

ROŚLINNE METALOTIONEINY*

PLANT METALLOTHIONEINS

Anna Maria KOSZUCKA, Grażyna DĄBROWSKA

Zakład Genetyki, Instytut Biologii Ogólnej i Molekularnej,
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

Streszczenie: Metalotioneiny to niskocząsteczkowe białka bogate w reszty cysteinowe, zdolne do wiązania metali ciężkich. Występują u niektórych *Prokaryota*, grzybów, roślin i zwierząt. Próby wyizolowania natywnych białek roślinnych były zazwyczaj nieudane, jednak u wielu roślin jedno- i dwuliściennych, a także u niektórych nagonasiennych i glonów zidentyfikowano geny kodujące metalotioneiny. Podobnie jak u zwierząt tworzą one małe rodziny genów, a ich ekspresja jest indukowana różnymi czynnikami endo- i egzogennymi, w tym jonami metali. Jednak w przeciwieństwie do zwierzęcych homologów nie tworzą one zgrupowań na jednym chromosomie, ale są rozproszone w genomie. Większość metalotionein roślinnych ulega ekspresji tkankowospecyficzej. Sugeruje się, że roślinne metalotioneiny uczestniczą w homeostazie metali niezbędnych do życia i detoksykacji szkodliwych jonów metali oraz chronią tkanki przed stresem oksydacyjnym.

Słowa kluczowe: jony metali, detoksyfikacja, stres oksydacyjny.

Summary: Metallothioneins are low molecular weight, cysteine-rich, heavy-metal binding proteins. They are present in some *Prokaryota*, fungi, plants and animals. Attempts to isolate native plant proteins failed but many metallothionein genes were identified in mono- and dicotyledons and also in some gymnosperms and algae. They are organised in small gene families, like in animals genomes and their expression is upregulated by different endo- and exogenous factors, including metal ions. In contrast to animal metallothionein genes, they don't form clusters, but they are distributed through plant genomes. Furthermore expression most of them is organspecific. It was suggested that plant metallothioneins may be involved in essential metal ion homeostasis and metal ion detoxification, they could also protect tissues against oxidative stress.

Key words: metal ions, detoxification, oxidative stress.

*Praca częściowo finansowana z funduszu Uniwersytetu Mikołaja Kopernika.

WPROWADZENIE

Metalotioneiny to białka o niskiej masie cząsteczkowej (4–8 kDa) i dużej zawartości reszt cysteinowych, wiążące koordynacyjnie jony metali – stąd właśnie nazwa tych białek [2, 7, 9, 47]. Pierwszy raz terminu metalotioneina użyli w 1957 roku Margoshes i Vallee, dla opisu białka wyizolowanego z kory nerki konia, które zawierało duże ilości kadmu i siarki [60].

TABELA 1. Charakterystyka metalotionein, podział wg [60]

Klasa	Cechy	Występowanie
I	20 reszt cysteinowych w konserwatywnych pozycjach w obrębie całego łańcucha białkowego, brak aminokwasów aromatycznych, cząsteczka białka związa się w dwie domeny wiążące metale oddzielone od siebie krótkim odcinkiem aminokwasowym [19]	u niektórych grzybów, np. u <i>Neurospora crassa</i> i pieczarki dwuzarodnikowej, rozpowszechnione u zwierząt kręgowych, zwłaszcza u saków
II	struktura pierwszorzędowa, zwłaszcza rozmieszczenie reszt cysteinowych, nie odpowiada strukturze białek klasy I, u roślin reszty cysteinowe zgrupowane w dwóch domenach terminalnych, domena centralna o długości ok. 40 aminokwasów zawiera aminokwasów aromatyczne [14], u roślin ze względu na aranżację reszt cysteinowych podzielono metalotioneiny na cztery typy [14]	u niektórych Prokaryota, u większości grzybów, u roślin, u zwierząt bezkręgowych
III	liniowe polimery dipeptydów γ -glutamylcysteinowych, terminalnym aminokwasem najczęściej jest glicyna [14,66], syntezowane w drodze enzymatycznej [14,66]	kadystyny u niektórych grzybów [66], fitochelatyny u roślin [14]

Trzy dekady później Robinson i wsp. [60] odkryli, że większość jonów kadmu w komórkach bielunia indiańskiego związanych jest z peptydami indukowanymi przez metale, które później nazwano fitochelatynami (w tym samym roku zostały one zaliczone do metalotionein jako klasa III). Okazało się, że powstają one z glutationu w reakcji katalizowanej przez syntazę fitochelatynową i odpowiadają za detoksykację metali ciężkich [14, 60, 66]. Wraz z odkryciem białka Ec (*early cysteine-labeled*) zidentyfikowanego u pszenicy [36] zniknęły wątpliwości co do istnienia u roślin metalotionein typu zwierzęcego. Próby wyizolowania natywnych białek z innych gatunków roślin skończyły się niepowodzeniem, chociaż uzyskano zrekombinowane białka w komórkach *E. coli* [25, 65]. W toku dalszych badań okazało się, że strukturalnie podobne białka i kodujące je geny występują u niektórych cyjanobakterii i są szeroko rozpowszechnione w świecie grzybów, roślin i zwierząt [2, 7, 14, 47]. Zdecydowaną większość roślinnych genów kodujących metalotioneiny zidentyfikowano u roślin okrytonasiennych zarówno jedno-, jak i dwuliściennych. Niewiele jednak wiadomo na temat ich homologów u roślin nagonasiennych i glonów, chociaż podobne geny zidentyfikowano u daglezi [8],

TABELA 2. Klasyfikacja roślinnych metalotionein na podstawie aranżacji reszt cysteinowych wg [14]

Typ metalotioneiny	Liczba reszt cysteinowych i ich układ	Występowanie w roślinach
Typ 1	12 reszt w motywach Cys-X-Cys	kukurydza [18], groch [21], rzodkiewnik [14]
Typ 2	14 reszt w motywach Cys-Cys, Cys-X-Cys i Cys-X-X-Cys	pomidor [28], ryż [10], słonecznik bulwiasty [7]
Typ 3	10 reszt, część w motywach Cys-X-Cys	jabłoń [58], rzodkiewnik [50], winorośl [17], batat [9]
Typ 4	wyjątkowo trzy domeny bogate w reszty cysteinowe, których część jest zgrupowana w motywach Cys-X-Cys	pszenica [36], kukurydza [69], rzodkiewnik [29], petunia [30]

a także morszczynu pęcherzykowatego [48]. Jednakże metalotioneiny przez nie kodowane mają odmienną strukturę, dlatego niezbędne są dalsze badania w celu ustalenia, czy również u tych gatunków obecna jest rodzina genów, podobna do tej, która występuje u roślin kwiatowych.

Niniejszy artykuł podsumowuje informacje dotyczące metalotionein roślinnych. Na temat fitochelatyn powstało wiele prac przeglądowych [13, 14, 56, 57, 60, 66, 72], dlatego zainteresowanego tym tematem czytelnika odsyłamy do nich.

KLASYFIKACJA METALOTIONEIN

Pierwsze próby usystematyzowania przedstawicieli metalotionein pojawiły się w latach siedemdziesiątych ubiegłego wieku, kiedy to wyodrębniono je jako osobną nadrodzinę białek [3]. Włączono do niej wszystkie te białka, które miały pewne cechy wspólne z pierwszą odkrytą metalotioneiną, wyizolowaną z nerki konia. Do tych cech należą: niska masa cząsteczkowa, wysoka zawartość reszt cysteinowych zgrupowanych w charakterystycznych motywach Cys-X-Cys (gdzie w miejscu X występuje dowolny aminokwas), a także obecność metali związanych z tymi białkami poprzez grupy tiolowe reszt cysteinowych. Jednakże obecność istotnych różnic pomiędzy białkami należącymi do nadrodziny przyczyniła się do jej podziału na trzy klasy, stworzonego na podstawie charakterystycznego wzorca rozmieszczenia reszt cysteinowych [14]. Poszczególne klasy scharakteryzowano w tabeli 1 i 2, a przykłady roślinnych genów metalotionein należących do klasy II i ich zależności filogenetyczne przedstawiono na rycinie 1a i b.

