

Agnieszka Mierek-Adamska<sup>1</sup>, Wioleta Tylman-Mojżeszek<sup>1</sup>,  
Zuzanna Znajewska<sup>1</sup>, Grażyna B. Dąbrowska<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Zakład Genetyki, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

Wpłynęło w sierpniu 2016 r.  
Zaakceptowano w listopadzie 2016 r.

1. Wstęp. 2. Historia odkryć metalotionein u bakterii. 3. Budowa i sposób wiązania jonów metali ciężkich przez bakteryjne MT. 4. Funkcje metalotionein bakteryjnych. 5. Regulacja ekspresji bakteryjnych metalotionein. 6. Obecność metalotionein u bakterii. 7. Podsumowanie

### Bacterial metallothioneins

**Abstract:** Heavy metals are found in all living organisms where, as indispensable microelements (e.g. zinc, iron, copper), are involved in endless metabolic processes. However, living organisms are also at a risk of exposure to highly toxic metals, including cadmium or lead, which do not play any physiological role. Among multiple mechanisms associated with the maintenance of micronutrient homeostasis and detoxification of unwanted metals, there is a family of low-molecular-weight, cysteine-rich proteins, able to chelate multiple metal ions i.e. the metallothioneins (MTs). They are widely distributed among *Eucaryota*, however, they have also been found in some limited *Procarvota*, including cyanobacteria, pseudomonads and mycobacteria. These bacterial MTs differ in terms of primary structure, the number and type of metal ions they bind, as well as with regard to their physiological functions. The expression of bacterial MTs is regulated by metals via metalosensors. MTs from cyanobacteria seem to be involved in zinc homeostasis, while in *Pseudomonas* they are linked to cadmium detoxification. In *Mycobacterium*, MTs bind copper ions and may play a pivotal role in the virulence of these bacteria. The presence of MTs in other groups of bacteria remains questionable. Problems with identification of new bacterial MTs are mainly associated with low level of homology between MT amino acid sequences of different bacterial groups. Further research is needed to evaluate the physiological functions of metallothioneins in *Procarvota*.

1. Introduction. 2. The history of discoveries of bacterial metallothioneins. 3. Structure and metal-binding properties of bacterial MTs. 4. Functions of bacterial metallothioneins. 5. Regulation of metallothionein gene expression. 6. Presence of metallothioneins in bacteria. 7. Summary

**Słowa kluczowe:** cyanobakterie, metale ciężkie, metalotioneiny, mykobakterie, *Pseudomonas*

**Key words:** cyanobacteria, heavy metals, metallothioneins, mycobacteria, *Pseudomonas*

## 1. Wstęp

Metale ciężkie, pierwiastki o gęstości większej niż 5 g/cm<sup>3</sup>, powszechnie występują w komórkach wszystkich żywych organizmów i były jednym z istotnych czynników determinujących rozwój życia na Ziemi [9]. Wśród nich cynk, miedź, żelazo, nikiel czy kobalt są mikroelementami niezbędnymi do prawidłowego przebiegu wszystkich procesów życiowych. Metale te są niezbędnymi składnikami licznych metaloprotein i tym samym pełnią istotne funkcje strukturalne, katalityczne oraz związane z wytwarzaniem energii w procesach transportu elektronów. Biorą bezpośredni udział w najważniejszych procesach biochemicznych jak fotosynteza, oddychanie wewnątrzkomórkowe, replikacja DNA czy ekspresja genów [24, 45]. Inne metale, takie jak: kadm, rtęć czy ołów według współczesnej wiedzy nie pełnią żadnych fizjologicznych funkcji, są silnie toksyczne nawet w mikromolowych stężeniach [21]. W tym kontekście niezwykle interesujący jest fakt, iż u okrzemki morskiej *Thalassiosira weissflogii* kofaktorem anhidrazy węglanowej, enzymu biorącego udział

w procesie fotosyntezy, jest nie cynk, a kadm [32]. Jak dotąd jest to jedyny przypadek, w którym wykazano udział tego rodzaju metalu w metabolizmie komórkowym. Wszystkie organizmy żywe wykształciły szereg mechanizmów umożliwiających utrzymanie odpowiedniego poziomu mikroelementów (pierwiastków śladowych), gdyż w zbyt wysokich stężeniach stają się one toksyczne, a granica pomiędzy ich niedoborem a nadmiarem jest wąska. Ponadto konieczne są mechanizmy umożliwiające obronę przed metalami niepełniącymi fizjologicznych funkcji oraz mechanizmy służące do rozróżniania jonów metali ciężkich [12, 60].

U mikroorganizmów można wyróżnić sześć podstawowych rodzajów mechanizmów odpowiedzialnych za utrzymanie homeostazy metali ciężkich w komórkach: (i) zmniejszenie przepuszczalności ściany lub błony komórkowej dla metali, (ii) aktywne wypompowywanie jonów z komórki, (iii) wewnątrzkomórkowa sekwestracja poprzez białka wiążące metale, (iv) wydzielanie przez komórki substancji obniżających biodostępność metali, (v) enzymatyczne przekształcenie metalu do formy mniej toksycznej oraz (vi) adaptację komórek do

\* Autor korespondencyjny: Zakład Genetyki, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu, ul. Lwowska 1, 87-100 Toruń; tel. 56 611 45 76; e-mail: browns@umk.pl

