

METALOTHIONEIN JAKO PROGNOSTICKÝ MARKER NÁDOROVÉHO ONEMOCNĚNÍ

METALLOTHIONEIN AS A PROGNOSTIC MARKER OF TUMOR DISEASE

ZELENÁ J.¹, POTĚŠIL D.¹, VACEK J.¹, ADAM V.¹, HRADECKÝ J.¹, PRŮŠA R.², KIZEK R.¹, VOJTĚŠEK B.

¹ ÚSTAV CHEMIE A BIOCHEMIE, MENDELOVA ZEMĚDĚLSKÁ A LESNICKÁ UNIVERZITA, BRNO

² ÚSTAV KLINICKÉ BIOCHEMIE A PATOBIOCHEMIE, 2. LÉKAŘSKÁ FAKULTA UNIVERZITY KARLOVY, PRAHA

³ ZÁKLADNA EXPERIMENTÁLNÍ ONKOLOGIE, MASARYKŮV ONKOLOGICKÝ ÚSTAV, BRNO

Souhrn: Metallothionein (MT) je nízkomolekulární intracelulární protein, jehož primární funkcí je udržení homeostázy těžkých kovů v živých organismech. O molekulárních mechanismech exprese MT je známo velmi málo. Regulace exprese se pravděpodobně účastní samotný kov vazbou na transkripční faktor MTF-1. Syntéza lidského metallothioneinu (MT-1a, MT-2a) může být indukována vzrůstající koncentrací těžkých kovů, hormonů, cytokinů nebo xenobiotik. Nedávné výzkumy ukazují na významný vztah koncentrace MT ke karcinogenezi, spontánní mutagenезi a účinnosti protinádorových léčiv. Overexprese metallothioneinů je studována jako nový prognostický marker u řady maligních a gradingovaných nádorů.

Klíčová slova: metallothionein, MT, diagnostika, zvýšená exprese, prognostický marker, lidské nádory

Summary: Metallothionein is a low-molecular intracellular protein which can play an important role in heavy metal homeostasis in living organisms. Less is known about molecular mechanisms of MT expression. Metals probably participate in MT expression by binding to transcriptional factor MTF-1. Expression of human metallothioneins (MT-1a, MT-2a) can be induced by increasing amount of heavy metals, hormones, cytokines, and/or xenobiotics. Recent studies described the important relationship between MT and carcinogenesis, spontaneous mutagenesis and anti-cancer drugs. Overexpression of metallothioneins is studied as a new prognostic marker in a number of malignant and high grading tumors.

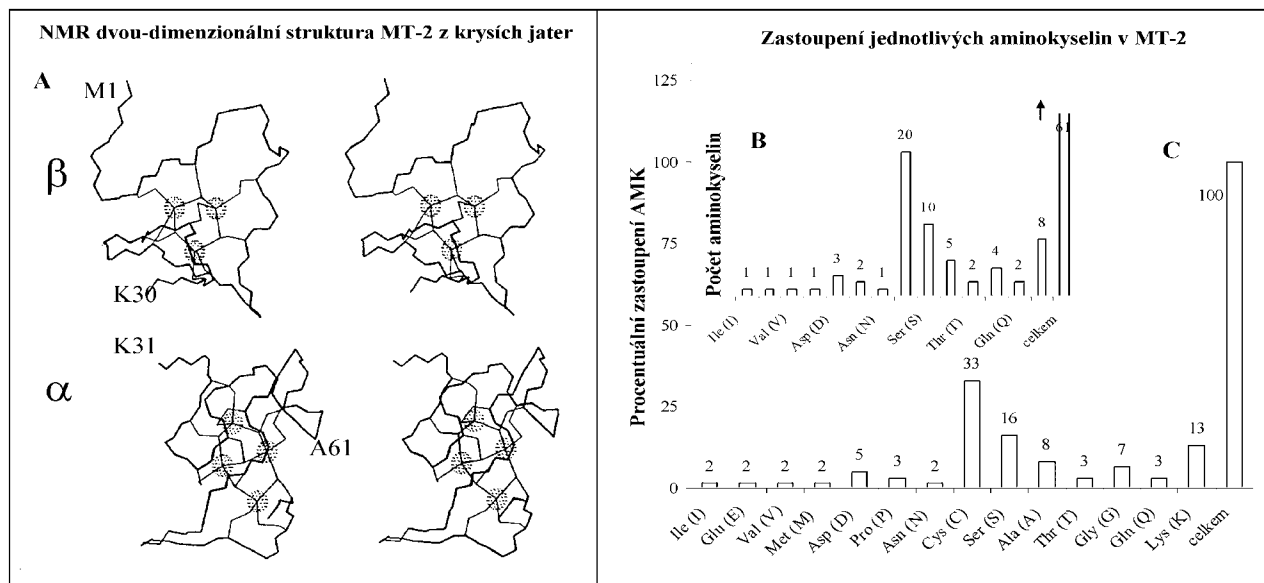
Key words: metallothionein, MT, diagnostics, overexpression, prognostic marker, human tumors

Úvod

Metallothioneiny (MT) patří do skupiny intracelulárních, nízkomolekulárních na cystein velmi bohatých proteinů (obsah Cys až 30 % v molekule proteinu) o molekulové hmotnosti od 6–10 kDa (1). Díky své vysoké afinitě k těžkým kovům, např. k zinku, mědi nebo kadmii, je jejich hlavní funkcí homeostatická kontrola a detoxikace těchto těžkých kovů u vývojově rozdílných organismů. Objev MT je datován rokem 1957, kdy

Margoshes a Valee izolovali MT z koňských ledvin (2). V molekule MT nejsou přítomny aromatické aminokyseliny a 20 cysteinů se v primární sekvenci vyskytuje obvykle v těchto repetičích: Cys-X-Cys, Cys-Cys-X-Cys-Cys, Cys-X-Cys-Cys, kde X představuje jinou aminokyselinu než cystein. MT se skládají ze dvou vazebných domén (α , β), které jsou složeny z cysteinových klastrů a kovalentní vazby atomů kovů se účastní sulfhydrylové zbytky cysteinů (Obr. 1). N-terminální

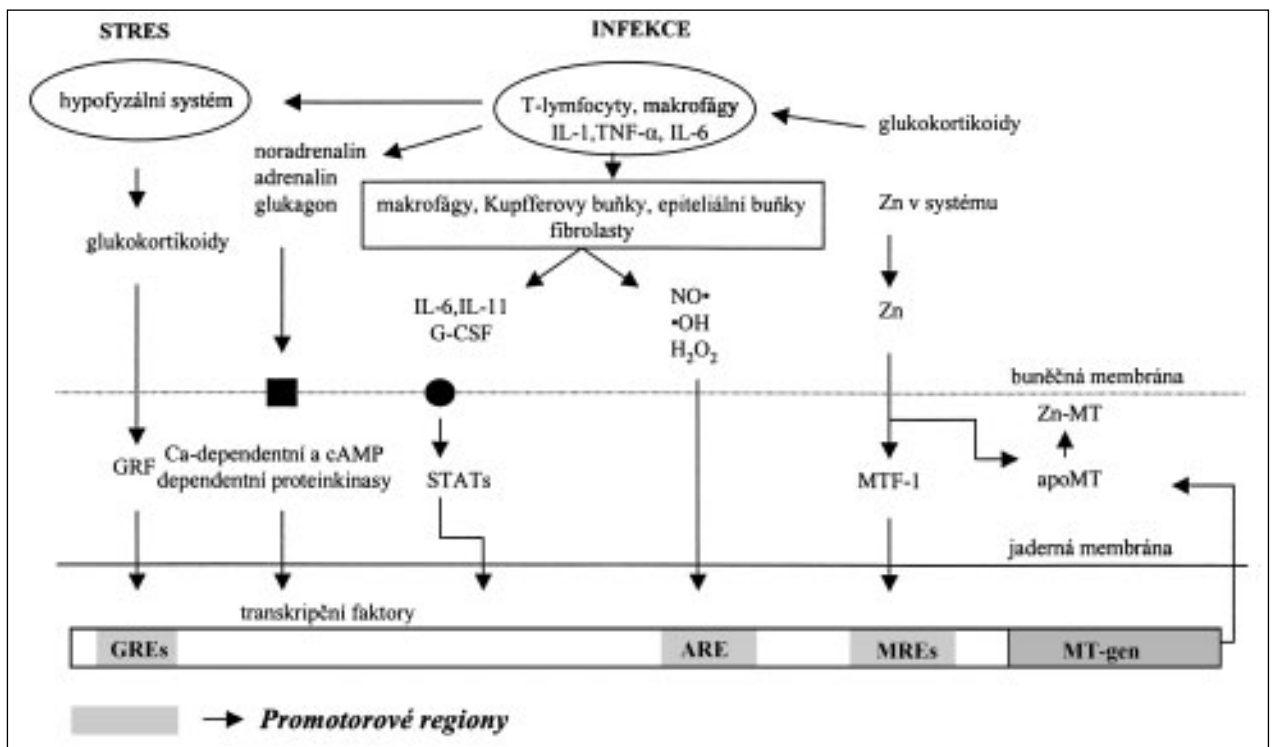
Obr. 1. NMR dvou-dimenzionální struktura β -domény (nahore) a α -domény (dole) MT-2 izolovaného z krysích jater. Tečkami vyznačené oblasti reprezentují atomy kadmia (A). Počet (B) a procentické zastoupení (C) jednotlivých aminokyselin v MT-2 proteinu (izolát z krysích jater). *Převzato a upraveno podle Kägi, Schäffer 1988.*



Obr. 2. Klasifikace metalothioneinů a aminokyselinové sekvence u různých organismů. Vysvětlivky: a) třída MT-I, proteiny zařazené do této třídy byly determinovány u vyšších organismů, především u savců; b) třída MT-II je strukturou podobná metalothioneinům třídy MT-I determinována u savců, ale i v kvasinkách a bakteriích; c) zkratky uvedené v závorkách jsou označení pro specifické isoformy metalothioneinů; převzato z databáze Swiss-Prot (ExPASy Molecular Biology Server, zdroj: <http://www.expasy.ch>).

	1	20	40	60
TŘÍDA I ^{a)}	Člověk (MT-1a ^{a)})	MDPNCSCATGGSCCTCTGSCKCKECKNSCKKSCCSCCPMSCAKCAQGCICKGASEKCSCCA		
	Kůň (MT-1a)	MDPNCSCPTGGSCCTCAGSCKCKECCRTSCKKSCCSCCPGGCARCAQGCVCCKGASDKCSCCA		
	Ovce (MT-1b)	MDPNCSCPTSGS CSCAGSCTCKACRCPSCCKKSCCSCCPVCGAKCAQGCVCCKGASDKCSCCA		
	Pes (MT-1)	MDPDCSCSTGGSCCTCAGSCKCKECKCTSCCKKSCCSCCPVCGAKCAQGCICKGASDKCSCCA		
	1	20	40	60
TŘÍDA II ^{b)}	Prase (MT-2a)	MDPNCSCAAGGSCCTCAGSCKCKDCKCTSCCKKSCCSCCPVCGAKCAQGCICKGASDKCSCCA		
	Kvasinka (<i>E. coli</i> protein)	GNEGHECQCQC GSKNNEQCQKSCSCPTGCNSDDKCPGKNSKSEETFKKSCCSGK		
	<i>Cyanobacterium</i>	TSTTLVKACEPECLCNVDPKALDRNGLYYCCEACADGHTGGSKGCGHTGCNC		
	<i>Candida glabrata</i> (MT-2)	PEQVNCQYDCHCSNCACENTCNCCKAPACTNSASNECSCQTCKCQTCKC		

Obr. 3. Schéma regulace *MT* genu během zánětlivé reakce organismu. Při zánětu se zvyšuje hladina cytokinů (IL-1: interleukin-1, TNF- α : tumor necrosis factor- α a IL-6: interleukin-6) v aktivovaných T-lymfocytech a makrofágích. Hladina glukokortikoidů se při stresu prostřednictvím těchto cytokinů zvyšuje přes aktivovaný hypofyzální systém. Glukokortikoidy se v cytoplasmě vážou na GRF (glucocorticoid receptor komplex) a ten pak aktivuje GRE (glucocorticoid responsive element). Zvýšená hladina Zn iontů vazbou na MTF-1 (metal transkripcion faktor) v cytoplasmě naopak aktivuje MRE (metal response element) (MRE) v promotorové oblasti *MT* genu. Při zánětu se z proteinů akutní fáze uvolňuje IL-6, který spouští kaskádu fosorylace tyrosinových zbytků STATs (signal transducer and activator of transcription) a následně jeho vazbu na odpovídající promotorový region *MT* genu. Reaktivní kyslíkové radikály jsou schopny aktivace *MT* genu prostřednictvím antioxidant response elementu (ARE). Kombinací těchto regulačních mechanismů se efektivně zvyšuje hladina *MT* v buňkách jako odpověď na stres a poškození buňky. Převzato a upraveno podle Coyle, P. et al.



část peptidu je označena jako β -doména, má tři vazebná místa pro dvojmocné ionty a α -doména má schopnost vyvázat čtyři dvojmocné ionty kovů. V případě jednomocných iontů kovů je MT schopen vázat celkem 12 atomů (3). MT jsou rozděleny do tříd MT-I a MT-II s ohledem na jejich primární strukturu a organismus, ze kterého byly izolovány (4). MT-I. třída zahrnuje savčí metalothioneiny tvořené 61 až 68 aminokyselinami s molekulovou hmotností 6–7 kDa. Ve MT-II. třídě jsou zařazeny bakteriální MT, proteiny se vzdálenou podobností

k MT-I. třídě, které mají odlišné rozmístění Cys zbytků v molekule proteinu ve srovnání s MT-I. třídou (Obr. 2).

Isoformy metalothioneinů a jejich exprese v lidské tkáni
Lidské MT patří do I. třídy metalothioneinů a jsou kódovány rodinou genů vytvářejících 10 isoformem. Vzniklé proteiny jsou rozděleny do čtyř skupin: MT-1, MT-2, MT-3 a MT-4. Je známo, že *MT-2A* gen kóduje pouze jeden MT-2 protein, zatímco MT-1 protein existuje ve více isoformách, respektive MT-1

protein vytváří více subtypů kódovaných sadou *MT-1* genů (*MT-1A*, *MT-1B*, *MT-1E*, *MT-1F*, *MT-1G*, *MT-1X*) (5). Rozdíly v MT genech pravděpodobně souvisí s jejich rozdílnou funkcí v odlišných podmínkách, ve kterých se organismy vyvíjely (1, 3). V organismu dospělých jedinců jsou nejvíce zastoupeny dvě isoformy MT (*MT-1a*, *MT-2a*), které se exprimují ve většině lidských tkání, v mozkové tkáni je přítomna pouze isoforma *MT-3* (někdy označována jako růstový inhibiční faktor - GIF) (6). V dlaždicovém epitelu je hojně zastoupena isoforma *MT-4* (7).

MT-1 a *MT-2* isoformy jsou obvykle exprimovány v lidském organismu ve velmi malých koncentracích. Jejich exprese výrazně stoupá při indukci mnoha exogenními a endogenními faktory jako jsou UV záření, těžké kovy (Cd, Cu, Pt, Zn, Pb aj.), stresové hormony, volné kyslíkové radikály a cytokiny uvolňující se z poškozené tkáně či xenobiotika (8). Molekulární mechanismus exprese MT je prozatím znám velmi málo, ale pravděpodobně se ho účastní samotný kov vazbou na specifický transkripční faktor, protein označený jako metal transcription factor 1 (MTF-1) (9). Komplex kov-MTF-1 pak v jádře nasedá na metal-responsive element (MRE) v promotorové oblasti MT-genu a spouští jeho transkripci. Na syntéze MT se mohou podílet další regulační proteiny prostřednictvím responsivních elementů jako je glucocorticoid response element (GRE), interferon response element (IRE), signal transducer and activator of transcription (STAT) nebo antioxidant response element (ARE), dále vazebné receptory spojené s tvor-

Tab. 1. Porovnání analytických metod pro stanovení metalothioneinu.

Metoda ^{a)}	Detekční limit (ng/100 µl)	Vzorek
ELISA	0,2	lidská, krysí moč
Western blotting	10 ng proteinu	vzorky <i>MT-1</i> , <i>MT-2</i> , <i>MT-3</i>
CZE-UV detekce	27,2	ovčí jaterní buňky
HPLC-UV detekce	3,1	lidské jaterní buňky
GPC-fluorimetrie	2	krysí tkáňové buňky
DPP	62	vzorky Cd, Zn-MT
AdTS-CPSA ^{b)}	0,16	krabí tkáň

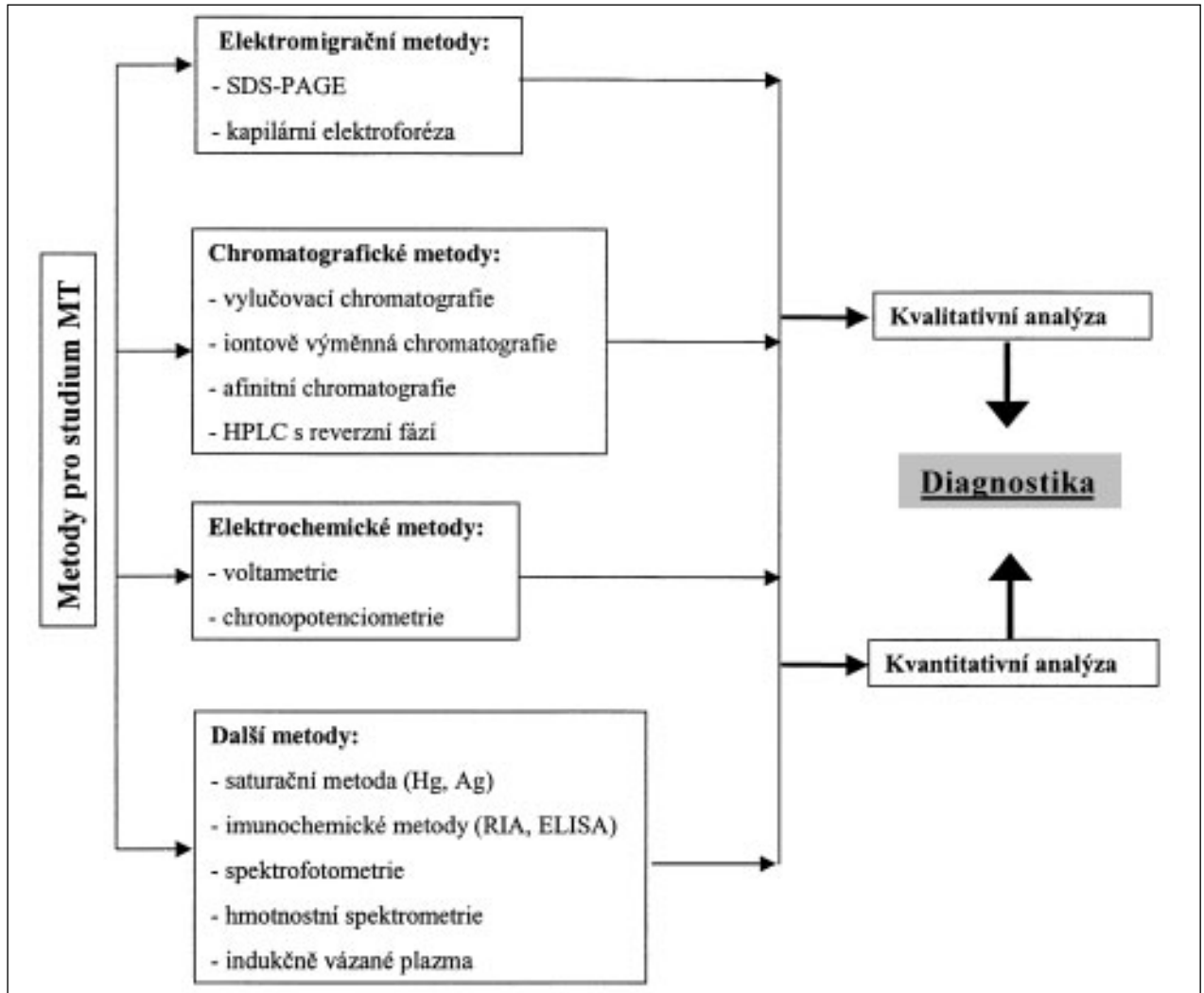
Vysvětlivky: ELISA: enzymová imunoanalýza, CZE: kapilární zónová elektroforéza, HPLC: vysokoúčinná kapalinová chromatografie, GPC: gelová permeační chromatografie, DPP: diferenční pulzní polarografie, AdTS-CPSA: adsorpční přenosová technika kombinovaná s chronopotenciometrickou rozpouštěcí analýzou za konstantního proudu. a) převzato z práce: *Dabrio, M. et al.* b) převzato z práce: *Kizek, R. et al.*

bou druhých posílů či aktivací běžných transkripčních faktorů (Obr. 3) (10). Jednotlivé isoformy metalothioneinů se pak podílejí na metabolismu detoxikace a homeostázy těžkých kovů, účastní se ochrany organismu před vzniklými volnými kyslíkovými radikály a podporují regeneraci poškozené tkáně (11).

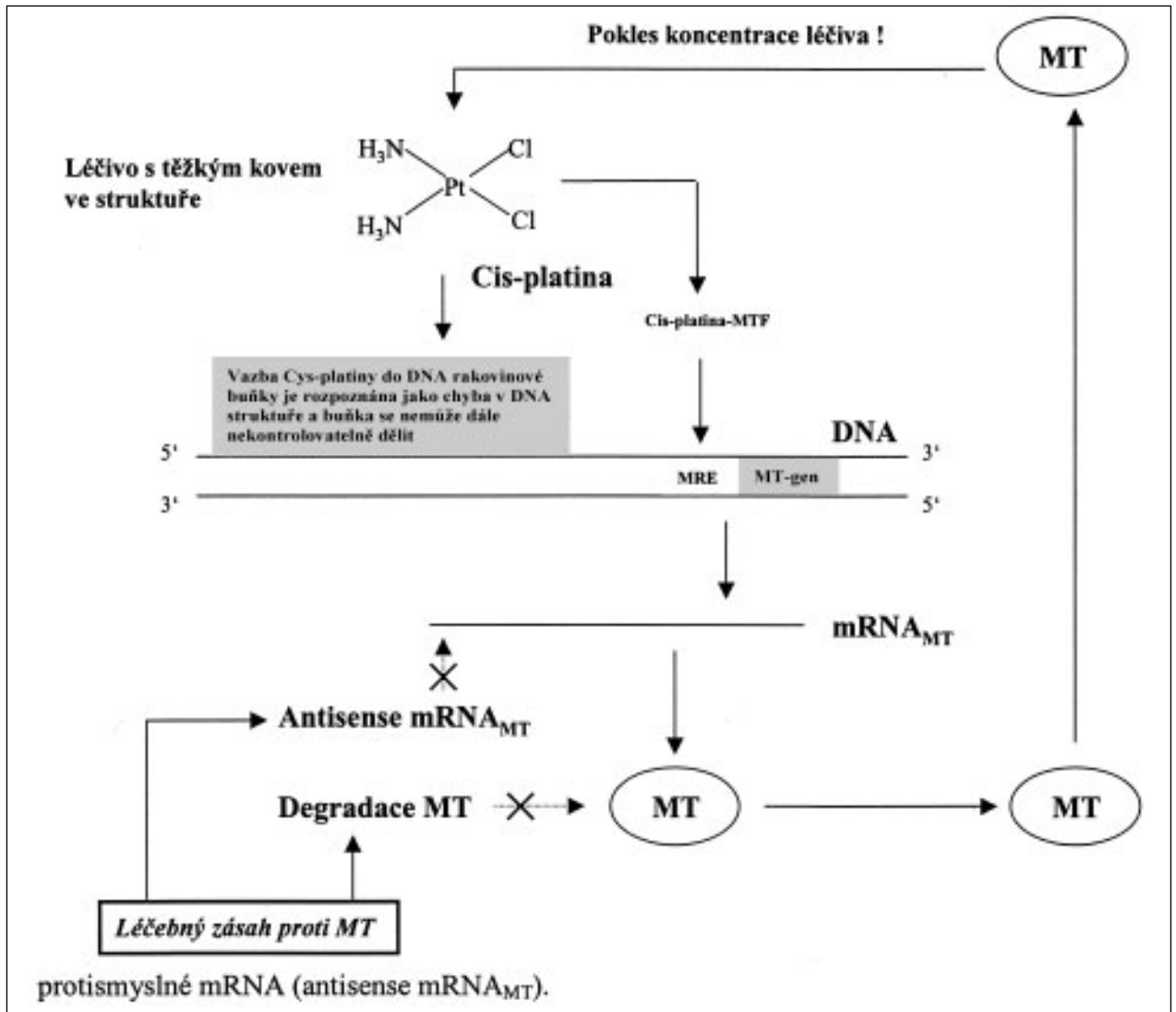
Stanovení MT

Ke stanovení MT je využíváno široké spektrum metod chemické analýzy (12). Tyto metody pro studium MT lze rozdě-

Obr. 4. Schéma pro kvalitativní a kvantitativní analýzu MT aplikovatelnou pro diagnostiku nádorů.



Obr. 5. Pravděpodobný vznik rezistence nádorových buněk k podávanému léčivu – cisplatině. Protinádorový efekt je dán blokováním replikace DNA za vzniku aduktu DNA-cisplatinu. Cisplatinu pravděpodobně indukují MTF-1, který vazbou na MRE spouští expresi MT genu. Syntetizovaný MT vyvazuje podávanou cisplatinu a jeho terapeutická koncentrace výrazně klesá. Léčebný zásah využívá genové terapie zahrnující přímou degradaci MT či vytvoření protismyslné mRNA (antisense mRNA_{MT}).



lit do několika skupin, jak je ukázáno na obrázku 4. Nejčastěji se pro stanovení MT využívá elektromigračních metod: gelové a kapilární elektroforézy a dále pak chromatografických metod. Elektrochemické metody jako je voltametrie zapojená v diferenčním pulzním módu (DPV) nebo derivační chronopotenciometrie s konstantním proudem (CPSA) (13) umožňují studium vazby kovů do struktur MT (14). Pomocí CPSA v kombinaci s technikou adsorptivního přenosu (AdTS) lze stanovovat koncentrace MT na úrovni femtomolů ve velmi malých objemech (jednotky μ l) vzorku (15-17) viz tab. 1. Imunochemické metody (RIA a ELISA metody) jsou přesné a citlivé avšak nevýhodou je obtížná příprava protilátek. Detekční limit stanovení koncentrace MT těmito metodami je srovnatelný s CPSA technikou. V klinické praxi se celková koncentrace MT detekuje nejčastěji imunohistochemicky s použitím monoklonální myši protilátky E9 (18).

