

METALLOTHIONEINLER

Zümrüt Uysal*

Metallothioneinler (MT) düşük moleküler ağırlıklı, yüksek cysteine içeriği olan, vücutta başlıca çinko ve bakır dengesinde görev alan, ayrıca kadmiyum, civa, gümüş, altın, gibi ağır metal iyonlarını bağlama ve detoksifikasyonunu sağlayan, hücre içi elamanlarını serbest hidroksil radikallerinden koruyan bir grup proteinlerdir (6,14,15,16,20,21).

MT'ler son 10 yıl içinde üzerinde en çok araştırma yapılan metalloproteinlerdir. 1957 yılında Margoshes ve Valee MT'leri at bôbreğinde kadmiyum ve çinko bağlayan bir protein olduğunu ilk defa gösterdiler. 1964 yılında Piscator ise kadmiyumla karşılaşmış tavşanların karaciğerinde MT'nin aldığı ve böylece MT'nin ağır metal detoksifikasyonun da rolünü belirlemiştir. 1966 da Pulido ve arkadaşları MT'leri insan karaciğerinde izole ettiler. 1979 yılında Karin ve Herchman kültüre hücrelerde MT sentezinin sadece ağır metallerle değil, glukokortikoid hormonlarla da arttığını gösterdiler. 1984 yılında Karin ve arkadaşları insan MT gen ailesinin 16 kromozomda olduğunu belirlediler (14,16). 1989 yılında Cousins insan doku örnekleri ve vücut sıvılarında MT düzeyini ELISA yöntemi ile ölçmeyi başardı ve enfeksiyonla ilişkili indüksiyonu belirledi (9).

Metallotioneinlerin özellikleri :

61 amino asitli, yüksek metal bağlama yeteneği olan, düşük molekül ağırlıklı (6-7 bin dalton), yüksek cysteine içerikli (% 25-30 cysteine) bir grup proteinlerdir (6,14,21).

Aminoasit bileşimi bakımından farklılık gösteren elektroforetik özellikleri ayrılan MT I ve MT II olmak üzere iki izometallothionein vardır. MT'lerin esas işlevi çinko ve bakır metabolizmasının düzen-

* A.Ü. Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Hematoloji - Onkoloji Bilim Dalı Araştırma Görevlisi.

lenmesidir. Bu iyonların karaciğerde depolanmasına yardımcı olurlar. Hücre içinde başlıca çinko bağliyan protein olan MT, çinkonun olası hücre içi rezervuarıdır. Çoğalma, tamir, tanskripsiyon, protein sentezi, enerji metabolizması gibi çinkoya gereksinim gösteren enzim sistemlerine çinko sağlamak gibi önemli işlevi yerine getirir (15). Hücre çoğalması ve hücre büyümesi sırasında çinkoya ihtiyaç arttığından MT sentezi de artar (15,19).

İnsan MT gen ailesi 12 geni içerir ve 16. kromozomdadır. (14 12) ve dokuya spesifik ekspresyon örneği ile farklı dokularda iz element metabolizmasını dokuya özgül olarak düzenlerler (3,6,10,14).

MT gen ekspresyonunda defeklerin, insanlarda çeşitli iz element metabolizma hastalıklarına neden olduğunu düşündürür çalışmalar vardır. Menkes Kinky Hair sendromu, Wilson hastalığı ve acrodermatitis enteropatica gibi (14). MT genleri aynı zamanda farelerde cadmiumun testiküler nekrosisi ve sıçanlarda cadmiumla oluşturulan hipertansiyon gibi, cadmiumun toksik etkilerine predisposisyonla da ilgili olduğu düşünülmektedir (14).

Menkes Kinky Hair sendromunda defekt X kromozomunda olmasına rağmen, X kromozomunun trans acting ürünü olan ve MT genlerinin ekspresyonunu etkileyen regülatör bir gen içerdiği düşünülmektedir. Wilson hastalığı ve acrodermatitis enteropatica otozomal kalıtım gösteren hastalıklar olduğu için MT genleri ile ilgili olma olasılıkları fazladır. Bu hastalıklarda aile çalışmaları ve mutant fibroblastla MT gen ekspresyonunun analizi, MT gen ailesinin defekte neden olabilecek tutulumunu düşündürmektedir (14).

MT sentezinin bakterial lipopolisakkarit ve ultraviyole irradyasyonu ile artması, MT'nin akut faz cevabında da rolü olduğunu düşündürür. Ayrıca interferon ve interleukin 1 ile de MT gen ekspresyonunun artması MT'nin akut faz cevabındaki rolünü destekler (6,10).

Metallotioneinler çeşitli canlı türlerinden izole edilmişlerdir. Bu konudaki bilgilerin çoğu karaciğer, böbrek, barsak MT'leri ile geliştirilmiştir. Her ne kadar önceleri kadmiyum zehirlenmesine maruz kalanların karaciğerinde MT artışı dikkati çekmişse de, daha sonra yapılan çalışmalar, insan karaciğerinden izole edilen bu maddenin başlıca çinko içeren bir protein olduğunu ortaya koymuştur (1,2,6).

I — Metallothioneinlerin sentezi :

Metallothioneinlerin biosentezi kompleks işlemlerle kontrol edilir. Karaciğer MT yapımını artıran fizyolojik faktörler ve deneysel durumları bir liste şeklinde şu şekilde toparlayabiliriz :

Fizyolojik Durumlar : Gelişme, diyetteki çinko, stess, açlık
Deneysel çalışmalar : Adjuvan artrit, alkile ediciler, cadmium karbon-tetraklorür, bakır, diyabet, endotoksin, epinefrin, glukokortikoidler, glukagon, interlokin 1, isopropanol, retinoik asit terpentine, çinko.

A) Metallerle MT Regülasyonu :

Piscator, tavşanlara kadmiyum verildiğinde hepatik MT içeriğinde artışı göstererek, MT'nin indüklenebilir bir protein olduğu görüşünü belirtmiştir. Daha sonra MT artışının hayvanları bu toksik ağır metalden korumaya yönelik olduğunu işaret etmiştir (6,16).

Shaikh, sıçanlara cadmiyum verilmesiyle işaretli aminoasitlerin hepatik metallothioneine katılımında artmaya neden olduğunu göstermiştir. Bu, indüksiyonla yeni protein sentezi olduğu telkin etmektedir (6). Squibb ve Causins ile Richards ve Caousins Cd ve Zn'nin MT'ne işaretli aminoasitlerin katılımını artırdığını göstermişlerdir. Bu çalışmalarda Aktinomycin-D (mRNA sentezini inhibe eder) önceden verilmesinin metallothionein sentezini ve çinkonun MT'ne alınımını önlediği görülmüştür (6,21).

Metallerle MT yapımının artması ilişkisini gösteren çalışma da Polonya'dan bildirilmiştir. Polonya'nın endüstrileşmiş bir bölgesinde, 29 ve 11 otopsi örneğinde yapılan iki ayrı çalışmada karaciğerde cadmium, çinko bakır ve metallothionein düzeyleri ölçülmüştür. Önemli bir çevre kirleticisi olan cadmiumun karaciğer ve böbrekte birikerek zararlı etkilere neden olduğu, bu organlarda başlıca MT'ne bağlandığı, MT'nin başlıca çinko proteini olduğu, MT düzeylerinin çinko ile korelasyon gösterdiği, çinko ne kadar fazla ise MT de o derecede arttığı, artan MT'nde toksik metali bağlama ve detoksifikasyonda önemli olduğu belirtilmektedir (1,2).

Squibb ve arkadaşları, çinkonun paranteral verilmesinden 5-7 saat sonra MT düzeyinin maksimuma ulaştığını, yeni yapıdan bu proteine çinkonun katıldığını hem Aktinomisin-D hem kardiocepinin bu

katılımı önlediği, çinkonun MT yapımını arttırdığını göstermiştir (6). Ayrıca çinko verildiğinde MT mRNA düzeyinin de arttığı görülmüştür (6).