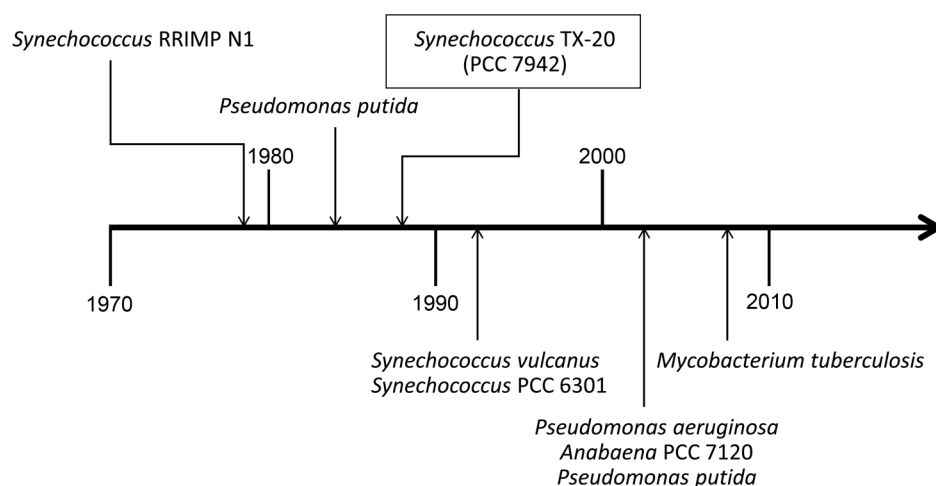
obecności toksycznych metali zwykle poprzez zmniejszenie wrażliwości komponentów komórki na metale [2]. Niezwykle istotne jest, że posiadane przez bakterie systemy utrzymania homeostazy mikroelementów czy mechanizmy obronne przed toksycznym działaniem jonów metali ciężkich wyróżniają się niemal całkowitą specyficznością w stosunku do metalu [53].

W komórkach eukariotycznych ważnym elementem metabolizmu metali są niewielkie (> 10 kDa), bogate w reszty cysteinowe białka – metalotioneiny (*metallothioneins* – MT). Reszty cysteinowe, które mogą stanowić nawet 30% wszystkich aminokwasów, poprzez swoje grupy tiolowe (-SH), wiążą różne metale ciężkie (zarówno mikroelementy, jak i metale niefizjologiczne). Białka te występują u roślin i zwierząt, a także niższych *Eucaryota*, jak grzyby i glony [10, 13, 20, 29]. Metalotioneiny pierwotnie podzielono na trzy klasy. Do klasy I należały głównie zwierzęce MT charakteryzujące się występowaniem 20 reszt cysteinowych równomiernie rozmieszczonych w całym łańcuchu aminokwasowym oraz brakiem aminokwasów aromatycznych. Klasę II stanowiły głównie MT roślinne, o mniejszej liczbie cystein zgrupowanych w domenach N- i C-końcowej oraz posiadające aminokwasy aromatyczne. Natomiast do klasy III należały syntetyzowane enzymatycznie fitochelatyny u roślin i kladystyny u grzybów [34, 48]. Wzrastająca w kolejnych latach liczba odkrytych MT spowodowała, że podział ten był niewystarczający. Nadrodzina metalotionein na podstawie układu i ilości reszt cysteinowych została podzielona na 15 rodzin, a jedną z nich stanowi rodzina MT bakteryjnych [1]. Liczne badania potwierdzają, że fizjologiczne funkcje MT u *Eucaryota* nie są ograniczone do metali ciężkich. Metalotioneiny u człowieka pełnią istotną rolę w regulacji homeostazy cynku, regulują jego dystrybucję poprzez magazynowanie, uwalnianie oraz

przekazywanie go do transporterów. MT wiążą cynk znacznie wydajniej niż inne metaloproteiny. Dla przykładu w ludzkich hepatocytach metalotioneiny wiążą nawet 5–10% całkowitego cynku [38]. Jednakże biosynteza ludzkich MT jest indukowana także przez hormony np. glukokortykoidy, wzmożony wysiłek fizyczny, mutageny, promieniowanie X i jonizujące, cytokiny oraz związki o właściwościach utleniających [54, 59]. Metalotioneiny u *Eucaryota* są zaangażowane w obronę komórek przed stresem oksydacyjnym, regulację niektórych procesów rozwojowych, także w procesy nowotworzenia i apoptozy oraz są niezbędne dla prawidłowego funkcjonowania ośrodkowego układu nerwowego [46, 47]. Mimo, że pierwsza MT zwierzęca została wyizolowana niemal 60 lat temu [39], a roślinna niemal 30 lat temu [31] ich fizjologiczne funkcje pozostają nie w pełni wyjaśnione.

## 2. Historia odkryć metalotionein u bakterii

Metalotioneiny bakteryjne pozostają najslabiej poznaną grupą metalotionein. Schemat podsumowujący historię odkryć bakteryjnych metalotionein przedstawiono na rysunku 1. Pierwszą wyizolowaną MT bakteryjną było białko z morskiej bakterii *Synechococcus* sp. RRIMP N1 [42]. Pozyskane białko charakteryzowała się znaczną zawartością cystein, a jego ekspresja była indukowana przez kadm. Ze względu na zbyt małą ilość uzyskanego białka poznanie sekwencji tej MT nie było jednak możliwe. Kilka lat później z bakterii glebowej *Pseudomonas putida*, pozyskanej z osadów ściekowych, wyizolowano trzy niewielkie białka, które podobnie jak poprzednio charakteryzowały się znaczną liczbą cystein i jonów metali. Białka te nazwano „pseudo-tioneinami”, ale ponownie nie udało się poznać ich sekwencji [25,



Rys. 1. Historia odkryć bakteryjnych metalotionein przedstawiona na osi czasu

Powyżej osi przedstawiono te gatunki bakterii, u których metalotioneiny zidentyfikowano poprzez izolację białka z komórki (ramka oznacza, że poznana została sekwencja aminokwasowa wyizolowanej MT). Poniżej osi przedstawiono te gatunki bakterii, u których metalotioneiny odkryto na podstawie analizy sekwencji genomu.

26]. W roku 1988 wyizolowano kolejne białko zaliczone do rodziny metalotionein ze słodkowodnej cyanobakterii *Synechococcus* TX-20 (*Synechococcus* PCC 7924). W tym przypadku oznaczono niemal pełną sekwencję tego białka i wykazano, że pomiędzy nim a MT eukariotycznymi istnieje bardzo niskie podobieństwo ograniczające się do dużej zawartości reszt cysteinowych i motywów, w których są one zgrupowane – Cys-X-Cys, Cys-X-X-Cys oraz Cys-Cys gdzie X oznacza dowolny aminokwas [44]. Wraz z rozwojem biologii molekularnej udało się zidentyfikować kolejne MT bakteryjne na podstawie analizy sekwencji genomowego DNA: *Synechococcus* PCC 6301 [23], *Thermosynechococcus vulcanus* [52], jednakże białka kodowane przez odnalezione geny nie zostały scharakteryzowane. Blindauer i wsp. [4] zidentyfikowali w genomach *Pseudomonas aeruginosa*, *P. putida* i *Anabaena* PCC 7120 ortologu metalotionein z *Synechococcus* PCC 7924. Na podstawie zidentyfikowanych sekwencji poprzez heterologiczną ekspresję w komórkach *Escherichia coli* pozyskano białka i poddano je analizie biochemicznej. Ostatnią opisaną jak dotąd MT bakteryjną jest zidentyfikowana w *Mycobacterium tuberculosis* (prątek gruźlicy) metalotioneina nazwana MymT (*mycobacterial metallothionein*) [22].

Pierwsze metalotioneiny bakteryjne zostały wyizolowane z cyanobakterii *Synechococcus*, dlatego zostały nazwane SmtA. Odkrycie homologicznych białek u *Pseudomonas* spowodowało zmianę nazwy na BmtA (*bacterial metallothionein*) dla całej rodziny prokariotycznych MT, a SmtA i PmtA odpowiednio dla MT *Synechococcus* i *Pseudomonas* [5]. MymT z *Mycobacterium* charakteryzowała się jednak znacznie odmienną sekwencją od poznanych wcześniej bakteryjnych metalotionein, dlatego zaproponowano oddzielenie dla nich kolejnej grupy w rodzinie tych bakteryjnych białek. Analiza sekwencji całych genomów bakteryjnych ujawniła istnienie białek zawierających nowy typ domeny

palca cynkowego – GatA. Białka te, mimo homologii części sekwencji do BmtA oraz podobnego sposobu wiązania jonów metali ciężkich nie są metalotioneinami i zostały wydzielone jako osobna rodzina prokariotycznych białek [4, 7].

### 3. Budowa i sposób wiązania jonów metali ciężkich przez bakteryjne MT

Metalotioneiny wiążą jednowartościowe jony z grupy 11 i dwuwartościowe jony z grupy 12 układu okresowego pierwiastków. Struktura przestrzenna MT jest zdeterminowana przez jony metali i tylko w obecności właściwego metalu białka te przyjmują prawidłową konformację przestrzenną. Jony dwuwartościowe są wiązane w konformacji tetraedrycznej, co oznacza, że jeden jon jest wiązany przez cztery reszty cysteinowe. Natomiast jony jednowartościowe są wiązane przez dwie lub trzy cysteiny. Cysteiny wiążące metale mogą wiązać równocześnie dwa jony (tzw. cysteiny łączące) lub tylko jeden jon metalu – cysteiny terminalne. Najlepiej poznano strukturę przestrzenną MT ssaczych, w których stwierdzono występowanie dwóch oddzielnych domen wiążących metale: domeny  $\beta$  wiążące 3 jony dwuwartościowe przez 9 reszt cysteinowych oraz domeny  $\alpha$ , która poprzez 11 cystein wiąże 4 jony [55].

Sekwencje aminokwasowe metalotionein bakteryjnych wykazują największe zróżnicowanie spośród poznanych dotąd rodzin metalotionein. Sposób wiązania jonów metali ciężkich zależy od ilości i układu reszt cysteinowych, a zatem poszczególne bakteryjne MT mogą znacznie różnić się od siebie ilością i rodzajem wiązanych jonów. Najlepiej poznana BmtA jest SmtA z *Synechococcus* PCC 7942, która zawiera 56 aminokwasów, w tym 9 reszt cysteinowych. Ponadto w sekwencji aminokwasowej tej MT stwierdzono obecność 3 reszt histydynowych (Rys. 2A), z których dwie są



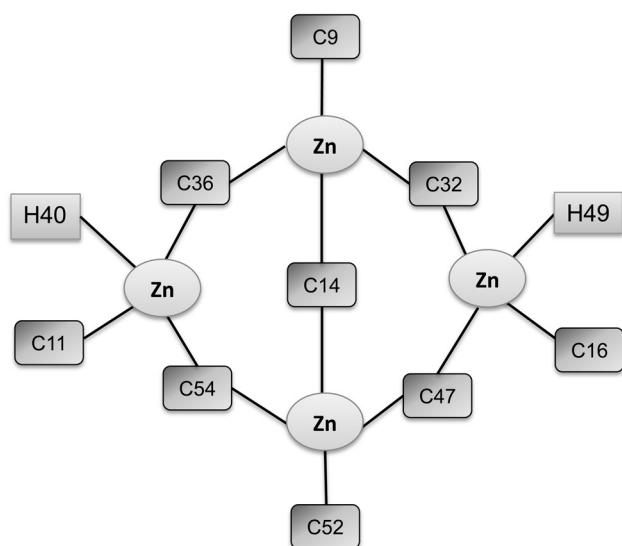
Rys. 2. Sekwencje aminokwasowe bakteryjnych metalotionein

Porównano sekwencje metalotionein reprezentujących dwie grupy: (A) BmtA (SmtA *Synechococcus* PCC 7942 oraz PmtA *Pseudomonas putida*), (B) MymT *Mycobacterium tuberculosis* oraz (C) porównanie sekwencji aminokwasowych metalotionein bakteryjnych SmtA, PmtA i MymT. Gwiazdkami oznaczono identyczne aminokwasy, kolorem jasnoszarym oznaczono reszty cysteinowe, natomiast kolorem ciemnoszarym – reszty histydynowe.

bezpośrednio zaangażowane w wiązanie metali poprzez swój pierścień imidazolowy [3]. Cechą charakterystyczną, jak sądzono początkowo, wszystkich metalotionein jest brak aminokwasów aromatycznych, w tym histydyn. Jednakże odkrycie MT u roślin, a następnie u bakterii pokazało, że brak aminokwasów aromatycznych jest cechą charakterystyczną tylko metalotionein kręgowców. Ponadto w przypadku roślinnych MT wykazano, że histydyny odgrywają znaczącą rolę nie tylko w wiązaniu metali, ale także w rozróżnianiu pomiędzy kadmem i cynkiem [33]. PmtA zbudowane są z ponad 70 aminokwasów, posiadają 10 reszt cysteinowych i zmienną liczbę reszt histydynowych – od jednej do maksymalnie trzech (Rys. 2A). Należy jednak zauważyć, że ilość i układ reszt aminokwasowych wiążących jony metali, zwłaszcza histydyn, jest znacznie mniej konserwowany ewolucyjnie u różnych gatunków *Pseudomonas* niż w przypadku SmtA u różnych gatunków cyjanobakterii [7]. Porównanie sekwencji SmtA i PmtA (Rys. 2A) pokazuje, że mimo znacznych różnic w składzie aminokwasowym porównywanych metalotionein układ i ilość reszt wiążących metale, zwłaszcza cystein, jest wysoce konserwowany.

Analiza biochemiczna tych metalotionein z wykorzystaniem spektroskopii mas, analizy elementarnej oraz magnetycznego rezonansu jądrowego wykazała, że MT *Synechococcus* PCC 7942 wiąże 4 jony cynku (lub kadmu) w klastrze –  $Zn_4Cys_9His_2$  [3, 4, 14].

Na rysunku 3 przedstawiono schemat wiązania 4 jonów  $Zn^{2+}$  przez SmtA. Ponadto wykazano, że SmtA charakteryzuje się niespotykaną wśród MT z innych organizmów cechą – jeden ze związanych atomów cynku nie podlega wymianie na dostarczany z zewnątrz



Rys. 3. Schemat wiązania jonów cynku (Zn) przez SmtA z *Synechococcus* PCC 7942

Aminokwasy wiążące jony metalu oznaczono: C – cysteina, H – histydyna, a stojąca przy literze cyfra/liczba oznacza kolejność tego aminokwasu w łańcuchu aminokwasowym, za [4, 7] (zmodyfikowane).

kadmu, podczas gdy typowo wiązania MT-jony metali są labilne i wymiana z jonów związanych z metalotioneiną na te dostarczane z zewnątrz zachodzi w czasie kilku sekund. Ta kinetyczna bierność jednego z jonów związanego z SmtA jest prawdopodobnie spowodowana przez zasłonięcie go przez aminokwasy lub pozostałe jony metali [7]. SmtA jest także zdolne do wiązania innych jonów metali w tym miedzi czy rtęci [51].

MT z *Pseudomonas* wydają się być mniej stabilne, bardziej podatne na utlenianie i agregację niż te z *Synechococcus*. Co więcej substytucja His49 SmtA przez Asp44 w PmtA (Rys. 2A) powoduje, że wiążą one tylko trzy jony cynku lub kadmu i wszystkie związane jony łatwo podlegają wymianie na inne jony metali dostarczane z zewnątrz [4, 5]. W literaturze nie ma natomiast doniesień opisujących strukturę przestrzenną jakiegokolwiek metalotioneiny z *Pseudomonas*.

MymT jest najmniejszą jak dotąd poznaną prokaryotyczną metalotioneiną, posiada 53 aminokwasy, w tym 7 reszt cysteinowych i dwie histydynowe (Rys. 2B). W przeciwieństwie do wyżej opisanych metalotionein, MymT wykazuje większe powinowactwo do miedzi niż do cynku czy kadmu. Wykazano, że białko to może wiązać od 4 do 6–7 jonów  $Cu^{2+}$ , natomiast najbardziej stabilną konformację wydaje się mieć forma z 5 jonami miedzi [22]. Porównanie sekwencji aminokwasowych SmtA, PmtA i MymT (Rys. 2C) pokazuje, że mimo bardzo niskiego stopnia homologii pomiędzy MymT a BmtA obserwuje się podobieństwo motywów zawierających reszty cysteinowe.

#### 4. Funkcje metalotionein bakteryjnych

Wszystkie wyizolowane w latach 80. ubiegłego wieku MT bakteryjne, a więc z *Synechococcus* RRIMP N1, TX-20 czy *P. putida* pochodziły z bakterii zaadaptowanych do życia w środowisku zawierającym znaczne stężenia kadmu [25, 42, 44]. SmtA pojawiało się w komórkach bakteryjnych tylko w odpowiedzi na obecności kadmu i cynku, ale nie na obecności miedzi [43]. Jednakże poziom transkryptów genu *smtA* *Synechococcus* PCC 7924 wzrastał w obecności wielu jonów metali: Cd, Co, Cr, Cu, Hg, Ni, Pb czy Zn. Ponadto gen reporterowy *lacZ* umieszczony pod kontrolą promotora genu *smtA* ulegał ekspresji indukowanej przez różne metale, jednakże najsilniejszym induktorem był cynk. Mutanty *Synechococcus* pozbawione genu *smtA* są wyraźnie nadwrażliwe na cynk, podczas gdy na kadmu tylko w niewielkim stopniu [58]. Nadekspresja *smtA* w komórkach *E. coli* prowadzi natomiast do zwiększonej akumulacji cynku i miedzi, ale nie kadmu [51]. Co ciekawe, zwiększoną liczbę kopii genu *smtA* obserwowano w szczepach *Synechococcus* PCC 6301 charakteryzujących się zwiększoną tolerancją na kadmu [23]. Przedstawione

wyniki sugerują, że SmtA u cyjanobakterii jest zaangażowane w utrzymanie homeostazy cynku, jednakże nie można wykluczyć ich roli również w detoksyfikacji kadmu [7]. Znacznie mniej wiadomo na temat fizjologicznych funkcji MT u *Pseudomonas*. Poziom PmtA u *P. putida* i *P. aeruginosa* wzrastał w obecności kadmu i miedzi [16], a u *P. aeruginosa* także w odpowiedzi na ołów [41] co może sugerować udział metalotionein *Pseudomonas* w obronie komórek przed toksycznym działaniem metali ciężkich.

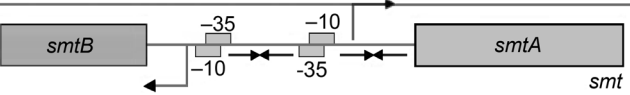

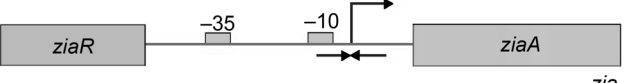


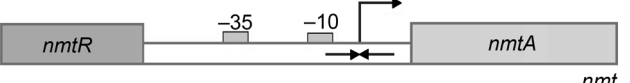
Odmienna budowa MymT i specyficzność w stosunku do związanych metali odzwierciedla zupełnie inne fizjologiczne funkcje MT u mykobakterii. Białko to zostało odkryte w czasie poszukiwania, które geny *M. tuberculosis* nadają jej oporność na jeden z testowanych leków przeciwgruźliczych. Ekspresja genu *mymT* jest indukowana przez różne metale ciężkie, ale jej najsilniejszym induktorem jest miedź. Ponadto wzrost poziomu mRNA obserwowano w odpowiedzi na stres oksydacyjny, reaktywne formy azotu czy uszkodzenie ściany komórkowej bakterii. Mutanty pozbawione genu *mymT* są bardziej wrażliwe na miedź, ale nie na inne metale ciężkie [22].

Prątki gruźlicy większą część cyklu życiowego bytują w fagosomach makrofagów, w których w odpowiedzi na zakażenie bakteryjne dochodzi do nagromadzenia się jonów miedzi. Sposób toksycznego działania tych jonów na *M. tuberculosis* pozostaje niejasny, możliwe jest działanie bezpośrednie lub pośrednie na przykład poprzez generowanie toksycznych ilości reaktywnych form tlenu. Wirulencja *M. tuberculosis* jest związana z opornością na miedź i posiada ona przynajmniej trzy niezależne szlaki umożliwiające obronę przed toksycznym działaniem tego pierwiastka: (i) aktywne wypompowywanie jonów miedzi poza komórkę, (ii) oksydazy multimiedziowe oraz (iii) białka chelatujące miedź w cytoplazmie, w tym metalotioneiny. Współdziałanie tych mechanizmów wydaje się być niezbędne w osiągnięciu pełnej zjadliwości przez prątki gruźlicy [15, 50]. Operon *mymT* wchodzi w skład regulonu związanego z opornością komórek na miedź kontrolowanego przez represor RicR, który ponadto reguluje ekspresję wielu innych genów obecnych tylko w patogennych szczepach *Mycobacterium*. Sugeruje to, że metalotioneina MymT może mieć bezpośredni związek z wirulencją tej bakterii [18]. Potwierdza to również analiza dostępnych sekwencji genomów mykobakterii, która wykazała brak genów kodujących MymT u szczepów mniej lub całkowicie niewirulentnych [7]. Jednakże, mutanty *M. tuberculosis* pozbawione *mymT* nie są mniej zjadliwe dla myszy niż szczepy dzikie [22]. Jest wysoce prawdopodobne, że całkowita utrata wirulencji jest możliwa tylko kiedy bakteria zostanie pozbawiona wszystkich mechanizmów zaangażowanych w detoksyfikację miedzi [18].

BmtA i MymT różnią się znacznie nie tylko sekwencją, ale także wydają się pełnić bardzo odmienne fizjologiczne funkcje związane bezpośrednio z adaptacją komórek bakteryjnych do specyficznych nisz środowiskowych jakie zajmują. Metalotioneiny bakteryjne są słabo konserwowane ewolucyjnie, a tym samym jest bardzo prawdopodobne, że ich fizjologiczne funkcje są bardzo różne w poszczególnych grupach bakterii [6].

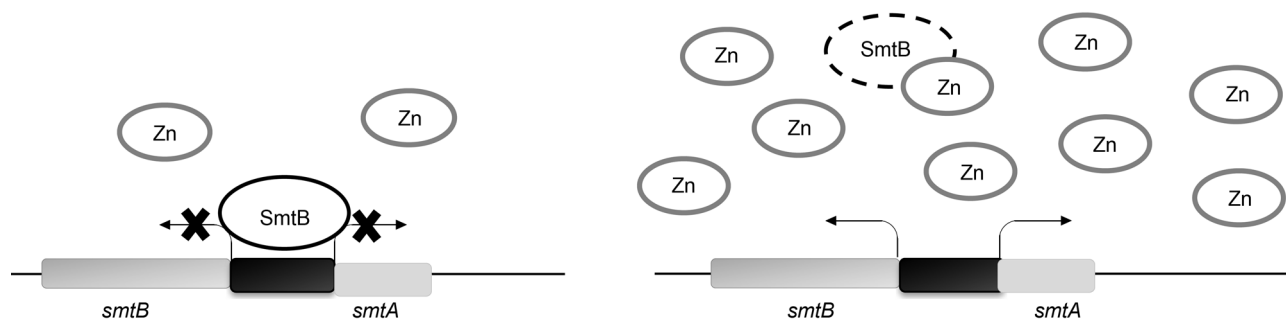
## 5. Regulacja ekspresji bakteryjnych metalotionein

Szacuje się, że około 1/3 wszystkich białek wymaga do swojej aktywności jonów metali. W toku ewolucji pojawiła się specyficzność białko-metal, oznaczająca, że tylko w obecności konkretnego metalu dane białko może prawidłowo funkcjonować. Aktualne pozostaje pytanie w jaki sposób poszczególne białka rozróżniają jony metali i są zdolne do preferencyjnego wychwytywania właściwego jonu. Jest to niezwykle istotne zagadnienie zwłaszcza, że poszczególne metale zakumulowane są w komórkach bakteryjnych w bardzo różnych ilościach, a ponadto niektóre metale łatwiej niż inne wiążą się z białkami zgodnie z tzw. serią Irvinga-Williams'a. Zgodnie z nią najmniejszą stabilnością charakteryzują się kompleksy białek z jonami  $Mn^{2+}$  czy  $Fe^{2+}$ , większą z  $Cu^{2+}$  i  $Zn^{2+}$ , natomiast najsilniej białka wiążą jony  $Cu^+$ ,  $Fe^{3+}$  oraz toksycznych metali jak kadm czy rtęć [60]. Jednym z mechanizmów zapewniającym wiązanie odpowiednich metali przez odpowiednie białka jest ograniczanie ilości wolnych jonów metali w komórce. Badania potwierdzają, że to nie metale ciężkie rywalizują ze sobą o wiązanie z białkiem, ale to białka między sobą rywalizują o konkretny metal. Ponadto, komórki posiadają liczne czynniki transkrypcyjne zależne od jonów metali, które regulują ekspresję białek zaangażowanych w metabolizm komórkowy metali ciężkich. Czynniki te nazywane metalosensarami (metaloregulatorami) kontrolują ekspresję genów kodujących białka odpowiedzialne za pobieranie, magazynowanie lub wypompowywanie jonów [19]. Związanie metalu przez metalosensor powoduje zmiany w jego konformacji, które umożliwiają interakcje z DNA i tym samym aktywację ekspresji genu przez niego regulowanego (aktywatory transkrypcji) lub przeciwnie, po związaniu metalu metalosensor staje się nieaktywny i transkrypcja genu przez niego kontrolowanego zostaje zahamowana (represor transkrypcji). W komórkach bakteryjnych zidentyfikowano siedem głównych rodzin metaloregulatorów, których nazwy pochodzą od pierwszych zidentyfikowanych przedstawicieli: ArsR/SmtB, MerR, CsoR/RcnF, CopY, Fur, DtxR, NikR [37]. Do rodziny ArsR/SmtB zalicza się represory transkrypcji regulowane przez różne jedno- i dwuwartościowe jony metali ciężkich, które pochodzą od wspólnego przodka,

Operon	Specyficzność	Białko represorowe	Białko oporności	Funkcja
	Zn(II), Co(II), Cd(II)	SmtB	SmtA	metalotioneina
	As(III), Sb(III)	ArsR (ArsD?)	(ArsA) ArsB ArsC	ATPaza typu P kanał błonowy reduktaza arsenu
	Zn(II)	ZiaR	ZiaA	ATPaza typu P
	Cd(II), Pb(II), Bi(III), Zn(II)	CadC	CadA	ATPaza typu P
	Zn(II), Co(II)	CzrA	CzrB	kanał błonowy
	Ni(II), Co(III)	NmtR	NmtA	ATPaza typu P

Rys. 4. Operony, które podlegają kontroli transkrypcyjnej białek represorowych z rodziny ArsR/SmtB

Na schemacie podano również od jakiego metalu zależy dany represor oraz ekspresja jakich białek jest przez niego regulowana [8], zmodyfikowane.

Rys. 5. Schemat przedstawiający mechanizm regulacji operonu *smt* przez białko SmtB w zależności od stężenia jonów  $Zn^{2+}$  w komórce bakteryjnej

ale w wyniku ewolucji uzyskały odmienną specyficzność w stosunku do metali (Rys. 4). ArsR jest zależnym od arsenu/antymonu represorem operonu *ars* występującego np. u *E. coli*. SmtB jest natomiast zależnym od cynku represorem transkrypcji genu metalotioneiny *smtA* u *Synechococcus* [8, 11].

Gen kodujący SmtA u *Synechococcus* jest oddzielony od genu *smtB* przez region pełniący funkcje promotora-operatora długości około 100 pz. Mutanty pozbawione genu *smtB* cechują się wysoką ekspresją *smtA* nawet przy braku cynku co potwierdza, że SmtB jest zależnym od cynku represorem transkrypcji genu *smtA* [28, 40].

W obrębie sekwencji oddzielającej geny operonu *smt* występują cztery miejsca, w których może dochodzić do interakcji SmtB z DNA. Przy niskim stężeniu SmtB wiąże się jako monomer do jednego z dwóch miejsc (S1 i S2) położonych bezpośrednio po 5' stronie genu *smtA*. Kiedy stężenie tego białka w komórce wzrasta powstają dimery, które wiążą się równocześnie do obu tych miejsc [17] i dopiero wówczas dochodzi do zahamowania transkrypcji *smtA* [57] (Rys. 5). Wiązanie SmtB do dwóch pozostałych miejsc (S3 i S4) w DNA zachodzi tylko przy bardzo wysokich stężeniach tego białka. Cynk hamuje dimeryzację tego białka [17] lub

zmienia jego konformację przestrzenną, a tym samym uniemożliwia jego interakcje z DNA i aktywuje ekspresję *smtA* [49]. Związanie wolnych jonów cynku przez SmtA umożliwia ponowne interakcje monomerów SmtB i wyciszenie ekspresji *smtA*. SmtB jest także regulatorem własnej transkrypcji prawdopodobnie poprzez wiązanie się z miejscami S3 i S4. Ponadto jest możliwe, że istnieje dodatkowy mechanizm kontroli transkrypcji *smtA*, gdyż nawet przy braku SmtB obserwowano wzrost ekspresji metalotioneiny *smtA* w odpowiedzi na metale ciężkie [6].

U *Synechocystis* PCC 6803, w genomie której nie znaleziono sekwencji kodującej białko homologiczne do SmtA, występuje operon *zia* (Rys. 4). W skład operonu wchodzi, podobnie jak w przypadku operonu *smt*, gen kodujący białko represorowe ZiaR będący ortologiem SmtB oraz gen kodujący pompę ZiaA odpowiedzialną za aktywne usuwanie jonów cynku z cytoplazmy do przestrzeni periplazmatycznej [56]. U innej słodkowodnej cyjanobakterii *Oscillatoria brevis* stwierdzono obecność zarówno metalotioneiny, jak i pompy homologicznej do ZiaA – Bxa1. Ekspresja obu genów jest indukowana przez jony metali ciężkich, a ich nadekspresja w *E. coli* daje zwiększoną oporność transgenicznych bakterii na cynk i kadm. Wydaje się, że Bxa1 odpowiada za szybką odpowiedź komórki na metale, podczas gdy SmtA raczej za utrzymanie długotrwałej homeostazy [36]. Ekspresja obu tych genów jest regulowana przez metalosensor należący do rodziny ArsA/SmtB – BxmR [35]. Potwierdza to, że nawet u blisko spokrewnionych mikroorganizmów mogą istnieć bardzo zróżnicowane mechanizmy utrzymywania homeostazy metali [6]. Białka homologiczne do SmtB zidentyfikowano również u gatunków bardziej odległych ewolucyjnie np. *Staphylococcus aureus*. Białko CzrA odpowiada za regulację operonu *czrAB* odpowiedzialnego za transport cynku przez błonę komórkową [30].

Za kontrolę ekspresji *mymT* u *M. tuberculosis* odpowiada represor RicR należący, do innej niż SmtB, rodziny metalosensorów CsoR/RcnF. Represor ten kontroluje regulon składający się z 5 operonów związanych z homeostazą miedzi. U *M. tuberculosis* występuje też inny czynnik transkrypcyjny zależny od miedzi – CsoR, a powody występowania dwóch represorów transkrypcji z tej samej rodziny pozostają niejasne [27]. Przy wysokim stężeniu miedzi RicR nie wiąże się z DNA i tym samym następuje indukcja ekspresji *mymT* [18].

## 6. Obecność metalotionein u bakterii

Analiza dotychczasowych doniesień dotyczących metalotionein bakteryjnych mogłaby skłonić do stwierdzenia, że białka te nie są szeroko rozpowszechnione u bakterii. Jednakże odkrycie MymT sugeruje raczej,

że sekwencje bakteryjnych metalotionein nie są ewolucyjnie konserwowane, a brak homologii pomiędzy metalotioneinami różnych grup bakterii może powodować problemy z odnajdowaniem genów je kodujących w nowo sekwencjonowanych genomach. Poza niskim stopniem podobieństwa także niewielkie rozmiary i niska złożoność MT mogą być przyczyną pomijania ich sekwencji kodujących w czasie automatycznych analiz rozrastających się baz danych bakteryjnych sekwencji DNA. Wiele gatunków bakterii zawiera więcej niż jedną kopię genu metalotioneiny w genomie, a u niektórych występują dodatkowe kopie tego genu zlokalizowane także w plazmidzie [7].

W wyniku przeszukania bazy sekwencji aminokwasowych zdeponowanych w bazie NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov/protein](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein)) za pomocą hasła: „metallothionein bacteria” otrzymuje się w sumie 4848 wyniki (maj 2016). Interesujący jest fakt, że metalotioneiny są w ten sposób znajdowane także u innych bakterii niż dotychczas w tym u *Proteobacteria* czy *Actinobacteria*. Jednakże analiza otrzymanych trafień ujawnia, że wiele z nich jest fałszywych. Skrót SmtA jest mylony z tym oznaczającym metylotransferazę (MT) zależną od S-adenozylu-L-metioniny (SAM), a tym samym znakomita część otrzymanych trafień mimo, że opisanych jako metalotioneina SmtA zawiera sekwencję metylotransferazy a nie metalotioneiny. Ponadto, w wielu przypadkach otrzymana sekwencja nie spełnia w pełni wymagań stawianych metalotioneinom np. występują tylko 4 reszty cysteinowe. Podobnie jest w przypadku innych dostępnych baz danych np. bazy UniProt ([www.uniprot.org](http://www.uniprot.org)) zawierających sekwencje aminokwasowe. Tego rodzaju analiza baz danych nie daje odpowiedzi na pytanie o powszechność metalotionein u bakterii. Jednakże przeszukanie baz danych z wykorzystaniem znanych sekwencji nukleotydowych lub aminokwasowych metalotionein bakteryjnych również nie da nam pełnego obrazu dystrybucji tych białek u bakterii ze względu na możliwy brak homologii pomiędzy znanymi MT a tymi, które mogą pozostawać nieodkryte.

Zasadne też jest pytanie, dlaczego u bakterii pojawiły się metalotioneiny skoro u tych organizmów za utrzymanie odpowiedniego poziomu jonów metali ciężkich w komórce odpowiadają przede wszystkim transportery aktywnie usuwające te jony poza komórkę. Być może funkcje metalotionein u bakterii to coś więcej niż utrzymanie homeostazy mikroelementów czy detoksyfikacja toksycznych metali. W przypadku *Synechococcus* metalotioneiny mogą pełnić rolę rezerwuaru cynku na wypadek jego braku w środowisku. Natomiast u *M. tuberculosis* istnienie wielu ścieżek obrony przed toksycznym stężeniem miedzi występującym w makrofagach może sugerować bardziej złożone fizjologiczne funkcje MymT, niż tylko chelatacja toksycznych jonów miedzi [7].

## 7. Podsumowanie

Utrzymanie odpowiedniego stężenia metali ciężkich u wszystkich żywych organizmów obejmuje szereg procesów pozwalających na ściśle kontrolowanie stężenia mikroelementów i obronę przed toksycznymi metalami. Metalotioneiny to białka bogate w reszty cysteinowe, powszechne u *Eucaryota*, ale występujące także u niektórych *Prokaryota*. Są chelatorami jonów metali ciężkich i pełnią bardzo ważną rolę zarówno w homeostazie mikroelementów jak i detoksyfikacji metali niepełniących fizjologicznych funkcji. U bakterii jak dotąd metalotioneiny zostały zidentyfikowane tylko u cyjnobakterii, bakterii z rodzaju *Pseudomonas* oraz mykobakterii. Zidentyfikowane MT bakteryjne różnią się budową, rodzajem wiązanych jonów metali ciężkich i prawdopodobnie pełnią odmienne fizjologiczne funkcje.

Metalotioneiny bakteryjne stanowią bardzo interesującą rodzinę bakteryjnych białek, pozostają jednak słabo scharakteryzowane. Ze względu na niski stopień homologii sekwencji aminokwasowej pomiędzy MT bakterii identyfikacja nowych członków tej rodziny białek jest utrudniona. Konieczne są dalsze badania, które pozwolą stwierdzić czy MT są powszechnymi białkami u bakterii oraz umożliwią pełne poznanie ich budowy, sposobu wiązania jonów, a przede wszystkim fizjologicznych funkcji. Wraz z rozwojem badań i z zastosowaniem nowoczesnych technik, istnieje nadzieja, że możliwe będzie jeszcze dokładniejsze poznanie ich mechanizmu działania i ustaleniu pełnionych przez nie funkcji oraz wyizolowanie kolejnych metalotionein z mikroorganizmów.

W przyszłości wiedza ta może mieć znaczący wpływ m. in. na poznanie mechanizmów wiązania i regulacji jonów pierwiastków śladowych przez bakterie patogene, a tym samym możliwość pozyskiwania nowych terapeutyków oraz rozwój technik bioremediacji wód, gleby czy osadów z metali ciężkich. Dzięki poznaniu pełnionych przez te białka funkcji, możliwe będzie wykorzystanie ich w przemyśle biotechnologicznym, a wraz z postępem nauk biologicznych i kolejnym odkryciom, możliwe będzie zastosowanie MT na szerszą skalę w medycynie.

### Podziękowania

Praca została sfinansowana z grantu UMK nr 2580-B.

### Piśmiennictwo

1. Binz P.A., Kägi J.H.R.: Metallothionein: molecular evolution and classification (w) Metallothionein IV, red. Klaassen C.D. Springer, Basel 1999, s. 7–13
2. Bruins M.R., Kapil S., Oehme F.W.: Microbial resistance to metals in the environment. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **45**, 198–207 (2000)
3. Blindauer C.A., Harrison M.D., Parkinson J.A., Robinson A.K., Cavet J.S., Robinson N.J., Sadler P.J.: A metallothionein containing a zinc finger within a four-metal cluster protects a bacterium from zinc toxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 9593–9598 (2001)
4. Blindauer C.A., Harrison M.D., Robinson A.K., Parkinson J.A., Bowness P.W., Sadler P.J., Robinson N.J.: Multiple bacteria encode metallothioneins and SmtA-like zinc fingers. *Mol. Microbiol.* **45**, 1421–1432 (2002)
5. Blindauer C.A., Sadler P.J.: How to hide zinc in a small protein. *Acc. Chem. Res.* **38**, 62–69 (2005)
6. Blindauer C.A.: Bacterial metallothioneins (w) Metallothioneins and related chelators. Metal ions in life science vol. 5, red. Sigel A., Sigel H., Sigel R.K.O. Royal Society of Chemistry, Cambridge 2009, s. 51–81
7. Blindauer C.A.: Bacterial metallothioneins: past, present, and questions for the future. *J. Biol. Inorg. Chem.* **16**, 1011–1024 (2011)
8. Busenlehner L.S., Pennella M.A., Giedroc D.P.: The SmtB/ArsR family of metalloregulatory transcriptional repressors: structural insights into prokaryotic metal resistance. *FEMS Microbiol. Rev.* **27**, 131–143 (2003)
9. Capdevila M., Atrian S.: Metallothionein protein evolution: a miniassay. *J. Biol. Inorg. Chem.* **16**, 977–989 (2011)
10. Capdevila M., Bofill R., Palacios Ò., Atrian S.: State-of-art of metallothioneins at the beginning of the 21<sup>st</sup> century. *Coord. Chem. Rev.* **256**, 46–62 (2012)
11. Cavet J.S., Meng W., Pennella M.A., Appelhoff R.J., Giedroc D.P., Robinson N.J.: A nickel-cobalt sensing ArsR-SmtB family repressor: contributions of cytosol and effector binding sites to metal selectivity. *J. Biol. Chem.* **277**, 38441–38448 (2002)
12. Clemens S.: Toxic metal accumulation, responses to exposure and mechanisms of tolerance in plants. *Biochimie*, **88**, 1707–1719 (2006)
13. Dąbrowska G., Mierek-Adamska A., Goc A.: Characteristics of *Brassica napus* L. metallothionein genes: expression in organs and during seed germination. *Austr. J. Crops Sci.* **7**, 1324–1332 (2013)
14. Daniels M.J., Turner-Cavet J.S., Selkirk R., Sun H., Parkinson J.A., Sadler P.J., Robinson N.J.: Coordination of Zn<sup>2+</sup> (and Cd<sup>2+</sup>) by prokaryotic metallothionein. Involvement of His-imidazole. *J. Biol. Chem.* **273**, 22957–22961 (1998)
15. Darwin K.H.: *Mycobacterium tuberculosis* and copper: a newly appreciated defense against an old foe? *J. Biol. Chem.* **290**, 18962–18966 (2015)
16. Enshaei M., Khanafari A., Sepahey A.A.: Metallothionein induction in two species of *Pseudomonas* exposed to cadmium and copper contamination. *Iran J. Environ. Health Sci. Eng.* **7**, 287–298 (2010)
17. Erbe J.L., Taylor K.B., Hall L.M.: Metalloregulation of the cyanobacterial smt locus: identification of SmtB binding sites and direct interaction with metals. *Nucl. Acids Res.* **23**, 2472–2478 (1995)
18. Festa R.A., Jones M.B., Butler-Wu S., Sinsimer D., Gerads R., Bishai W.R., Peterson S.N., Darwin K.H.: A novel copper-responsive regulon in *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol. Microbiol.* **79**, 133–148 (2011)
19. Foster A.W., Robinson N.J.: Promiscuity and preferences of metallothioneins: the cell rules. *BMC Biol.* **9**, 25–28 (2011)
20. Freisinger E.: Plant MTs – long neglected members of the metallothionein superfamily. *Dalton Trans.* **47**, 6663–6675 (2008)
21. Godt J., Scheidig F., Grosse-Siestrup C., Esche V., Brandenburg P., Reich A., Gronberg D.A.: The toxicity of cadmium and resulting hazards for human health. *J. Occup. Med. Toxicol.* **1**, 22 (2006)



22. Gold B., Deng H., Bryk R., Vargas D., Eliezer D., Roberts J., Jiang X., Nathan C.: Identification of a copper-binding metallothionein in pathogenic mycobacterial. *Nat. Chem. Biol.* **4**, 609–616 (2008)
23. Gupta A., Whitton B.A., Morby A.P., Huckle J.W., Robinson N.J.: Amplification and rearrangement of a prokaryotic metallothionein locus *smt* in *Synechococcus* PCC 6301 selected for tolerance to cadmium. *Proc. Biol. Sci.* **248**, 273–281 (1992)
24. Hänsch R., Mendel R.R.: Physiological functions of mineral micronutrients (Cu, Zn, Mn, Fe, Ni, Mo, B, Cl). *Curr. Opin. