato M, Kondoh M. Recent studies on metallothionein: protection against toxicity of heavy metals and oxygen free radicals. *Tohoku J Exp Med.* 2002; 196: 9-22.
36. Quaife CJ, Findley SD, Erickson JC, Froelick GJ, Kelly EJ, Zambrowicz BP i wsp. Induction of a new metallothionein isoform (MT-IV) occurs during differentiation of stratified squamous epithelia. *Biochemistry.* 1994; 33: 7250-7259.
37. Eide DJ. Zinc transporters and the cellular trafficking of zinc. *Biochim Biophys Acta.* 2006; 1763: 711-722.
38. Giles NM, Watts AB, Giles GI, Fry FH, Littlechild JA, Jacob C. Metal and redox modulation of cysteine protein function. *Chem Biol.* 2003; 10: 677-693.
39. Ho E. Zinc deficiency, DNA damage and cancer risk. *J Nutr Biochem.* 2004; 15: 572-578.
40. Bryś M, Nawrocka AD, Miekoś E, Zydek C, Foksiński M, Barecki A, Krajewska WM. Zinc and cadmium analysis in human prostate neoplasms. *Biol Trace Elem Res.* 1997; 59: 145-152.
41. Maret W. Redox biochemistry of mammalian metallothioneins. *J Biol Inorg Chem.* 2011; 16: 1079-1086.
42. Maret W, Jacob C, Vallee BL, Fischer EH. Inhibitory sites in enzymes: zinc removal and reactivation by thionein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999; 96: 1936-1940.
43. Namdarghanbari M, Wobig W, Krezoski S, Tabatabai NM, Petering DH. Mammalian metallothionein in toxicology, cancer, and cancer chemotherapy. *J Biol Inorg Chem.* 2011; 16: 1087-1101.
44. Cuyppers A, Plusquin M, Remans T, Jozefczak M, Keunen E, Gielen H i wsp. Cadmium stress: an oxidative challenge. *Biometals.* 2010; 23: 927-940.
45. Pappas RS. Toxic elements in tobacco and in cigarette smoke: inflammation and sensitization. *Metallomics.* 2011; 3: 1181-1198.
46. Fatur T, Tusek M, Falnoga I, Scancar J, Lah TT, Filipic M. DNA damage and metallothionein synthesis in human hepatoma cells (HepG2) exposed to cadmium. *Food Chem Toxicol.* 2002; 40: 1069-1076.
47. Himeno S. Application of metallothionein null cells to investigation of cadmium transport. *J Inorg Biochem.* 2002; 88: 207-212.
48. Mlynek V, Skoczyńska A. Prozapalne działanie kadmu, *Postępy Hig. Med. Dośw.* 2005; 59: 1-8.
49. Stavrides JC. Lung carcinogenesis: pivotal role of metals in tobacco smoke. *Free Radic Biol Med.* 2006; 41: 1017-1030.

50. Templeton DM, Liu Y. Multiple roles of cadmium in cell death and survival. *Chem Biol Interact.* 2010; 188: 267-275.
51. Kakkar P, Jaffery FN. Biological markers for metal toxicity. *Environ Toxicol Pharmacol.* 2005; 19: 335-349.
52. Liu J, Kadiiska MB, Corton JC, Qu W, Waalkes MP, Mason RP i wsp. Acute cadmium exposure induces stress-related gene expression in wild-type and metallothionein-I/II-null mice. *Free Radic Biol Med.* 2002; 32: 525-535.
53. Waalkes MP. Cadmium carcinogenesis in review. *J Inorg Biochem.* 2000; 79: 241-244.
54. Kita K, Miura N, Yoshida M, Yamazaki K, Ohkubo T, Imai Y i wsp. Potential effect on cellular response to cadmium of a single-nucleotide A --> G polymorphism in the promoter of the human gene for metallothionein IIA. *Hum Genet.* 2006; 120: 553-560.
55. Lu J, Jin T, Nordberg G, Nordberg M. Metallothionein gene expression in peripheral lymphocytes and renal dysfunction in a population environmentally exposed to cadmium. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2005; 206: 150-156.
56. Garrett SH, Phillips V, Somji S, Sens MA, Dutta R, Park S i wsp. Transient induction of metallothionein isoform 3 (MT-3), c-fos, c-jun and c-myc in human proximal tubule cells exposed to cadmium. *Toxicol Lett.* 2002; 126: 69-80.
57. Klaassen CD, Liu J, Diwan BA. Metallothionein protection of cadmium toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2009; 238: 215-220.