Metalthioneinový marker – interakce s léčivem

Základní molekulární charakteristiku o vztahu metalothioneinu k rakovině jsme nedávno publikovali v souhrnné práci (19). Zvýšené množství metalothioneinu v nádorových buňkách pravděpodobně souvisí s buněčnou proliferací. Toto zjištění

vede vědce k výzkumu role lidských MT v nádorech. Studuje se zapojení MT do procesu karcinogeneze a spontánní mutagenese (20-22). V novějších výzkumech se posuzuje vztah nadměrné exprese MT a koncentrace protinádorových léčiv obsahujících ve své molekule kov (23, 24). Působení protinádorového léčiva je v organismu velmi komplikované (Obr. 5). V okamžiku, kdy je organismu podána cisplatinu dochází k interakci léčiva a DNA pacienta. Protinádorový efekt cisplatinu je dán jeho vazbou do DNA, čímž dochází k zabránění replikace DNA. Vzniklý adukt DNA-cisplatinu je rozpoznáván reparačními mechanismy buňky, které se tuto chybu snaží opravit. Výsledkem je pak opravená DNA. Naproti tomu podávaná cisplatinu může pravděpodobně stimulovat vazbu MTF-1 na MRE, čímž se spustí transkripce MT genu a dochází k rychlému nárůstu MT koncentrace v buňkách. Exprimovaný MT začne okamžitě vyvazovat cisplatinu přítomnou v buňkách. Výsledkem je prudký pokles koncentrace cisplatinu a její množství se stane biologicky velmi málo účinné. Kombinace aktivní reparace DNA a zvýšené exprese MT vede k selhání klasické terapie (Obr. 5). Terapeutické řešení je při současných technologiích obtížné. Lze navrhnout strategii založenou na genové terapii (Obr. 5) (25, 26). K dispozici jsou

pravděpodobně tři cesty léčebného zásahu. Jednou z cest je blokování syntézy MT s využitím antisense RNA (protismylné RNA) (25). Tato molekula vytvoří s mRNAMT komplex, který je z organismu velmi rychle odbouráván. Výsledkem je, že nedojde ke zvýšení koncentrace MT a cisplatinu může intenzivněji působit na nádorové buňky. Tento způsob byl již experimentálně ověřován (25). Podobná strategie je nezbytná pro vyřazení reparačních mechanismů buňky. Další možností je pokusit se vzniklý protein degradovat specifickou proteázou nebo se pokusit jej vyvazovat dalším externě podávaným kovem (25) (Obr. 5).

Spojitosť nadměrné exprese s nádorovým onemocněním – metallothionein jako prognostický marker

V posledních letech je studována zvýšená exprese MT (overexpres) u různých nádorů. Jedná se o expresi dvou isoform MT (konkrétně MT-1a a MT-2a), které se detekují nejčastěji imunohistochemicky E9 protilátkou. Zvýšená exprese těchto MT isoform je převážně spojena s maligními nádory a je studována jako nový prognostický marker v progresi onemocnění, přežití pacientů, korelaci s histologickým typem nádoru a nádorovým gradingem (27-30). Zvýšená exprese MT je iniciována s maligními nádory a typy nádorů s vyšším gradingem u karcinomu prsu (27, 31), u kožních karcinomů (32), hepatocelulárního karcinomu (33), kožních melanomů (34), cervikálních karcinomů (35), akutní lymfoblastické leukémie (36), karcinomu pankreatu (37) a je významně spojena s progresí a horší prognózou nádorového onemocnění. Naproti tomu bylo zjištěno, že zvýšená exprese MT souvisí s typy nádorů s nižším gradingem u karcinomu tlustého střeva (38), karcinomu močového měchýře (39) a fibroblastických kožních nádorů (40). Novější studie potvrdily korelaci mezi nadměrnou expresí MT a gradingem u karcinomu vaječníku (41) a karcinomu plic (23). U pacientů s primárním kožním melanomem byla Weinlichem statisticky potvrzena spojitosť overexpres MT s progresí onemocnění a úmrtí pacientů na metastázy (34). Weinlich tuto studii prováděl u 520 pacientů s primárním kož-

ním melanomem po dobu 5ti let. Zvýšená MT-exprese byla detekována u 156 pacientů z 520 (30 % z 520). Pacienti s overexpresí byli označeni jako MT-positivní. Z vybraného souboru 30 MT-positivních pacientů se zhoršenou progresí onemocnění spojenou s metastázami jich v průběhu studie 24 zemřelo. Naopak u 364 pacientů, kteří patřili do MT-negativní skupiny bez overexpres MT (70 % z 520), bylo u vybrané skupiny 30 pacientů se zhoršenou progresí onemocnění a metastázami pozorováno 6 případů s letálním koncem. Z těchto výsledků vyplývá, že zvýšená exprese MT by mohla být novým prognostickým markerem v progresi onemocnění a přežití pacientů u toho typu nádoru.