Alternatywną klasyfikację zaproponowali Binz i Kägi [3]. Podzielili oni nadrodzinę metalotionein na piętnaście rodzin, uwzględniając zarówno podobieństwa w strukturze pierwszorzędowej, jak i zależności filogenetyczne. Warto zwrócić uwagę, że według tej klasyfikacji do metalotionein nie należą fitochelatyny.

Typ 1

MSMT1 M-SSGCGGCKCGDNCSGMYPD-----METNTVTMIEGVAPLKMVSEGS-EKSF-GAEGGCKGGSNCKCDP-CNC-
 IBMT1 M-SSGCKGSDCKCGSDCAC-----BEVTTVTIIEGVAPKLTILEGSSEK-----ATEGGHACKOGSNCTCDP-CNC-
 PSMT1 M-S-GCGGSSCNCGDCKNKRSSLSYSEMETIETVLGWGPAKIQFEGA-EMSA-ASEDG-GCKGDNCTCDP-CNCK
 ATMT1a MADSNCGGSSCKGDSKSC-----EKNY-NKECD-NCOSGNSCSGNSCNC-
 ATMT1c MADSNCGGSSCKGDSKSC-----EKNY-NKECD-NCOSGNSCSGNSCNC-
 ZWMT1 -MS--CSCGSSCGGSSCKGKYPPDLEETSTAQAFTVVLGWVAPKAAPEFVEAAAESEGAHGCSSGSKCDP-CNC-
 *

Typ 2

ATMT2a MS-CCGNGCGGCKGNGGCGKMYPDLFSGETTITETVLGVAPAMKNOYEAGESNNAEND-----ACKGSDCKGDP-CTCK
 ATMT2b MS-CCGSSCGSACKGNGCGGCKRYPDL-----ENTATETTLVGVAPAMNSQYEASGETFVAEND-----ACKGSDCKNP-CTCK
 QSMT2 MS-CCGNGCGGTGCKGCGGCGKMFDPIS--SEKTTTETLIVGAPQKT-HFEGS-EMGVGAEN-----GKCGSNCTCDP-CNCK
 MDMT2 MSSCGGKCGGSSVCSGCGGCGGCMAPDLSY-MEGSTIETLWGVAPQKS-HMEAS-EMGVAEN-----GCKGDNCTNP-CNCK
 IBMT2 MS-CCGNGCGGCKGNGGCGGMPDWE----NVKVTTLIQQVAPVNNTFEGA-EMGAGGD-GCKGSSCSGCPACNCDP-CXC-
 HTMT2 MS-CCNGKCGGSSCSGSSCGGCGMYPDVEV----SATVTMIWGVAPKOM--FAEGSEGSFVAEGN-----CNCKGDNCKGNNCSC-
 ** *

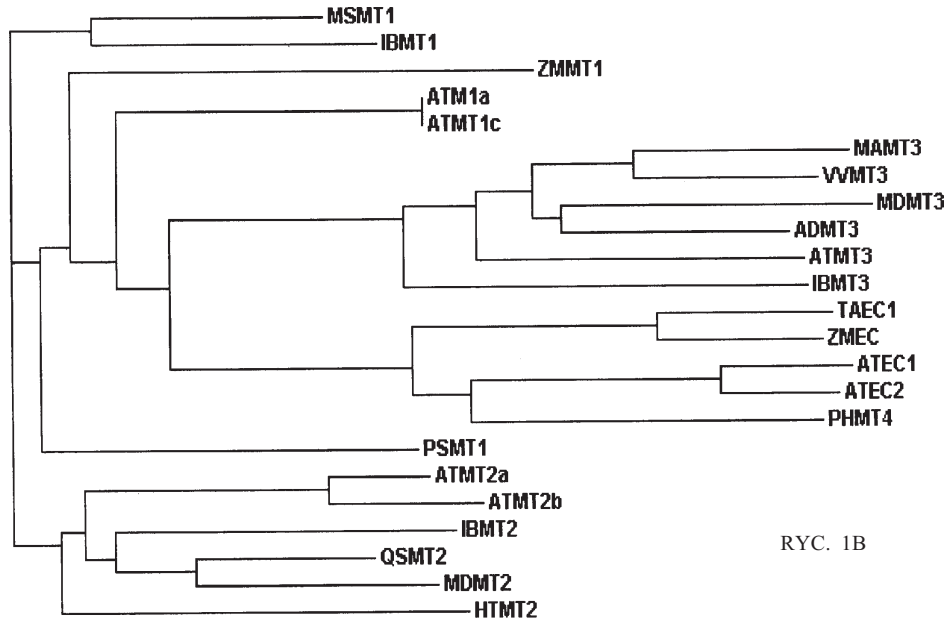
Typ 3

MAMT3 MST-CGNCDCVDKSQCKKNGSYGIDIVETEKSVDYVIAAFAAEHDG---KCKGGAACACTDCKCGN-
 VVMT3 MST-CGNCDCADKQCKKNGSYGIDIVETEKSYYVAVVMVEYFAAQHEG--SCKGDSACIDICTCGQ-
 ADMT3 MSDKCGNCDADSSQCKKNGS--IDI VETDKSYIEDVVMVYPAESGG---KCKGTSYCFVNCID--
 ATMT3 MSSNCGSDCADKQCKKNGSYTFDIVEVETESYKEAMINDYGAEEENANCKCKGSSCSVNCCTCCFN
 MDMT3 MSKCDNCDADSTQCKVCKNGSYDLVIVETEHRSMDTVFVDPAAEHDG---KCKGTGCSVCVCTCGH-
 IBMT3 MSDKCGNCDADSTQCKGSKMDDWIVFVTEKSYESIVKDI-AAENDG---CKGANCSCTDRCTCGH-
 *

Typ 4

ATEC1 MADTGSSVAGCHDSGGPCFPGGNSCRMR-EASAG--DQHNWVPCGHEHCGCNFCNPKTQTSAGK----CTGEGCTCASCAT----
 ATEC2 MADTGKGSASACNDRCGPPCFGGESCRKMSEASGG--DQHNWVPCGHEHCGCNFCNPKTQTSAGK----CTGEGCTCATCAA----
 PHMT4 MADL-RGS-SAI CDERCGPSPCFGGVACRCSGGAATAGGDMHEHCKPCGHEHCGCNFCNPKTQTSAGK--AHCXGFGCTCVQCAS--
 IAEC1 -----GDDKCGCAVPCFPGGTGCRCTARSAGAAAG----EHHTCGGHEHCGCNFCACREGTFSGRANFRANCSGACNCSGASATA
 ZMEC -----GDDKCGCAVPCFPGGTGCRCTARSAGAAAG----EHHTCGGHEHCGCNFCACREGTFSGRANFRANCSGASCNCSGASATA
 *

RYC. 1A



RYC. 1B

RYCINA 1. A. Porównanie sekwencji aminokwasowych roślinnych metalotionein. Reszty cysteinowe konserwatywne w obrębie każdego typu oznaczono gwiazdkami. Sekwencje aminokwasowe ustalono na podstawie sekwencji nukleotydowych genów krowlika żółtego (MS), grochu (PS), rzodkiewnika (AT), batata (IB), dębu korkowego (QS), jabłoni domowej (MD), słonecznika bulwiastego (HT), bananowca (MA), winorośli (VV), aktinidii chińskiej (kiwi) (AD), pszenicy (TA), kukurydzy (ZM) i petunii (PH) [14, zmodyfikowane]. B – Dendrogram wykonany programem ClustalW, ukazujący zależności filogenetyczne między przedstawicielami czterech typów metalotionein

STRUKTURA GENU I ORGANIZACJA GENOMOWA METALOTIONEIN

Dotychczas w genomowym DNA roślin zidentyfikowano sekwencje nielicznych genów kodujących metalotioneiny, jednak już te dane dostarczają pewnych informacji na temat ich struktury. Okazało się, że w przeciwieństwie do zwierzęcych, roślinne sekwencje promotorowe większości poznanych genów nie zawierają elementów odpowiedzi na metale, tzw. MRE (*metal response element*). U zwierząt to właśnie element MRE odpowiada za indukcję ekspresji genów metalotionein [60]. Odbywa się to przy udziale czynnika transkrypcyjnego MTF1 (*MRE-binding transcription factor*), który po połączeniu z jonami cynku transportowany jest z cytoplazmy do jądra komórkowego i tam aktywuje geny metalotionein w odpowiedzi na metale ciężkie, stres oksydacyjny i niedotlenienie [35].