58. Theocharis SE, Margeli AP, Klijanienko JT, Kouraklis GP. Metallothionein expression in human neoplasia. *Histopathology.* 2004; 45: 103-118.
59. Bi Y, Palmiter RD, Wood KM, Ma Q. Induction of metallothionein I by phenolic antioxidants requires metal-activated transcription factor 1 (MTF-1) and zinc. *Biochem J.* 2004; 380: 695-703.
60. Laity JH, Andrews GK. Understanding the mechanisms of zinc-sensing by metal-response element binding transcription factor-1 (MTF-1). *Arch Biochem Biophys.* 2007; 463: 201-210.
61. LaRochelle O, Gagné V, Charron J, Soh JW, Séguin C. Phosphorylation is involved in the activation of metal-regulatory transcription factor 1 in response to metal ions. *J Biol Chem.* 2001; 276: 41879-41888.
62. Saydam N, Adams TK, Steiner F, Schaffner W, Freedman JH. Regulation of metallothionein transcription by the metal-responsive transcription factor MTF-1: identification of signal transduction cascades that control metal-inducible transcription. *J Biol Chem.* 2002; 277: 20438-20445.

63. Vasconcelos MH, Tam SC, Hesketh JE, Reid M, Beattie JH. Metal- and tissue-dependent relationship between metallothionein mRNA and protein. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2002; 182: 91-97.
64. Wang Y, Wimmer U, Lichtlen P, Inderbitzin D, Stieger B, Meier PJ, Hunziker L, Stallmach T, Forrer R, Rüllicke T, Georgiev O, Schaffner W. Metal-responsive transcription factor-1 (MTF-1) is essential for embryonic liver development and heavy metal detoxification in the adult liver. *FASEB J.* 2004; 18: 1071-1079.
65. Günther V, Lindert U, Schaffner W. The taste of heavy metals: gene regulation by MTF-1. *Biochim Biophys Acta.* 2012; 1823: 1416-1425.
66. Chen X, Zhang B, Harmon PM, Schaffner W, Peterson DO, Giedroc DP. A novel cysteine cluster in human metal-responsive transcription factor 1 is required for heavy metal-induced transcriptional activation in vivo. *J Biol Chem.* 2004; 279: 4515-4522.
67. Günes C, Heuchel R, Georgiev O, Müller KH, Lichtlen P, Blüthmann H, Marino S, Aguzzi A, Schaffner W. Embryonic lethality and liver degeneration in mice lacking the metal-responsive transcriptional activator MTF-1. *EMBO J.* 1998; 17: 2846-2854.
68. Lichtlen P, Schaffner W. The "metal transcription factor" MTF-1: biological facts and medical implications. *Swiss Med Wkly.* 2001; 131: 647-652.
69. Wimmer U, Wang Y, Georgiev O, Schaffner W. Two major branches of anti-cadmium defense in the mouse: MTF-1/metallothioneins and glutathione. *Nucleic Acids Res.* 2005; 33: 5715-5727.
70. Rutherford JC, Bird AJ. Metal-responsive transcription factors that regulate iron, zinc, and copper homeostasis in eukaryotic cells. *Eukaryot Cell.* 2004; 3: 1-13.
71. Adams TK, Saydam N, Steiner F, Schaffner W, Freedman JH. Activation of gene expression by metal-responsive signal transduction pathways. *Environ Health Perspect.* 2002; 110 Suppl 5: 813-817.
72. Bourdineaud JP, Baudrimont M, Gonzalez P, Moreau JL. Challenging the model for induction of metallothionein gene expression. *Biochimie.* 2006; 88: 1787-1792.
73. Vergani L, Lanza C, Borghi C, Scarabelli L, Panfoli I, Burlando B i wsp. Effects of growth hormone and cadmium on the transcription regulation of two metallothionein isoforms. *Mol Cell Endocrinol.* 2007; 263: 29-37.
74. Thévenod F. Cadmium and cellular signaling cascades: to be or not to be? *Toxicol Appl Pharmacol.* 2009; 238: 221-239.
75. Andrews GK. Regulation of metallothionein gene expression by oxidative stress and metal ions. *Biochem Pharmacol.* 2000; 59: 95-104.

76. Jiang H, Fu K, Andrews GK. Gene- and cell-type-specific effects of signal transduction cascades on metal-regulated gene transcription appear to be independent of changes in the phosphorylation of metal-response-element-binding transcription factor-1. *Biochem J.* 2004; 382: 33-41.