Závěr

V této práci jsme se snažili poukázat na významnost nadměrné exprese metallothioneinů v lidských nádorech. Zvýšená exprese MT je statisticky významná u maligních nádorů a nádorů s vyšším gradingem. Sledování nadměrné exprese MT v těchto nádorech by mohlo být novým prognostickým markerem progresie nádorového onemocnění. Vyšetření pomocí MT-markeru by tak mohlo identifikovat pacienty ohrožené progresí maligního onemocnění, a tak pomoci zlepšit kvalitu jejich života.

Poděkování. Práce na tomto příspěvku byla financována grantem: FRVŠ 164/2004, GAČR 525/04/P132, IGA MZLU 3/2004.

Zkratky

MT – metallothionein
SH – sulfhydrylová skupina
GIF – růstový inhibiční faktor
MTF-1 – metal transcription faktor
MRE – metal responsive element
GRE – glucocorticoid response element
STAT – signal transducer and activator of transcription
ARE – antioxidant response element
DPV – diferenční pulzní voltametrie
AdTS-CPSA – adsorptivní přenosová technika kombinovaná s chronopotentiometrickou rozpuštěcí analýzou za konstantního proudu
RIA – radioimunoanalýza
ELISA – enzymová imunoanalýza

Literatura

1. Kägi, J. H. R., Schäffer, A. Biochemistry of Metallothionein. Biochemistry, 27, 1988, s. 8509–8515.
2. Margoshes, M., Vallee, B. L. A. A cadmium protein from equine kidney cortex. J. Am. Chem. Soc., 79, 1957, s. 4813–4814.
3. Kägi, J. H. R., Kojima, Y. Biochemistry of Metallothionein. Experientia, Suppl., 52, 1987, s. 25–61.
4. Kojima, Y. Definitions and nomenclature of metallothioneins. Methods Enzymol., 205, 1991, s. 8–10.
5. Karin, M., Eddy, R. L., Haley, L. L., Byers, M. G., Shows, T. B. Human metallothionein genes are clustered on chromosome 16. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 81, 1984, s. 5494–5498.
6. Masters, B. A., Quaipe, C. J., Erickson, J. C., Kelley, E. J., Froelick, G. J., Zambrowicz, B. P., Brinster, R. L., Palmiter, R. D. Metallothionein III is expressed in neurons that sequester zinc in synaptic vesicles. J. Neurosci., 14, 1994, s. 5844–5857.
7. Vašák, M., Hasler, D. W. Metallothioneins: new functional and structural insights. Curr. Opin. Chem. Biol., 4, 2000, s. 177–183.
8. Kägi, J. H. R. Overview of metallothionein. Metallothionein Part B: metallothionein and related molecules. Methods Enzymol., 205, 1993, s. 613–626.
9. Palmiter, R. D. Regulation of metallothionein gene by heavy metals appears to be mediated by a zinc-sensitive inhibitor that interacts with a constitutively active transcription factor, MTF-1. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 91, 1994, s. 1219–1223.
10. Coyle, P., Philcox, J. C., Carey, L. C., Rofe, A. M. Metallothionein: The multipurpose protein. Cell. Mol. Life Sci., 59, 2002, s. 627–647.
11. Brady, F. The physiological function of metallothionein. Trends Biochem. Sci., 7, 1982, s. 143–145.
12. Dabrio, M., Rodriguez, A. R., Bordin, G., Bebianno, M. J., De Ley, M., Šestáková, I., Vašák, M., Nordberg, M. Recent developments in quantification methods for metallothionein. J. Inorg. Biochem., 88, 2002, s. 123–134.
13. Trnková, L., Kizek, R., Vacek, J. Catalytic signal of rabbit liver metallothionein on a mercury electrode: combination of derivative chronopotentiometry with adsorptive transfer stripping. Bioelectrochem., 56, 2002, s. 57–61.
14. Průša, R., Kizek, R., Vacek, J., Trnková, L., Zehnálek, J. Study of relationship between metallothionein and heavy metals by CPSCA method. Clin. Chem. (v tisku), 2004.
15. Kizek, R., Trnková, L., Paleček, E. Determination of metallothionein at the femtomole level by constant current stripping chronopotentiometry. Anal. Chem., 73, 2001, s. 4801–4807.
16. Kizek, R., Vacek, J., Trnková, L., Klejduš, B., Havel, L. Application of catalytic reactions on a mercury electrode for metallothionein electrochemical detection. Chem. Listy, 98, 2004, s. 160–167.
17. Strouhal, M., Kizek, R., Vacek, J., Trnková, L., Němec, M. Electrochemical study of heavy metals and metallothionein in yeast *Yarrowia lipolytica*. Bioelectrochem., 60, 2003, s. 29–36.
18. Jasani, B., Elmes, M. E. Immunohistochemical detection of metallothionein. Metallothionein Part B: Metallothionein and related molecules. Methods Enzymol., 205, 1991, s. 95–107.
19. Kizek, R., Vacek, J., Adam, V., Vojtěšek, B. Vztah metallothioneinu k rakovině a protinádorové léčbě. Klin. Biochem. Metab., 12, 2004, s. 72–78.
20. Goncharova, E. I., Rossman, T. G. A role for metallothionein and zinc in spontaneous mutagenesis. Cancer Res., 54, 1994, s. 5318–5323.
21. Coogan, T. P., Shiraishi, N., Waalkes, M. P. Apparent quiescence of metallothionein gene in rat ventral prostate-association with cadmium-induced prostate tumors in rats. Environ. Health Perspec., 102, 1994, s. 137–139.
22. Waalkes, M. P., Diwang, B. A., Weghorst, C. M., Bare, R. M., Ward, J. M., Rice, J. M. Anticarcinogenic effects of cadmium in B6C3F1 mouse liver and lung. Toxicol. Appl. Pharmacol., 110, 1991, s. 327–335.
23. Theocharis, S., Karkantaris, C., Philipides, T., Agapitos, E., Gika, A., Margeli, A., Kittas, C., Koutselinis, A. Expression of metallothionein in lung carcinoma: correlation with histological type and grade. Histopathology, 40, 2002, s. 143–151.
24. Kelly, S. L., Basu, A., Teicher, B. A., Hacker, M. P., Hamer, D. H., Lazo, J. S. Overexpression of metallothionein confers resistance to anticancer drugs. Science, 241, 1988, s. 1813–1815.
25. Ebadi, M., Iversen, P. L. Metallothionein in carcinogenesis and cancer chemotherapy. Gen. Pharmac., 25, 1994, s. 1297–1310.

26. Vandier, D., Calvez, V., Massade, L., Gouyette, A., Mickley, L., Fojo, T., Rixe, O. Transactivation of the metallothionein promoter in cisplatin-resistant cancer cells: a specific gene therapy strategy. *J. Natl. Cancer I.*, 8, 2000, s. 642-647.
27. Douglas-Jones, A. G., Schmid, K. W. S., Bier, B., Horgan, K., Lyons, K., Dallimore, N. D., Moneypenny, I. J., Jasani, B. Metallothionein expression in duct carcinoma in situ of the breast. *Hum. Pathol.*, 26, 1995, s. 217-222.
28. Kuo, T., Lo, S. K. Immunohistochemical metallothionein expression in thymoma: correlation with histological types and cellular origin. *Histopathology*, 30, 1997, s. 243-248.
29. Jasani, B., Schmid, K. W. S. Significance of metallothionein over-expression in human tumors. *Histopathology*, 31, 1997, s. 211-214.
30. Joseph, M. G., Banerjee, D., Kocha, W., Feld, R., Stitt, L. W., Cherian, M. G. metallothionein expression in patients with small cell carcinoma of the lung. *Cancer*, 92, 2001, s. 836-842.
31. Bier, B., Douglas-Jones, A. G., Totsh, M., al., e. Immunohistochemical demonstration of metallothionein in normal human breast tissue and benign and malignant lesions. *Breast Cancer Res. Treat.*, 30, 1994, s. 213-221.
32. Zelger, B., Hittmair, A., Schir, M., al., e. Metallothionein expression in nonmelanoma skin cancer. *Appl. Immunohistochem.*, 2, 1993, s. 254-260.
33. Huang, G. W., Yang, L. Y. Metallothionein expression in hepatocellular carcinoma. *World J. Gastroentero.*, 8, 2002, s. 650.
34. Weinlich, G., Bitterlich, W., Mayr, V., Fritsch, P. O., Zelger, B. Metallothionein-overexpression as a prognostic factor for progression and survival in melanoma. A prospective study on 520 patients. *Brith. J. of Dermatol.*, 149, 2003, s. 535-541.
35. Lim, K., Evans, A., Adams, M. Association of immunohistochemically detectable metallothionein (IDMT) expression with malignant transformation in cervical neoplasia. *J. Pathol.*, 178 (Suppl.), 1996, s. 48A.
36. Sauerbrey, A., Zintl, F., Volm, M. Expression of metallothionein in initial and relapsed childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Ann. Haematol.*, 69, 1994, s. 111-115.
37. Ohsio, G., Imamura, T., Okada, N., al., e. Immunohistochemical study of metallothionein in pancreatic carcinomas. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 122, 1996, s. 351-355.
38. Tuccari, G., Giuffre, G., Barresi, G. Immunohistochemical expression of metallothioneins in colorectal adenocarcinoma. *Virchows Arch.*, 427, 1996, s. 547-548.
39. Bahnson, R., Banner, B. F., Ernstoff, M. S., Lazo, J. S., Cherian, M. G., Banerjee, D., Chin, J. L. Immunohistochemical localization of metallothionein in transitional cell-carcinoma of the bladder. *J. Urology*, 146, 1991, s. 1518-1520.
40. Zelger, B. W. H., Sidoroff, A., Stanzl, U., Fritsch, P. O., Ofner, D., Zelger, B., Jasani, B., Schmid, K. W. S. Deep penetrating dermatofibroma versus dermatofibrosarcoma protruberans - a clinicopathologic comparison. *Am. J. Surg. Pathol.*, 18, 1994, s. 677-686.
41. McCluggage, W. G., Strand, K., Abdulkadir, A. Immunohistochemical localization of metallothionein in benign and malignant epithelial ovarian tumors. *Int. J. Gynecol. Cancer*, 12, 2002, s. 62-65.