Bremler ve arkadaşları da, eksik ve yeterli çinko ile beslenen iki grup sıçanda, bakır enjeksiyonunun karaciğer ve böbrekte MT indüksiyonuna neden olduğunu gösterdiler. Ayrıca hayvanın çinko durumunun, bakırla indüklenmiş MT yıkım hızında etkili olduğunu, fakat bakırın MT birikiminde fazla etkili olmadığını gösterdiler (5). Hayvanın bakır durumu MT düzeyini fazla etkilememekte, bakır eksikliğinde MT sentezi fazla bozulmamaktadır (5).

B) Metallothionein Sentezinin Diyetle Kontrolü :

Diyetteki çinko ve bakır yeteri kadar yüksek olduğunda özellikle karaciğer ve bağırsakta MT yapımı artar. Bu indüksiyonu metallerin her iki dokuda birikim ve yeniden dağılımları izler. Bu fizyolojik cevap iki yolla incelenmiştir. Diyetteki çinko içeriğinde ortaya çıkan akut değişiklikler, hepatik MT'ye bağlı çinkoyu değiştirir. Sıçanlarda yapılan çalışmalarla bu konuda şu şekilde yorum yapılmaktadır : 1) MT toksik olabilecek fazla çinkoyu bağlamak için hızlı bir şekilde sentezlenmelidir, 2) MT'ye çinko bağlanması ile çinko hücre içi havuzuna alınacak (yani bir ara ligant görevi yapacaktır), 3) MT fazla çinkoyu bağlamak için sentezlenmekte ve çinkonun hücre içi havuzuna alınmasını sağlamaktadır (6).

Çinkodan fakir diyetle beslenen sıçanlara gavajla yüksek çinko içeren bir diyet verildiğinde önce intestinal MT mRNA artışı sonra işaretli çinkonun karaciğerde yoğunlaştığı ve karaciğer mRNA'sı artışı ile birlikte olduğu gösterilmiştir. Diyetle az çinko alındığında MT'ye bağlı çinko fraksiyonu artmakta bu da MT'nin çinkoyu koruma görevi de olduğunu yani aynı zamanda çinkoyu depo ettiğini göstermektedir (6,18).

Çinko ince bağırsaktan hem emilmekte hem atılmaktadır. İntestinal MT mRNA'sı en fazla, çinkonun yüksek, bakırın düşük olduğu kombinasyonda olmakta, çinko ve bakır absorpsiyonda yarışmaktadır. Çinko eksikliğinde emilim daha fazla olmakta fakat farelerde sıçanlardakinin aksine intestinal MT düzeyi çinko absorpsiyonunu etkilememektedir (3,6,8). Diyetteki çinko arttıkça karaciğer hücrelerin-

de MT mRNA düzeyi de artar. Bakırın bu konuda etkisi önemsizdir. Böbrekte de durum aynıdır. Diyet bakırının artması böbrek MT mRNA sında önemli artış yaptırmaz, fakat çinko artıkça önemli olarak MT mRNA sı artışı gözlenir (3). Böbrek çinko ve bakır metabolizmasında düzenleyici bir rol oynamaktadır. Yeterli ve fazla Zn vermekle yapılan iki ayrı çalışmada sıçan böbreğinde MT yapımının artması MT'nin ağır metallerin renal ve üriner traktus hasarını önlemede de etkili olduğunu düşündürmektedir (Artan MT ağır metali bağliyerek) (3).

Diyetteki bakır ve çinko cevapta MT gen ifadesinin organ spesifik olduğu, özellikle böbreğin, daha az olarak barsağın, diyetdeki bakır ve çinkoya duyarlı başlıca organlar olduğu söylenebilir. Intestinal MT indüksiyonu (çinko ile olan) bakırla engellenir. Fakat böbrekte bu iki element birbirinden bağımsız olarak MT indüksiyonu yaparlar (3,6).

C) Metallothioneinlerin Hormonal Regülasyonu :

Oh ve arkadaşları sıçan karaciğer ve böbreğinde soğuk, sıcak, yanık ve ağır ekzersiz gibi değişik streslerle MT'nin arttığını gösterdiler. Sas ve Bremner çinko destekli bir diyetle beslenen bir piliçte CCI 4 inhalasyonundan sonra benzer gözlemlere elde etmişlerdir. Aynı deneyde, çinkodan fakir diyetle MT artışı gözlenmemiştir. Ayrıca glukagon enjeksiyonları ile karaciğerde DNA sentezi indüksiyonunun MT sentezi ile korelasyon gösterdiği, MT'nin DNA sentezi için gerekli enzimlere çinko sağlamada görevli olduğu belirtilmektedir (6).

Failla ve Causins, izole sıçan karaciğer parankim hücre kültüründe glukokortikoidlerin çinko alımını artırdığını ve MT indüksiyonu oluşturduğunu göstermişlerdir. Stress ve açlığın MT indüksiyonuna neden olmasını da hücresele düzeyde hormonal kontrolla olduğuna bağlamaktadırlar (6,14,16).

Deksametazon ile MT sentezi artması karaciğerde MT ne bağlanan çinkoyu artıracak, bu da serum çinko konsantrasyonun düşme ile kendini gösterecektir. Glukagon ve katekol aminler deksametazonla sinerjik etki göstererek MT'ni artırırılar (6). Başka bir çalışmada da katekolaminlerin KC MT düzeyini artırmadaki etkisinin henüz açıklık kazanmadığı belirtilmektedir (11).

D) Stres Faktörleri ve Mediatörlerin rolü : Akut enfeksiyonların ve endotoksinlerin de bakır ve çinko metabolizmasında etkileri vardır. Endotoksinler ve interlökin 1 karaciğerde MT mRNA sını ve bağlı çinkoyu artırır ve hipozinkemiye neden olurlar. İnterlökin 1 katabolik süreci hızlandırmakta kasta karaciğere amino asit akımını artırmaktadır. Kasta fazla bulunan çinkonun karaciğer ve diğer dokulara geçerek MT sentezini uyardığı düşünülür. Bu sırada oluşan geçici hipozinemi karaciğer de MT ve MT-Zn artışına geçici cevap olabilir (6).

Karaciğer metallothioneini fetal büyüme sırasında dramatik bir artış gösterir. Bremner ve arkadaşları karaciğerdeki bakır ve çinkonun çoğunun metallothioneine bağlı olduğunu göstermişlerdir (6).

Kern ve arkadaşları gebeliğin ilk 14 gününde fetal karaciğerde MT'nin var olduğunu ve düzeyinin terme doğru giderek arttığını ve emme sırasında yüksek kalıp, sonra düştüğünü bu durumda anneden fetusa olan çinko nakli ile korelasyon gösterdiğini buldular (6,21). Kırküçü bebeğin postmortem incelenmesinde yenidoğanda hepatik MT nin en yüksek düzeyde olduğu, 4.4 ay civarında düşme gösterdiği, her yaşta çinko düzeyi ile MT düzeyi arasında pozitif korelasyon olduğu belirlendi. MT düzeyleri ile cystathionase aktivitesi arasında da negatif korelasyon saptandı (21). Cystathionase aktivitesi yenidoğanda olmadığı için bebek, cysteine yönünden anneye bağımlıdır. (Metallothioneinin % 30'su cysteine) Prematürelere özellikle ilk haftalarda yeterli sistein almak zorundadırlar. Özellikle parenteral beslenen prematürelere cysteine (insoluble olduğu için intravenöz sıvılara konulamaz.) endojen cysteine sentezine ihtiyaç gösterirler. Eğer parenteral sıvılar yüksek doz iz element içerirlerse, yeterli sisteini olmayan bebek metallothioneini sentezleyemeyeceği için bu metallerin toksik etkisine maruz kalabilir denilmektedir (21).

Metallerin MT'ne bağlanması sistein bağları ile olur. Her metalin bağlanma oranı farklıdır. Bakır çinkodan daha sıkı bağlanır. Ortamda bakırın fazla oluşu, çinkonun ayrılmasına neden olabilmektedir (6).

Metallothioneinlerin Yıkımı

MT'lerin yıkımı karaciğer lizozomlarında hidrolize edilerek, en fazla 24 saat içinde olur ve MT-çinko yıkıldıktan sonra metal ve protein kendi gruplarına dönerler (6).

Metallothionein indüksiyonu ve konakçı savunması arasındaki korelasyon sıçanlarda adjuvan artrit ile belirlenmiştir. Simkin, oral çinko tedavisinin romatoid artritte etkin olduğuna ait klinik deliller sunmuştur. Buna benzer şekilde çinko tedavisi, sıçanlardaki adjuvan artritte enflamatuar belirtileri azaltmıştır. Çinkonun ve retinoik asitin (13 cisretinoik asit) kombine edildiği bu çalışmada enflamasyon tedavisinde additif etki olduğu gözlenmiştir (6). Ayrıca makrofajlardaki MT sentezinin, indükleyici metallere ve glukokortikoidlere cevap verdiği, bunun da endotoksinin hücrelere toksisitesinde azalmaya yol açtığı bildirilmektedir.

Endotoksin verilen hayvanlarda, intraperitoneal uygulanan çinko, karaciğer hasarı ve mortaliteyi azaltmaktadır. Bu etki metallothioneinin indüksiyonu yoluyla olmakta sülfidriden zengin yapısı, hepatotoksinleri detoksifiye edici özelliğini sağlamaktadır (6). Metaller yoğun şekilde verildiğinde, safra kesesinden metalin atılımı organizmanın çinko durumuna bağlı olmaktadır. Bilier atılım MT'ne bağlanmış fraksiyonda olduğu için diyetdeki çinko düzeyi bu nedenle metal toksisitesinde önemli rol oynamaktadır (12).

MT'nin antikanser ilaçlara rezistansta da önemli olabilmektedir. Cisdiaminodichloroplatinuma direnç geliştiren tümör hücrelerinde chlorambucil ve melphalan gibi sülfidridle reaksiyona giren alkile edici ajanlara da çapraz direnç gösterdiği görülmüştür. Neoplastik hücreler de Ha-Ras onkogeninin mevcudiyetine bağlı olarak MT'nin yapımını artırır. Ayrıca kanser tedavisinde kullanılan interferon ve steroid gibi ilaçlar da MT'ni artırarak geçici ilaç rezistansına neden olabilirler (4).

Kalıtsal bir bakır metabolizma hastalığı olan Wilson hastalığında da, bakır beyinde karaciğer ve korneada toplanmıştır, karaciğerde MT, bakır ve çinko düzeyleri ölçülmüştür. İmmünohistokimyasal metodla, MT düzeylerin tayin edildiği çalışmalarda bakırın metallothioneine bağlanmış halde bulunduğu sitoplazmik kısımda, doku hasarının az olduğunun görüldüğü bildirilmektedir (17). Bu çalışmada MT'nin Wilson hastalığında bakırla satüre başlıca hepatik bakır bağlayıcı protein olduğu, karaciğer hasarının ise bakırın, MT bağlama bölgeleri dolduktan sonra kalan iyonik kısmına bağlı olduğu bildirilmektedir.

(17). Wilson hastalığında, gene 100 biopsi materyalinin incelendiği bir çalışmada, karaciğer hasarı montoksik form olan bakır-metallothioneine değil de, serbest bakıra bağlı olduğu, eğer bu kompleks yıkılır veya bakır düzeyi metallothionein bağlama kapasitesini aşarsa sitotoksik bakırın, hepatosit harabiyetine neden olacağı bildirilmektedir (7).

Düşük molekül ağırlıklı bir protein olan metallothioneine, vücutta başlıca çinko ve bakır metabolizmasının düzenlenmesinde görev almıştır. Özellikle karaciğerde çinko deposu olarak görev yapmaktadır, organizmada çinkonun gerekli olduğu enzim sistemlerine çinko sağlamaktadır. Ayrıca vücut için toksik olabilecek metalleri bağlayarak detoksifikasyon işlemindeki önemli görevi nedeniyle de son yıllarda üzerinde yoğun araştırmalar yapılmaktadır.

ÖZET

Metallothionein, organizmada esansiel ve nonesansiyel metalleri bağlayarak metal depolayıcı ve toksik metalleri detoksifiye edici protein işlevi yapar. Dokularda kısmen farklı özellikler göstermekle beraber karaciğerde çinko ile yapımı artan, çinkoyu depolayan ve gerektiğinde çinko içeren enzimlere çinko sağlayan metal proteindir. Ayrıca çeşitli metaller, hormonlar ve mediatörlerle de sentezi artabilmektedir. Bugün için Wilson hastalığında, çevre kirletici cadmium gibi metallerin toksisitesinden korunmada yaşamın ilk yılındaki beslenme ve büyümede önemi olduğu bildirilmektedir.