W przypadku roślin jedynie w promotorze genu *LeMT_B* występuje przypuszczalny element odpowiedzi na metale, jednak Whitelaw [70] nie wykazał, czy jest on funkcjonalny. Ten sam gen wyizolował Giritch [28] (nazwał go *LEM1*) i wykazał aż

sześciokrotny wzrost ekspresji *LEMTI* pod wpływem jonów cynku. Możliwe, że jony cynku działały indukująco dzięki obecności sekwencji obejmującej przypuszczalny element odpowiedzi na metale. Element o sekwencji TGCACACC występuje z kolei w promotorze genu *PsMT_A* grochu. Różni się on od typowego elementu MRE obecnością adeniny w pozycji 6. Wcześniej wykazano, że występowanie w tym miejscu jednego z trzech pozostałych nukleotydów pozwala na normalną regulację ekspresji jonami metali. Natomiast sekwencja z nukleotydem adeninowym powoduje, że gen ulega stałej ekspresji na wysokim poziomie. Tak jest również w przypadku genu *PsMT_A*.

Elementy charakterystyczne dla genów roślinnych metalotionein, w tym regulujące ich ekspresję, przedstawiono w tabeli 3.

Roślinne geny kodujące metalotioneiny tworzą małe rodziny genów. Przykładowo u grochu występują dwa geny kodujące metalotioneiny typu 1: *PsMT_A* [21] i *MEY* [GenBank AB176564] oraz jeden typu 2 – *MET* [GenBank AB 176565]. Natomiast w genomie bobu zidentyfikowano dotychczas trzy geny typu 1: *MT1a*, *MT1b* [25] i *MET* [GenBank AB 176562] oraz dwa geny typu 2: *MT2* [25] i *MET* [GenBank AB 176563],

TABELA 3. Charakterystyka roślinnych genów kodujących metalotioneiny

Charakterystyczne elementy genu	Funkcja	Sekwencja	Występowanie
Elementy promotora			
MRE	Indukcja ekspresji pod wpływem jonów metali	TACGCGCG	gen <i>LeMTB</i> pomidora między -495 a -488 nt [70]
Element odpowiedzi na ABA	Indukcja lub represja ekspresji	CACGTGGA	gen <i>Ec</i> pszenicy między -608 a -601 nt [36] gen <i>B22EL8</i> jęczmienia [40]
Element wzmacniający działanie etylenu		AATCAAA	gen <i>LeMTB</i> pomidora między -418 a -411 nt [70]
Element G-box	Indukcja ekspresji pod wpływem stresu, światła, ABA, etylenu	CACGTG	gen <i>LeMTB</i> pomidora między -150 a -145 nt [70]
Introny			
Brak intronów			gen <i>Ec</i> pszenicy [36]
Jeden intron			geny typu 1: u kukurydzy [18], kostrzewy czerwonej [45], grochu [21]
Dwa introny			geny typu 2: u słonecznika bulwiastego [7], dębu korkowego [47], ryżu [14] oraz typu 3: u palmy olejowej [1]

a u topoli aż sześć genów, po dwa z typu 1, 2 i 3 [41]. U rzodkiewnika, ryżu i trzciny cukrowej występują geny kodujące wszystkie cztery typy metalotionein [14]. Niewykluczone, że również u innych gatunków istnieje taka sytuacja i w bliskiej przyszłości uda się wyizolować geny pozostałych typów.

Lokalizacja genów na chromosomach, określona dla rzodkiewnika w wyniku sekwencjonowania genomu [14, 74] oraz pomidora poprzez analizę RFLP [28], pozwoliła stwierdzić, że u tych roślin geny kodujące metalotioneiny są rozproszone w genomie. Podobnie jest u drożdży *Candida glabrata* i nicienia *Caenorhabditis elegans* [28], w przeciwieństwie do genomów ssaków, gdzie geny metalotionein znajdują się w bliskim sąsiedztwie [55].

EKSPRESJA ROŚLINNYCH GENÓW KODUJĄCYCH METALOTIONEINY

Wiele genów kodujących metalotioneiny ulega w tkankach roślinnych silnej ekspresji. Potwierdza to analiza ekspresji genów ryżu wykorzystująca procedurę SAGE (*Serial Analysis of Gene Expression*). Okazało się, że najczęściej występującym transkryptem w liściach jest mRNA metalotioneiny typu 3. Stanowi on prawie 3% wszystkich transkryptów. Zidentyfikowano go także pośród puli mRNA w tkankach niedojrzałych

TABELA 4. Organospecyficzna ekspresja roślinnych genów kodujących metalotioneiny

Organy	Typy metalotionein	Gatunki roślin
Bulwy	typ 1 typ 2	batat [33] słonecznik bulwiasty [7]
Korzenie	typ 1 typ 2 i 3	kroplik żółty [19], groch [21], rzodkiewnik [26] pomidor [28], batat [9]
Łodygi	typ 1 typ 2 typ 3	batat [33] batat [9], słonecznik bulwiasty [7] batat [9]
Liście	typ 1 typ 2 typ 3	rzodkiewnik [26], batat [33] rzodkiewnik [73,50,26], pomidor [28], batat [9], słonecznik bulwiasty [7] jabłoń [58], batat [9]
Pąki	typ 2	słonecznik bulwiasty [7]
Kwiaty	typ 2	pomidor [28], kapusta pekińska [38]
Owoce	typ 1 typ 2 typ 3	gruszka japońska [34], jabłoń [58], gruszka japońska [34] kiwi [42], jabłoń [58], winorośl [17], palma olejowa [1]

nasion, jednakże w znacznie mniejszej ilości – spośród 100 najczęściej występujących tam transkryptów, uplasował się on na pozycji 42. Natomiast 28 pozycję na tej liście zajął transkrypt metalotioneiny typu 4 [27].

Geny kodujące metalotioneiny ulegają ekspresji pod wpływem różnych czynników zarówno endogennych, jak i egzogennych. U zwierząt wzrost stężenia metalotionein w komórce zależy od rozmaitych czynników chemicznych, tj. hormonów, cytokin, etanolu, kwasu masłowego, czynników alkilujących, endotoksyn, chloroformu, czterochlorku węgla, a także czynników stresowych, np. głodu, infekcji, szoku termicznego, naświetlania promieniami UV i Roentgena [2, 22, 24, 53, 71].

Przykłady czynników oraz mechanizmy ich oddziaływania na ekspresję metalotionein roślinnych przedstawiono w tabelach 4, 5 i 6. Najszerzej badano działanie jonów metali. W większości przypadków przyczyniały się one do wzrostu poziomu transkrypcji, chociaż u kroplika żółtego powodowały one represję ekspresji [19]. Obniżona ekspresja metalotionein przy dużej koncentracji jonów metali w środowisku może świadczyć, że takie białka są bardziej potrzebne w przypadku niskiego stężenia jonów metali. Wówczas działają one jako wydajne transportery tych jonów, dostarczające je do ważnych metaloprotein komórkowych [25]. U niektórych roślin synteza mRNA metalotionein

TABELA 5. Ekspresja roślinnych genów kodujących metalotioneiny pod wpływem jonów metali

Jony metali	Wpływ na ekspresję genów metalotionein	Typy metalotionein	Gatunki roślin
Miedź	indukcja	typ 1 typ 2	liście rzodkiewnika [50], korzenie i pędy kostrzewy czerwonej [45] siewki rzodkiewnika [50]
	represja	typ 1 typ 2	korzenie kroplika żółtego [19] łodygi słonecznika bulwiastego [7]
Cynk	indukcja	typ 1 typ 2	liście rzodkiewnika [50] siewki rzodkiewnika [50]
	represja	typ 2	łodygi słonecznika bulwiastego [7]
Kadm	indukcja	typ 1 typ 2 typ 3	liście rzodkiewnika [50], korzenie i pędy kostrzewy czerwonej [45] siewki rzodkiewnika [50] rzodkiewnik [43]
Nikiel	indukcja	typ 1 typ 2	liście rzodkiewnika [50] siewki rzodkiewnika [50]
Srebro	indukcja	typ 1 typ 2	liście rzodkiewnika [50] siewki rzodkiewnika [50]

TABELA 6. Pozostałe czynniki wpływające na ekspresję roślinnych genów kodujących metalotioneiny

Czynnik	Typy metalotionein	Gatunki roślin
Kwas abscysynowy	typ 2 typ 4	ryż [32] zarodki pszenicy [36], zarodki kukurydzy [69]
Etylen	typ 1 typ 2	gruszka japońska [34] batat [9]
Wysoka temperatura	typ 1 typ 2	ryż [31,32] ryż [32], rzodkiewnik [49], dąb korkowy [47]
Niska temperatura	typ 2 i 3	jabłoń [58]
Stres oksydacyjny	typ 2	dąb korkowy [47]
Stres osmotyczny	typ 1 typ 4	rzodkiewnik [20] kukurydza [69]
Niska zawartość składników odżywczych w podłożu	typ 1 typ 2	pszenica [62,63], kukurydza [11], ryż [31,32] ryż [32]
Silne światło	typ 1	rzodkiewnik [20]
Susza	typ 1	rzodkiewnik [20,59]
Ciemność	typ 1 typ 2	rzepak [6] batat [9]
Zranienie	typ 1 typ 2	rzodkiewnik [59], rzepak [6] <i>Nicotiana glutinosa</i> [12]
Atak patogenów	typ 1 typ 2	rzodkiewnik [59] <i>Nicotiana glutinosa</i> [12]
Procesy fizjologiczne: kielkowanie pyłku rozwój embrionalny dojrzwanie owoców starzenie się organów nekroza apoptoza	typ 4 typ 4 typ 2 i 3 typ 1 typ 2 typ 3 typ 1 typ 1	petunia [30] pszenica [36], kukurydza [69] jabłoń [58] liście batata [33], rzodkiewnika [26], rzepaku [5] liście batata [9] liście winorośli [17], płatki kwiatów alstremerii [4] rzepak [6] czarny bez [15]

indukowana była obniżoną zawartością żelaza w podłożu. Tak było w przypadku transkryptu LEMT1 ($LeMT_B$) u pomidora oraz jęczmienia. Jednakże w warunkach niedoboru żelaza rośliny akumulowały więcej miedzi, manganu i cynku i prawdopodobnie to było przyczyną podwyższonej ekspresji genów kodujących metalotioneiny [28].

PRODUKTY BIAŁKOWE

Jak to zostało wspomniane we wstępie, metalotioneiny to białka o niskiej masie cząsteczkowej – poniżej 7000 Da, bogate w reszty cysteinowe, poprzez które wiążą jony metali. Są to monomery zbudowane z prostego łańcucha białkowego, u ssaków mającego długość około 60 aminokwasów [60]. Metalotioneiny zazwyczaj zawierają dwie domeny wiążące metale, które po połączeniu z ligandami nadają białku konformację hantelki [14] – jej rączka to krótki mostek aminokwasowy łączący dwie domeny (główki hantelki). Jakkolwiek wyizolowano wiele zwierzęcych metalotionein i dobrze poznano ich strukturę, to jednak u roślin sytuacja jest odmienna. Do tej pory udało się wyizolować i oczyścić w całości tylko jedno białko – Ec. W związku z tym przyjęło się nazywać geny roślinne „genami podobnymi do genów metalotionein” („*metallothionein-like genes*”) w obawie, że nie ulegają one translacji. Wydaje się to jednak mało prawdopodobne biorąc pod uwagę fakt, że produkty transkrypcji wielu z nich obecne są w tkankach na wysokim poziomie i geny te kodują białka podobne do metalotionein zwierzęcych i grzybowych, z zawartym w ich sekwencji znanym motywem odpowiedzialnym za wiązanie metali [14]. Ponadto cząsteczki mRNA powstające na matrycy tych genów zawierają sygnał poliadenylacji (AAUAA) i ogon poli A; tak jest np. u pszenicy [36], kostrzewy czerwonej [45], kapusty pekińskiej [38], dębu korkowego [47] czy kroplika żółtego [19]. Transkrypty u tego ostatniego zawierają ponadto sekwencje miejsca wiązania do rybosomu, obecne są one również w transkryptach genu $LeMT_A$ pomidora [70].

Istnieją dowody wskazujące, że również pozostałe roślinne geny kodujące metalotioneiny ulegają translacji. Murphy i wsp. [50] wyizolowali z siewek rzodkiewnika trzy frakcje niskocząsteczkowych białek (o wielkości 4,5 kDa, 7 kDa i 8 kDa) bogatych w reszty cysteinowe i zdolnych do wiązania miedzi, co potwierdziła chromatografia powinowactwa. Białko o wielkości 8 kDa zdolne było również do wiązania cynku. Analiza sekwencji wykazała, że badaczom udało się wyizolować fragmenty metalotionein rzodkiewnika (ryc. 2). Frakcja o najniższej masie cząsteczkowej zawierała dwa peptydy składające się na jedną trzecią sekwencji aminokwasowej przewidzianej dla produktu genu $MT1a$. Frakcja o wielkości 8 kDa zawierała peptyd odpowiadający przypuszczalnej sekwencji MT2a i dwa fragmenty identyczne z częścią sekwencji przewidzianej dla MT2b. We frakcji o pośredniej wielkości otrzymano trzy peptydy, składające się na 45% przypuszczalnej sekwencji MT3. Murphy wykazał również, że wzory akumulacji białka MT1 i MT2 odpowiadają wcześniej ustalonym wzorom akumulacji mRNA, co potwierdziła analiza z użyciem przeciwciał skierowanych przeciwko MT1 i MT2. Ponadto przeciwciała skierowane przeciw MT2 reagowały z dwoma białkami o wielkości ok. 8 kDa, co jest zgodne z wynikami badań wskazującymi na istnienie dwóch izoform genu, $MT2a$ i $MT2b$.

MT1a MADSNGCGS SCKCGDSCSC EKYNKECDN CSCGSMCSCG SNCNC
 MT2a MSCCGGNGCG GSGCKCGNGC GGCKMYPDLG FSGETTTTET FVLGVAPAMK NOYEASGESN
NAENDACKCG SDCKCDPCTC K
 MT2b MSCCGGSGCG GSACKCGNGC GGCKRYPDLE NTATETLVLG VAPAMNSQYE ASGETFVAEN
DACKCGSDCK CNPCTCK
 MT3 MSSNCGSDC ADKTQCVKKG TSYTFDIVET QESYKEAMIM DVGAEENNAN CKCKCGSSCS
 CVNCTCCPN

RYCINA 2. Sekwencje aminokwasowe metalotionein rzodkiewnika, ustalone na podstawie sekwencji nukleotydowych kodujących je genów. Podkreślono fragmenty, które zostały wyizolowane i zsekwenjonowane (wg [50] zmodyfikowane)

Kolejny dowód na istnienie metalotionein roślinnych dostarczył de Miranda z wsp. [19]. Podczas prób izolacji fitochelatyn z kroplika żółtego wyizolowano również niskocząsteczkowe białka wiążące miedź, niebędące γ -glutamylcysteinylglicynami. Skład aminokwasowy i wielkość otrzymanych peptydów odpowiadała dwóm terminalnym domenom metalotioneiny. Wcześniejsza analiza komputerowa przypuszczalnej sekwencji aminokwasowej metalotioneiny kroplika przewidywała dla dwóch domen bogatych w reszty cysteinowe konformację zwiniętą, natomiast rozciągniętą dla domeny centralnej. Możliwe, że ta domena jest wycinana i w ten sposób powstają dwa mniejsze peptydy zdolne do wiązania metali [19]. Podobną sytuację zaobserwował Kille [37]. Wraz ze współpracownikami transformował bakterie *E. coli* genem *PsMT_A* grochu i hodował je w obecności kadmu, po czym wyizolował z nich frakcję wiążącą ten pierwiastek. Sekwencja aminokwasowa otrzymanych peptydów odpowiadała domenie N-terminalnej sekwencji aminokwasowej przewidzianej dla metalotioneiny grochu oraz fragmentom domeny centralnej, które mogły powstać przez jej proteolityczne cięcie. Ponadto frakcje bogate w kadm poddano działaniu proteiny K. Analiza produktów trawienia wykazała brak aminokwasów aromatycznych wchodzących w skład domeny centralnej, otrzymano natomiast peptydy odpowiadające sekwencjom aminokwasów 2-21 i 56-71 metalotioneiny grochu. Już wcześniej wykazano, że domeny skompleksowane z metalami chronione są przed proteolizą. Prawdopodobnie dlatego jedynie region domeny centralnej ulega trawieniu, nienaruszone pozostają natomiast domeny wiążące metale. Najwyraźniej mimo wycięcia domeny centralnej tworzą one zwarty kompleks złożony z dwóch peptydów połączonych ze sobą poprzez jony metali. Proteoliza metalotioneiny grochu w komórkach *E. coli* może odzwierciedlać sytuację panującą *in vivo* w tkankach roślinnych. Nasuwa się w związku z tym pytanie o rolę domeny centralnej. Wcześniejsze doświadczenia udowodniły, że wprowadzenie takiej domeny, złożonej z nie więcej niż 12 aminokwasów, do zrekombinowanej metalotioneiny ssaków nie zagraża jej stabilności. Jednak wydłużenie domeny do ponad 16 aminokwasów obniża zdolność metalotioneiny do detoksykacji metali. W metalotioneinie grochu jest ona jeszcze dłuższa i wrażliwa na atak proteolityczny. Możliwe, że domena centralna bierze udział w prawidłowym zwijaniu regionów wiążących metale [37]. Ponadto jej sekwencja jest konserwatywna, co może sugerować jej znaczenie funkcjonalne [73].

Podatność roślinnych metalotionein na atak proteolityczny może być przyczyną niepowodzeń w izolowaniu natywnych białek. Inną przyczyną niepowodzeń może być fakt, że metalotioneiny w obecności tlenu są wyjątkowo niestabilne [43, 47, 68]. Murphy

i wsp. [50] stwierdzili, że ekspozycja homogenatu tkankowego, z którego wyizolowano metalotioneiny rzodkiewnika, na tlen atmosferyczny prowadziła do degradacji lub utleniania metalotionein. Natomiast inne białka wiążące miedź nie ulegały rozpadowi w obecności tlenu.

Ze względu na trudności w prowadzeniu badań na metalotioneinach *in planta* podjęto zakończone sukcesami prace nad uzyskaniem zrekombinowanych metalotionein w komórkach drożdży i bakterii. Uzyskane białka przetestowano pod kątem zdolności do wiązania metali i uzyskiwania tolerancji wobec metali przez organizmy, w których ulegały ekspresji. Zrekombinowane białko *PsMT₄* formowało kompleksy z miedzią, cynkiem i kadmem. Wartości pH, w których 50% metalu ulegało dysocjacji (kryterium stosowane dla odróżnienia metalotionein od innych białek wiążących metale), określone dla zrekombinowanej metalotioneiny grochu względem cynku i kadmu były zgodne z wartościami ustalonymi dla metalotioneiny konia [65]. Również trzy zrekombinowane metalotioneiny bobu były zdolne do wiązania wyżej wspomnianych jonów metali, gdy ulegały ekspresji w komórkach *E. coli* [25].

Ekspresja metalotionein rzodkiewnika w zmutowanych szczepach drożdży, pozbawionych endogennej metalotioneiny i przez to nadwrażliwych na metale ciężkie, komplementowała mutację przywracając tolerancję na miedź i kadm [73]. Podobnie ekspresja metalotioneiny kostrzewy czerwonej w mutantach drożdży umożliwiała im wzrost na pożywkach o dużych stężeniach miedzi, kadmu, chromu, cynku i ołowiu [45]. Ekspresja zrekombinowanej metalotioneiny typu 2 rzodkiewnika w zmutowanych komórkach *Synechococcus*, pozbawionych endogennej metalotioneiny cynkowej, częściowo komplementowała mutację. Natomiast zrekombinowana metalotioneina rzodkiewnika z komórek *E. coli* wykazywała wyższe powinowactwo wobec jonów cynku niż fitochelatyny [61].

Powyższe wyniki wskazują, że metalotioneiny roślinne, tak jak zwierzęce, zdolne są do spełniania biologicznej funkcji, czyli nadawania odporności na metale ciężkie.

LOKALIZACJA KOMÓRKOWA

Zwierzęce metalotioneiny zostały zlokalizowane w cytoplazmie, a także w pewnych warunkach fizjologicznych w jądrze, w czasie przejścia z fazy G_1 do S cyklu komórkowego [44] czy w okresie noworodkowym [22]. Co prawda metalotioneiny nie mają sygnału lokalizacji jądrowej, wykazano jednak, że są one związane z cytoszkieletem w przestrzeni perinuklearnej i dzięki temu możliwy jest ich szybki transport do jądra [44]. W przypadku roślinnych metalotionein lokalizację MT2a i MT3 rzodkiewnika ulegających ekspresji w komórkach aparatów szparkowych bobu ustalono przy wykorzystaniu białek fuzyjnych z GFP. Zieloną fluorescencję zaobserwowano jedynie w cytoplazmie. Lokalizacja białek fuzyjnych nie ulegała zmianie w obecności kadmu, co sugeruje, że mechanizm detoksykacji metali jest odmienny niż u fitochelatyn, które po skompleksowaniu z metalami transportowane są do wakuoli [43].

ROLA METALOTIONEIN U ROŚLIN

Reszty cysteinowe metalotionein są naturalnym ligandem dla cynku i miedzi. Chelatując te metale w warunkach fizjologicznych, metalotioneiny utrzymują ich homeostazę u zwierząt i grzybów [2, 52]. Białka te wiążą również metale toksyczne, głównie kadm, dzięki czemu chronią komórki przed ich szkodliwym wpływem [23, 24, 39], a także zapobiegają skutkom stresu oksydacyjnego. Wykazano, że metalotioneiny ssaków mogą funkcjonalnie komplementować dysmutazę ponadtlenkową u drożdży [16].

Rola roślinnych metalotionein nie jest dokładnie określona, choć na podstawie zebranych danych udało się zaproponować dla nich kilka przypuszczalnych funkcji. Sugeruje się udział tych białek w utrzymaniu homeostazy miedzi, która jest istotnym mikroelementem dla bakterii, grzybów, roślin i zwierząt. Wchodzi w skład grup prostetycznych wielu enzymów i pośredniczy w transporcie elektronów, jednak nadmiar jonów miedzi jest szkodliwy dla błon biologicznych, DNA i białek. Dostępność i transport miedzi podlegają ścisłej kontroli, dlatego w normalnych warunkach nie jest możliwe znalezienie wolnych jonów w komórce [64]. Zaangażowanie roślinnych metalotionein w gospodarkę miedzi potwierdzają liczne dowody. Zrekombinowane białka, uzyskane w komórkach *E. coli* transformowanych roślinnymi genami metalotionein, są zdolne do wiązania tych jonów [25, 47, 65]. Ponadto ekspresja genów roślinnych w zmutowanych szczepach drożdży, pozbawionych endogennej metalotioneiny, przywraca im tolerancję na obecność jonów miedzi [45, 73]. Miedź jest także najsilniejszym induktorem ekspresji genu *MT2* rzodkiewnika [43], z kolei ekspresja genu *MT1* tej rośliny zachodzi w organach bogatych w jony miedzi m.in. w pylnikach i słupkach. Wykazano, że niedobory miedzi zaburzają rozwój kwiatów, więc rola metalotionein może polegać na dostarczaniu do tych organów wspomnianych jonów [26]. Transkrypty obydwu wymienionych genów akumulują się także we włoskach liściowych, co odzwierciedla wymagania tych komórek na duże ilości miedzi, w związku z metabolizmem flawonoidów i antocyjanów oraz enzymów, takich jak peroksydaza i oksydaza polifenolowa, zaangażowanych w odpowiedź obronną [26]. Możliwe też, że metalotioneiny zaangażowane są w detoksykację metali w liściach. Chelatując metale w komórkach włosków, chronią komórki mezofilu przed ich szkodliwym wpływem [26].