77. Lau AT, Zhang J, Chiu JF. Acquired tolerance in cadmium-adapted lung epithelial cells: roles of the c-Jun N-terminal kinase signaling pathway and basal level of metallothionein. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2006; 215: 1-8.
78. Rao PS, Jaggi M, Smith DJ, Hemstreet GP, Balaji KC. Metallothionein 2A interacts with the kinase domain of PKC μ in prostate cancer. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003; 310: 1032-1038.
79. Ray PD, Huang BW, Tsuji Y. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cell Signal.* 2012; 24: 981-990.
80. Corre S, Galibert MD. USF as a key regulatory element of gene expression. *Med Sci (Paris).* 2006; 22: 62-67.
81. Venugopal R, Jaiswal AK. Nrf1 and Nrf2 positively and c-Fos and Fra1 negatively regulate the human antioxidant response element-mediated expression of NAD(P)H: quinone oxidoreductase1 gene. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1996; 93: 14960-14965
82. Ozanne BW, McGarry L, Spence HJ, Johnston I, Winnie J, Meagher L i wsp. Transcriptional regulation of cell invasion: AP-1 regulation of a multigenic invasion programme. *Eur J Cancer.* 2000, 36: 1640-1648.
83. Beyersmann D, Hechtenberg S. Cadmium, gene regulation, and cellular signaling in mammalian cells. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1997; 144: 247-261.
84. Pathak N, Khandelwal S. Role of oxidative stress and apoptosis in cadmium induced thymic atrophy and splenomegaly in mice. *Toxicol Lett.* 2007; 169: 95-108.
85. Bednarek J, Kiliańska ZM. Białka przestrzeni międzybłonowej mitochondriów uczestniczące w procesie apoptozy. *Postępy Biochem.* 2005; 51: 447-458.
86. Kiliańska ZM, Miśkiewicz A. Kaspazy kręgowców: ich rola w przebiegu apoptozy. *Postępy Biol Kom.* 2003; 30: 129-152.
87. Łabędzka K, Grzanka A, Izdebska M. Mitochondrium a śmierć komórki. *Postępy Hig Med Dośw.* 2006; 60: 439-446.
88. Rogalińska M. Alterations in cell nuclei during apoptosis. *Cell Mol Biol Lett.* 2002; 7: 995-1018.
89. Hamada T, Tanimoto A, Sasaguri Y. Apoptosis induced by cadmium. *Apoptosis.* 1997; 2: 359-367

90. Pulido MD, Parrish AR. Metal-induced apoptosis: mechanisms. *Mutat Res.* 2003; 533: 227-241.
91. Kim MS, Kim BJ, Woo HN, Kim KW, Kim KB, Kim IK i wsp. Cadmium induces caspase-mediated cell death: suppression by Bcl-2. *Toxicology.* 2000; 145: 27-37.
92. Kondo Y, Rusnak JM, Hoyt DG, Settineri CE, Pitt BR, Lazo JS. Enhanced apoptosis in metallothionein null cells. *Mol Pharmacol.* 1997; 52: 195-201.
93. Aimola P, Carmignani M, Volpe AR, Di Benedetto A, Claudio L, Waalkes MP, van Bokhoven A, Tokar EJ, Claudio PP. Cadmium induces p53-dependent apoptosis in human prostate epithelial cells. *PLoS One.* 2012; 7: e33647.
94. Hengstler JG, Bolm-Audorff U, Faldum A, Janssen K, Reifenrath M, Götte W i wsp. Occupational exposure to heavy metals: DNA damage induction and DNA repair inhibition prove co-exposures to cadmium, cobalt and lead as more dangerous than hitherto expected. *Carcinogenesis.* 2003; 24: 63-73.
95. Asmuss M, Mullenders LH, Eker A, Hartwig A. Differential effects of toxic metal compounds on the activities of Fpg and XPA, two zinc finger proteins involved in DNA repair. *Carcinogenesis.* 2000; 21: 2097-2104.
96. Witkiewicz-Kucharczyk A, Bal W. Damage of zinc fingers in DNA repair proteins, a novel molecular mechanism in carcinogenesis. *Toxicol Lett.* 2006; 162: 29-42.
97. Jacob ST, Majumder S, Ghoshal K. Suppression of metallothionein-I/II expression and its probable molecular mechanisms. *Environ Health Perspect.* 2002; 110 Suppl 5: 827-30.
98. Morahan JM, Yu B, Trent RJ, Pamphlett R. Are metallothionein genes silenced in ALS? *Toxicol Lett.* 2007; 168: 83-87.