SUMMARY

Metallothioneins

Mellothionein, can bind both essantial and nonessantial metals and thus play an important role as a metal storage protein and also in the detoxification of toxic metals. Its major role is in regulation of trace metal metabolism, especially zinc, acting in the storage of these ions in the liver. Defects in the MT gene expression have been suggested to be the cause for several disorders of trace metal metabolism in man.

KAYNAKLAR

1. Bem EM Piotrowski JK Koziara H : Cadmium and metallothionein levels in the liver of exposed to environmental cadmium in Upper Silasia, Poland. *Txi. Lettes* 45 : 35, 1989.
2. Bem EM ve ark. : Cadmium, zinc, copper and metallothionein levels in human liver, *Int Arch Occup Environ Health* 60 : 413, 1988.
3. Blalock TL Dunn MA Cousins RJ : Metallothionein gene expression in rats : Tissue specific regulation by dietary copper and zinc. *J. Nutr* 118 : 222, 1988.
4. Celleys, Basu Teicher BA : Overexpression of metallothionein confers resistance to anticancer drugs. *Science* 241, 1988.
5. Chung K ve ar. : Role of copper in the regulation and accumulation of superoxide dismutase and metallothionein in rat liver. *J. Nutr.* 118 : 859, 1988.
6. Cousins RJ : Absorption, transport, and hepatic metabolism of copper and zinc : Special reference to metallothionein and ceruloplasmin. *Physiological reviews.* 65 : 238 1985.
7. Elmes EM Jasani B : Metallothionein and copper in liver disease *Lancet.* October 10, 866, 1987.
8. Flanagan Pr Haist J Valberg LS : Zinc absorption, intraluminal zinc and intestinal metallothionein levels in zinc - deficient and zinc - replete rodents *J. Nutr.* 113 : 962, 1983.
9. Griger A ve ark. : Enzyme - linked immunosorbent assay for human metallothionein : Correlation of induction with infection *J. Lab Clin Med.* 113 : 221, 1989.
10. Heguy A ve ark : Structure and tissue-specific expression of the human metallothionein I B gene. *Mol and Cel Bio* June 2149, 1986.
11. Hidalgo J ve ark. : Are catecholamines positive regulators of metallothionein synthesis during stress in the rat? *Horm. Metabol. Res.* 20 : 530, 1988.
12. Jaw S Jeffery EH : The effect of dietary zinc status on biliary metal excretion of rats. *J. Nutr* 118 : 1385, 1988.
13. Karin M ve ark. : Activation of a heterologous promoter in response to dexamethasone and cadmium by metallothionein gene 5'-Flanking DNA *Cell* 36 : 371, 1984.
14. Karin M ve ark. : Human metallothionein genes are clustered on chromosome 16 *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 81 : 5494 - 5498 1984.
15. Karin M Imbra RJ : Metallothionein gene expression is regulated by serum factors and activators of protein kinase C *Mol and Cell. Bio.* 1358, 1987.

16. Karin M Richards RI : The human metallothionein gene family structure and expression. *Environmental Health Perspectives* 54 : 111, 1984.
17. Nartey NO Frei JV Cherian MG : Hepatic copper and metallothionein distribution in Wilson disease (Hepatocellüler degeneration) *Lab. Inves.* 57 : 397, 1987.
18. Olafson RW : Intestinal Metallothionein : Effect of parenteral and enteral zinc exposure on tissue levels of mice on controlled zinc diets *J. Nutr.* 113 : 268, 1983.
19. Olafson RW McCubbin WD Kay CM : Primary-and secondary-structural analysis of a unique prokaryotic metallothionein from a synechococcus sp. *Cyanobacterium Biochem J.* 251, 691, 1988.
20. Sato M ve ark : Metallothionein-I accumulation in the rat lung following a single paraguat administration. *Toxicology letters*, 45 : 41, 1988.
21. Zlotkin SH Cherian MG : Hepatic metallothionein as a source of zinc and cysteine during the first year of life *Pediatr. Res.* 24 : 326, 1988.