Badania dotyczące lepnicy rozdętej wykazały, że osobniki, należące do populacji charakteryzującej się wysoką odpornością na miedź, miały wyższy poziom transkrypcji genu *SvMT2a* niż rośliny tego gatunku wrażliwe na jony miedzi. Analiza Southern-blot ujawniła, że jest to spowodowane amplifikacją genu *SvMT2a* w genomie osobników o podwyższonej tolerancji [67].

Należy również zwrócić uwagę na fakt, że fitochelatyny, roślinne peptydy odpowiedzialne za detoksykację kadmu [66] są co prawda zdolne do wiązania miedzi w warunkach *in vivo* [46], jednak mutanty rzodkiewnika pozbawione enzymu odpowiedzialnego za ich syntezę nie wykazują podwyższonej wrażliwości na ten pierwiastek. Tak więc fitochelatyny najwyraźniej nie uczestniczą w detoksykacji miedzi; w ten proces zaangażowany jest inny mechanizm, prawdopodobnie przy udziale metalotionein.

Sugeruje się również udział opisywanych białek w homeostazie cynku. Jedyna wyizolowana do tej pory roślinna metalotioneina skompleksowana była właśnie z jonami cynku [36]. Ponadto zauważono, że jej akumulacja zachodzi w określonym stadium rozwojowym zarodka, kiedy to następuje przejście od fazy proliferacji do różnicowania [36, 60]. Może to świadczyć o tym, że białko Ec jest magazynem cynku, dostępnego w razie potrzeby dla polimeraz DNA i RNA oraz czynników transkrypcyjnych [60]. U zwierząt wykazano udział metalotionein w procesie podziału komórki [71] oraz ich nagromadzenie w tkankach proliferujących i nowotworowych [22, 24]. Również u roślin zauważono akumulację mRNA metalotionein w tkankach intensywnie dzielących się [47], co wskazuje na udział w podziałach komórkowych także w organizmach roślinnych.

Roślinne metalotioneiny mogą być zaangażowane również w metabolizm innych metali niezbędnych dla organizmu oraz tolerancję na szkodliwe metale niepełniące roli fizjologicznej, czego dowodzą badania prowadzone zarówno na drożdżach, jak i roślinach [43, 45, 47, 73]. Ponadto sugeruje się udział tych białek w transporcie niektórych pierwiastków. Zauważono, że transkrypty gromadzą się w tkankach przewodzących liści oraz w starzejących się liściach, skąd przypuszczalnie wycofują pierwiastki potrzebne dla rozwoju pozostałych organów, właśnie za pośrednictwem systemu przewodzącego [26, 33].

Przypuszcza się również, że roślinne metalotioneiny chronią komórki przed stresem oksydacyjnym [9]. Jego bezpośrednią przyczyną jest podwyższony poziom reaktywnych form tlenu (ROS), do których zaliczamy rodnik hydroksylowy, anionorodnik ponadtlenkowy, nadtlenek wodoru i tlen singletowy. Modyfikują one różne związki biologiczne, jednak głównym składnikiem komórki ulegającym oksydacji są białka. Do powstawania ROS przyczyniają się zarówno źródła endogenne, np. reakcje peroksydacji lipidów czy reakcje katalizowane przez oksydazy i jony metali (Cu^{2+} i Fe^{3+}) oraz egzogenne, np. promieniowanie jonizujące. Organizmy bronią się przed ich szkodliwym wpływem wytwarzając związki o charakterze antyoksydantów. Ważną rolę spełniają również enzymy, takie jak: dysmutaza ponadtlenkowa i katalaza oraz białka wiążące jony miedzi i żelaza [54].

Transkrypty roślinnych metalotionein zlokalizowano w starzejących się liściach. Metalotioneiny mogą być tam potrzebne, by chronić sąsiednie tkanki przed wolnymi rodnikami powstającymi w procesach starzenia [33, 47, 54]. Ponadto czynniki generujące ROS odpowiedzialne są również za indukcję genów kodujących metalotioneiny [20], głównie są to metale ciężkie, które przyczyniają się do powstania stresu oksydacyjnego [55]. Silnego dowodu potwierdzającego zaangażowanie metalotionein w ochronę struktur komórkowych przed reaktywnymi formami tlenu dostarczyli Lee i wsp. [43], którzy udowodnili, że metalotioneina rzodkiewnika, ulegająca ekspresji w transformowanych komórkach szparkowych bobu, powoduje obniżenie poziomu ROS, powstających po potraktowaniu komórek kadmem.

UWAGI KOŃCOWE

Roślinne metalotioneiny, w przeciwieństwie do zwierzęcych, stanowią bardzo zróżnicowaną klasę białek; przejawia się to zarówno w ich strukturze, jak i regulacji ich ekspresji. U zwierząt występują cztery izoformy metalotionein oznaczone odpowiednio numerami I, II, III i IV. Wszystkie mają ten sam, konserwatywny wzorec reszt cysteinowych i tylko dwie ostatnie izoformy są organospecyficzne [2, 51, 52]. U roślin sytuacja jest bardziej złożona. Różnorodna struktura pierwszorzędowa sprawia, że mimo podziału na cztery typy, niektórych białek nie można zakwalifikować do żadnego z nich. Ponadto nie udało się dotychczas ustalić uniwersalnego wzoru ekspresji; często nawet metalotioneiny należące do jednego typu, ale pochodzące z różnych gatunków, występują w innych organach. Nierozstrzygnięta pozostaje również kwestia regulacji ekspresji roślinnych metalotionein. Jest to bez wątpienia proces wysoce skoordynowany i składa się na mechanizm homeostazy komórki. Przykładowo jony metali indukują w określonej tkance geny tylko jednego typu, a na inne albo nie mają wpływu, albo powodują ich represję. Nasuwa się w związku z tym wniosek, że różne typy metalotionein są funkcjonalnie odmienne.

Niezbędne są dalsze badania w tej dziedzinie, skupiające się zwłaszcza na wyizolowaniu natywnych produktów białkowych oraz poznaniu molekularnych mechanizmów regulacji kodujących je genów. Pozwoliłoby to w przyszłości wykorzystać je w fitoremediacji. Transformowanie roślin genami kodującymi metalotioneiny z gatunków odpornych na wysokie stężenia metali ciężkich przypuszczalnie podwyższyłoby ich tolerancję na ten czynnik, dzięki czemu mogłyby nie tylko żyć w zanieczyszczonym środowisku, ale i aktywnie je oczyszczać.