99. Beavon IR. The E-cadherin-catenin complex in tumour metastasis: structure, function and regulation. *Eur J Cancer.* 2000; 36: 1607-1620.
100. Edwards JR, Kolman K, Lamar PC, Chandar N, Fay MJ, Prozialeck WC. Effects of cadmium on the sub-cellular localization of β -catenin and β -catenin-regulated gene expression in NRK-52E cells. *Biometals.* 2012 DOI 10.1007/s10534-012-9592-0
101. Chakrabarty S, Radjendirane V, Appelman H, Varani J. Extracellular calcium and calcium sensing receptor function in human colon carcinomas: promotion of E-cadherin expression and suppression of beta-catenin/TCF activation. *Cancer Res.* 2003; 63: 67-71.
102. Conacci-Sorrell M, Zhurinsky J, Ben-Ze'ev A. The cadherin-catenin adhesion system in signaling and cancer. *J Clin Invest.* 2002; 109: 987-991.

103. Curran S, Murray GI. Matrix metalloproteinases: molecular aspects of their roles in tumour invasion and metastasis. *Eur J Cancer*. 2000; 36: 1621-1630.
104. Heimann R, Hellman S. Individual characterisation of the metastatic capacity of human breast carcinoma. *Eur J Cancer*. 2000; 36: 1631-1639.
105. Beattie JH, Owen HL, Wallace SM, Arthur JR, Kwun IS, Hawksworth GM i wsp. Metallothionein overexpression and resistance to toxic stress. *Toxicol Lett*. 2005; 157: 69-78.
106. Fan LZ, Cherian MG. Potential role of p53 on metallothionein induction in human epithelial breast cancer cells. *Br J Cancer*. 2002; 87: 1019-1026.
107. Méplan C, Richard MJ, Hainaut P. Redox signalling and transition metals in the control of the p53 pathway. *Biochem Pharmacol*. 2000; 59: 25-33.
108. Reaves SK, Fanzo JC, Arima K, Wu JY, Wang YR, Lei KY. Expression of the p53 tumor suppressor gene is up-regulated by depletion of intracellular zinc in HepG2 cells. *J Nutr*. 2000; 130: 1688-1694.
109. Agarwal ML, Agarwal A, Taylor WR, Stark GR. p53 controls both the G2/M and the G1 cell cycle checkpoints and mediates reversible growth arrest in human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1995; 92: 8493-8497.
110. Murphy KL, Rosen JM. Mutant p53 and genomic instability in a transgenic mouse model of breast cancer. *Oncogene*. 2000; 19: 1045-1051.
111. Wani MA, Zhu QZ, El-Mahdy M, Wani AA. Influence of p53 tumor suppressor protein on bias of DNA repair and apoptotic response in human cells. *Carcinogenesis*. 1999; 20: 765-772.
112. Koedrich P, Seo YR. Advances in carcinogenic metal toxicity and potential molecular markers. *Int J Mol Sci*. 2011; 12: 9576-9595.
113. Ostrakhovitch EA, Olsson PE, Jiang S, Cherian MG. Interaction of metallothionein with tumor suppressor p53 protein. *FEBS Lett*. 2006; 580: 1235-1238.
114. Lozano G. The oncogenic roles of p53 mutants in mouse models. *Curr Opin Genet Dev*. 2007; 17: 66-70.
115. Elledge RM, Allred DC. Prognostic and predictive value of p53 and p21 in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 1998; 52: 79-98.
116. Svechnikova I, Ammerpohl O, Ekström TJ. p21waf1/Cip1 partially mediates apoptosis in hepatocellular carcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007; 354: 466-471.
117. Thor AD, Liu S, Moore DH 2nd, Shi Q, Edgerton SM. p(21WAF1/CIP1) expression in breast cancers: associations with p53 and outcome. *Breast Cancer Res Treat*. 2000; 61: 33-43.

118. Xie J, Shaikh ZA. Cadmium induces cell cycle arrest in rat kidney epithelial cells in G2/M phase. *Toxicology*. 2006; 224: 56-65.
119. Taylor WR, DePrimo SE, Agarwal A, Agarwal ML, Schönthal AH, Katula KS, Stark GR. Mechanisms of G2 arrest in response to overexpression of p53. *Mol Biol Cell*. 1999; 10: 3607-3622.
120. Jiang H, Fu K, Andrews GK. Gene- and cell-type-specific effects of signal transduction cascades on metal-regulated gene transcription appear to be independent of changes in the phosphorylation of metal-response-element-binding transcription factor-1. *Biochem J*. 2004; 382: 33-41.
121. Fan LZ, Cherian MG. Potential role of p53 on metallothionein induction in human epithelial breast cancer cells. *Br J Cancer*. 2002; 87: 1019-1026.
122. Méplan C, Mann K, Hainaut P. Cadmium induces conformational modifications of wild-type p53 and suppresses p53 response to DNA damage in cultured cells. *J Biol Chem*. 1999; 274: 31663-31670.
123. Jin R, Chow VT, Tan PH, Dheen ST, Duan W, Bay BH. Metallothionein 2A expression is associated with cell proliferation in breast cancer. *Carcinogenesis*. 2002; 23: 81-86.
124. Cogswell PC, Guttridge DC, Funkhouser WK, Baldwin AS Jr. Selective activation of NF-kappa B subunits in human breast cancer: potential roles for NF-kappa B2/p52 and for Bcl-3. *Oncogene*. 2000; 19: 1123-1131.
125. Doszczak MM, Kaszubowska L, Pierzchalski A, Bigda J. Mechanizm aktywacji czynnika transkrypcyjnego NF-κB przez czynnik martwicy nowotworu (TNF). *Postępy Biochem*. 2002; 48: 54–65.
126. Kim DW, Sovak MA, Zanieski G, Nonet G, Romieu-Mourez R, Lau AW i wsp. Activation of NF-kappaB/Rel occurs early during neoplastic transformation of mammary cells. *Carcinogenesis*. 2000; 21: 871-879.
127. Liu P, Kimmoun E, Legrand A, Sauvanet A, Degott C, Lardeux B i wsp. Activation of NF-kappa B, AP-1 and STAT transcription factors is a frequent and early event in human hepatocellular carcinomas. *J Hepatol*. 2002; 37: 63-71.
128. Gruber BM. Czynn timerkrypcyjny NF-κB – nowa perspektywa w leczeniu nowotworów. *Postępy Biochem*. 2004; 50: 118–130.
129. Jin R, Bay BH, Chow VT, Tan PH, Dheen T. Significance of metallothionein expression in breast myoepithelial cells. *Cell Tissue Res*. 2001; 303: 221-226.
130. Jin R, Bay BH, Chow VT, Tan PH. Metallothionein 1F mRNA expression correlates with histological grade in breast carcinoma. *Breast Cancer Res Treat*. 2001; 66: 265-272.

131. Jin R, Bay BH, Chow VT, Tan PH, Lin VC. Metallothionein 1E mRNA is highly expressed in oestrogen receptor-negative human invasive ductal breast cancer. *Br J Cancer*. 2000; 83: 319-323.
132. Barnes NL, Ackland ML, Cornish EJ. Metallothionein isoform expression by breast cancer cells. *Int J Biochem Cell Biol*. 2000; 32: 895-903.
133. Platet N, Cathiard AM, Gleizes M, Garcia M. Estrogens and their receptors in breast cancer progression: a dual role in cancer proliferation and invasion. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2004; 51: 55-67.
134. Osborne CK. Steroid hormone receptors in breast cancer management. *Breast Cancer Res Treat*. 1998; 51: 227-238.
135. Wojnar A, Pula B, Piotrowska A, Jethon A, Kujawa K, Kobierzycki C i wsp. Correlation of intensity of MT-I/II expression with Ki-67 and MCM-2 proteins in invasive ductal breast carcinoma. *Anticancer Res*. 2011; 31: 3027-3033.
136. Gomulkiewicz A, Podhorska-Okolow M, Szulc R, Smorag Z, Wojnar A, Zabel M i wsp. Correlation between metallothionein (MT) expression and selected prognostic factors in ductal breast cancers. *Folia Histochem Cytobiol*. 2010; 48: 242-248.
137. Krześlak A, Forma E, Józwiak P, Szymczyk A, Smolarz B, Romanowicz-Makowska H i wsp. Metallothionein 2A genetic polymorphisms and risk of ductal breast cancer. *Clin Exp Med*. 2012; DOI 10.1007/s10238-012-0215-4
138. Somji S, Garrett SH, Zhou XD, Zheng Y, Sens DA, Sens MA. Absence of Metallothionein 3 Expression in Breast Cancer is a Rare, But Favorable Marker of Outcome that is Under Epigenetic Control. *Toxicol Environ Chem*. 2010; 92: 1673-1695.