LITERATURA

- [1] ABDULLAH SNA, CHEAH SC, MURPHY DJ. Isolation and characterisation of two divergent type 3 metallothioneins from oil palm, *Elaeis guineensis*. *Plant Physiol Biochem* 2002; **40**: 255–263.
- [2] 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.
- [3] BINZ PA, KÄGI JHR. 1999; <http://www.biochem.unizh.ch/mtpage/classif.html>.
- [4] BREEZE E, WAGSTAFF C, HARRISON E, BRAMKE I, ROGERS H, STEAD A, THOMAS B, BUCHANAN-WOLLASTON V. Gene expression patterns to define stages of post-harvest senescence in *Alstroemeria* petals. *Plant Biotech J* 2004; **2**: 155–168.
- [5] BUCHANAN-WOLLASTON V. Isolation of cDNA clones for genes that are expressed during leaf senescence in *Brassica napus*. *Plant Physiol* 1994; **105**: 839–846.
- [6] BUTT A, MOUSLEY C, MORRIS K, BEYNON J, CAN C, HOLUB E, GEENBERG JT, BUCHANAN-WOLLASTON V. Differential expression of a senescence-enhanced metallothionein gene in *Arabidopsis* in response to isolates of *Peronospora parasitica* and *Pseudomonas syringae*. *Plant J* 1998; **16**: 209–221.
- [7] CHANG T, LIU X, XU H, MENG K, CHEN S, ZHU Z. A metallothionein-like gene *htMT2* strongly expressed in internodes and nodes of *Helianthus tuberosus* and effects of metal ion treatment on its expression. *Planta* 2004; **218**: 449–455.
- [8] CHATTAI M, KAUKINEN KH, TRANBARGER TJ, GUPTA PK, MISRA S. The isolation of a novel metallothionein-related cDNA expressed in somatic and zygotic embryos of Douglas-fir: regulation by ABA, osmoticum, and metal ions. *Plant Mol Biol* 1997; **34**: 243–254.

- [9] CHEN H-J, HOU W-C, YANG C-Y, HUANG D-J, LIU J-S, LIN Y-H. Molecular cloning of two metallothionein-like protein genes with differential expression patterns from sweet potato (*Ipomoea batatas*) leaves. *J Plant Physiol* 2003; **160**: 547–555.
- [10] CHEN WM, HSIEH HM, HUANG PC. Type 2 rice metallothionein-like gene has two introns. *DNA Seq* 1998; **8**: 223–228.
- [11] CHEVALIER C, BOURGEOIS E, PRADET A, RAYMOND P. Molecular cloning and characterization of six cDNAs expressed during glucose starvation in excised maize (*Zea mays* L.) root tips. *Plant Mol Biol* 1995; **28**: 473–485.
- [12] CHOI D, KIM HM, YUN HK, PARK J-A, KIM WT, BOK SH. Molecular cloning of a metallothionein-like gene from *Nicotiana glutinosa* L. and its induction by wounding and tobacco mosaic virus infection. *Plant Physiol* 1996; **112**: 353–359.
- [13] COBBETT CS. Phytochelatin and their role in heavy metal detoxification. *Plant Physiol* 2000; **123**: 825–833.
- [14] COBBETT CS, GOLDSBROUGH P. Phytochelatin and metallothioneins: roles in heavy metal detoxification and homeostasis. *Annul Rev Plant Biol* 2002; **53**: 159–182.
- [15] COUPE SA, TAYLOR JE, ROBERTS JA. Characterisation of an mRNA encoding a metallothionein-like protein that accumulates during ethylene-promoted abscission of *Sambucus nigra* L. leaflets. *Planta* 1995; **197**: 442–447.
- [16] DALTON TP, LI Q, BITTEL D, LIANG L, ANDREWS GK. Oxidative stress activates metal-responsive transcription factor-1 binding activity. *J Biol Chem* 1996; **271**: 26233–26241.
- [17] DAVIES C, ROBINSON SP. Differential screening indicates a dramatic change in mRNA profiles during grape berry ripening. Cloning and characterization of cDNAs encoding putative cell wall and stress response proteins. *Plant Physiol* 2000; **122**: 803–812.
- [18] de FRAMOND A. A metallothionein-like gene from maize (*Zea mays*). Cloning and characterisation. *FEBS Lett* 1991; **290**: 103–106.
- [19] de MIRANDA JR, THOMAS MA, THURMAN DA, TOMSETT AB. Metallothionein genes from the flowering plant *Mimulus guttatus*. *FEBS Lett* 1990; **260**: 277–280.
- [20] DUNAEVA M, ADAMSKA I. Identification of genes expressed in response to light stress in leaves of *Arabidopsis thaliana* using RNA differential display. *Eur J Biochem* 2001; **268**: 5521–5529.
- [21] EVANS M, GATEHOUSE LN, GATEHOUSE JA, ROBINSON NJ, CROY RRD. A gene from pea (*Pisum sativum* L.) with homology to metallothionein genes. *FEBS Lett* 1990; **262**: 29–32.
- [22] FLORIAŃCZYK B. Funkcja metalotionein w ustroju. *Post Hig Med Dośw* 1996; **50**: 375–382.
- [23] FLORIAŃCZYK B. Detoksykacyjna funkcja metalotionein. *Now Lek* 1997; **66**: 310–318.
- [24] FLORIAŃCZYK B. Czynniki indukujące syntezę metalotionein. *Post Hig Med Dośw* 2000; **54**: 687–697.
- [25] FOLEY RC, LIANG ZM, SINGH KB. Analysis of type 1 metallothionein cDNAs in *Vicia faba*. *Plant Mol Biol* 1997; **33**: 583–591.
- [26] GARCÍA-HERNÁNDEZ M, MURPHY A, TAI Z. Metallothioneins 1 and 2 have distinct but overlapping expression patterns in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 1998; **118**: 387–397.
- [27] GIBBINGS JG, COOK BP, DUFAULT MR, MADDEN SL, KHURI S, TURNBULL CJ, DUNWELL JM. Global transcript analysis of rice leaf and seed using SAGE technology. *Plant Biotech J* 2003; **1**: 271–285.
- [28] GIRITCH A, GANAL M, STEPHAN UW, BÄUMLEIN H. Structure, expression and chromosomal localisation of the metallothionein-like gene family of tomato. *Plant Mol Biol* 1998; **37**: 701–714.
- [29] GUO WJ, BUNDITHYA W, GOLDSBROUGH PB. Characterization of the *Arabidopsis* metallothionein gene family: tissue-specific expression and induction during senescence and in response to copper. *New Phytol* 2003; **159**: 369–381.
- [30] GUYON VN, ASTWOOD JD, GARNER EC, DUNKER AK, TAYLOR LP. Isolation and characterization of cDNAs expressed in the early stages of flavonol-induced pollen germination in petunia. *Plant Physiol* 2000; **123**: 699–710.
- [31] HSIEH H-M, LIU WK, HUANG PC. A novel stress-inducible metallothionein-like gene from rice. *Plant Mol Biol* 1995; **28**: 381–389.
- [32] HSIEH H-M, LIU W-K, CHANG A, HUANG PC. RNA expression patterns of a type 2 metallothionein-like gene from rice. *Plant Mol Biol* 1996; **32**: 525–529.
- [33] HUANG YJ, TO KY, YAP M-N, CHIANG W-J, SUEN D-F, CHEN S-CG. Cloning and characterisation of leaf senescence up-regulated genes in sweet potato. *Physiol Plant* 2001; **113**: 384–391.
- [34] ITAI A, TANABE K, TAMURA F, TANAKA T. Isolation of cDNA clones corresponding to genes expressed during fruit ripening in Japanese pear (*Pyrus pyrifolia* Nakai): involvement of the ethylene signal transduction pathway in their expression. *J Exp Bot* 2000; **51**: 1163–1166.

- [35] JIANG H, FU K, ANDREWS K. 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.
- [36] KAWASHIMA I, KENNEDY TD, CHINO M, LANE BG. Wheat Ec metallothionein genes. Like mammalian Zn²⁺ metallothionein genes, wheat Zn²⁺ metallothionein genes are conspicuously expressed during embryogenesis. *Eur J Biochem* 1992; **209**: 971–976.
- [37] KILLE P, WINGE DR, HARWOOD JL, KAY J. A plant metallothionein produced in *E. coli*. *FEBS Lett* 1991; **295**: 171–175.
- [38] KIM HU, KIM JB, YUN CH, KANG SK, CHUNG TY. Nucleotide sequence of cDNA clone encoding a metallothionein-like protein from Chinese cabbage. *Plant Physiol* 1995; **108**: 863.
- [39] KLAASSEN CD, LIU J, CHOUDHURI S. Metallothionein: An Intracellular Protein to Protect Against Cadmium Toxicity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1999; **39**: 267–294.
- [40] KLEMSDAL SS, HUGHES W, LONNEBORG A, AALEN RB, OLSEN OA. Primary structure of a novel barley gene differentially expressed in immature aleurone layers. *Mol Gen Genet* 1991; **228**: 9–16.
- [41] KOHLER A, BLAUDEZ D, CHALOT M, MARTIN F. Cloning and expression of multiple metallothioneins from hybrid poplar. *New Phytologist* 2004; **164**: 83–93.
- [42] LEDGER SE, GARDNER RC. Cloning and characterization of five cDNAs for genes differentially expressed during fruit development of kiwifruit (*Actinidia deliciosa* var. *deliciosa*). *Plant Mol Biol* 1994; **25**: 877–886.
- [43] LEE J, SHIM D, SONG W-Y, HWANG I, LEE Y. *Arabidopsis* metallothioneins 2a and 3 enhance resistance to cadmium when expressed in *Vicia faba* guard cells. *Plant Mol Biol* 2004; **54**: 805–815.
- [44] LEVADOUX M, MAHON C, BEATTIE JH, WALLACE HM, HESKETH JE. Nuclear import of metallothionein requires its mRNA to be associated with the perinuclear cytoskeleton. *J Biol Chem* 1999; **274**: 34961–34966.
- [45] MA M, LAU P-S, JIA Y-T, TSANG W-K, LAM SKS, TAM NFY, WONG Y-S. The isolation and characterization of type 1 metallothionein (MT) cDNA from a heavy-metal-tolerant plant, *Festuca rubra* cv. Merlin. *Plant Sci* 2003; **164**: 51–60.
- [46] MAITANI T, KUBOTA H, SATO K, YAMADA T. The Composition of Metals Bound to Class III Metallothionein (Phytochelatin and Its Desglycyl Peptide) Induced by Various Metals in Root Cultures of *Rubia tinctorum*. *Plant Physiol* 1996; **110**: 1145–1150.
- [47] MIR G, DOMÈNECH J, HUGUET G, GUO W-J, GOLDSBROUGH P, ATRIAN S, MOLINAS M. A plant type 2 metallothionein (MT) from cork tissue responds to oxidative stress. *J Exp Bot* 2004; **55**: 2483–2493.
- [48] MORRIS CA, NICOLAUS B, SAMPSON V, HARWOOD JL, KILLE P. Identification and characterization of a recombinant metallothionein protein from marine alga *Fucus vesiculosus*. *Biochem J* 1999; **338**: 553–560.
- [49] MURPHY A, TAIZ L. Comparison of metallothionein gene expression and nonprotein thiols in ten *Arabidopsis* ecotypes. *Plant Physiol* 1995; **109**: 945–954.
- [50] MURPHY A, ZHOU J, GOLDSBROUGH PB, TAIZ L. Purification and immunological identification of metallothioneins 1 and 2 from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol* 1997; **113**: 1293–1301.
- [51] OPPERMANN B, ZHANG W, MAGABO K, KANTOROW M. Identification and spatial analysis of metallothioneins expressed by the adult human lens. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001; **42**: 188–193.
- [52] PALMITER RD. The elusive function of metallothioneins. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; **95**: 8428–8430.
- [53] PECZYŃSKA-CZOCH W. Metalotioneiny. *Wiad Chem* 1995; **49**: 515–524.
- [54] PONCZEK MB, WACHOWICZ B. Oddziaływanie reaktywnych form tlenu i azotu z białkami. *Post Bioch* 2005; **51**: 140–145.
- [55] PUZIO M. Metalotioneiny jako regulatory poziomu metali ciężkich; rola w komórkach układu odpornościowego. *Wszechświat* 2004; **105**: 161–164.
- [56] RAUSER WE. Phytochelatin and related peptides: structure, biosynthesis, and function. *Plant Physiol* 1995; **109**: 1141–1149.
- [57] RAUSER WE. Structure and function of metal chelators produced by plants: the case for organic acids, aminoacids, phytin and metallothioneins. *Cell Biochem Biophys* 1999; **31**: 19–48.
- [58] REID S, ROSS GS. Up-regulation of two cDNA clones encoding metallothionein-like proteins in apple fruit during cool storage. *Physiol Plant* 1997; **100**: 183–189.
- [59] REYMOND P, WEBER H, DAMOND M, FARMER EE. Differential gene expression in response to mechanical wounding and insect feeding in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 2000; **12**: 707–719.
- [60] ROBINSON NJ, TOMMEY AM, KUSKE C, JACKSON JP. Plant metallothioneins. *Biochem J* 1993; **295**: 1–10.

- [61] ROBINSON NJ, WILSON JR, TURNER JS. Expression of the type 2 metallothionein-like gene MT2 from *Arabidopsis thaliana* in Zn⁽²⁺⁾-metallothionein-deficient *Synechococcus* PCC 7942: putative role for MT2 in Zn²⁺ metabolism. *Plant Mol Biol* 1996; **30**: 1169–1179.
- [62] SNOWDEN KC, GARDNER RC. Five genes induced by aluminium in wheat (*Triticum aestivum* L.) roots. *Plant Physiol* 1993; **103**: 855–861.
- [63] SNOWDEN KC, RICHARDS KD, GARDNER RC. Aluminium induced genes. Induction by toxic metals, low calcium, and wounding and pattern of expression in root tips. *Plant Physiol* 1995; **107**: 341–348.
- [64] TAPIA L, GONZÁLEZ-AGÜERO M, CISTERNAS MF, SUAZOM, CAMBIAZO V, UAUY R, GONZÁLEZ M. Metallothionein is crucial for safe intracellular copper storage and cell survival at normal and supra-physiological exposure levels. *Biochem J* 2004; **378**: 617–624.
- [65] TOMMEY AM, SHI J, WILLIAM PL, URWIN PE, ROBINSON NJ. Expression of the pea gene *PsMT_A* in *E. coli*. Metal binding properties of the expressed protein. *FEBS Lett* 1991; **292**: 48–52.
- [66] TUKENDORF A. Fitochelaty. *Post Bioch* 1993; **39**: 60–67.
- [67] van HOOFF NA, HASSINEN VH, HAKVOORT HW, BALLINTIEN KF, SCHAT H, VERKLEIJ JA, ERNST WH, KARENLAMPI SO, TERVAHAUTA AI. Enhanced copper tolerance in *Silene vulgaris* (Moench) Garcke populations from copper mines is associated with increased transcript levels of a 2b-type metallothionein gene. *Plant Physiol* 2001; **126**: 1519–1526.
- [68] WASINKIEWICZ K, WOJTERA J, TOMASZEWSKA B. Transformowanie roślin w celu ich wykorzystania w fitoremediacji terenów zanieczyszczonych metalami ciężkimi. *Biotechnologia* 2004; **64**: 108–126.
- [69] WHITE CN, RIVIN CJ. Characterization and expression of a cDNA encoding a seed-specific metallothionein in maize. *Plant Physiol* 1995; **108**: 831–832.
- [70] WHITELAW CA, LE HUQUET JA, THURMAN DA, TOMSETT AB. The isolation and characterisation of type II metallothionein-like genes from tomato (*Lycopersicon esculentum* L.). *Plant Mol Biol* 1997; **33**: 503–511.
- [71] WŁOSTOWSKI T. Metalotioneina a podział komórki. *Kosmos* 1995; **44**: 89–98.
- [72] ZENK MH. Heavy metal detoxification in higher plants – a review. *Gene* 1996; **179**: 21–30.
- [73] ZHOU J, GOLDSBROUGH PB. Functional homologs of fungal metallothionein genes from *Arabidopsis*. *Plant Cell* 1994; **6**: 875–884.
- [74] ZHOU J, GOLDSBROUGH PB. Structure, organization and expression of the metallothionein gene family in *Arabidopsis*. *Mol Gen Genet* 1995; **248**: 318–328.

Redaktor prowadzący – Maria Olszewska

Otrzymano; 06.02.2006 r.

Przyjęto; 18.04.2006 r.

ul. Gagarina 9, 87-100 Toruń,

e-mail: browsk@uni.torun.pl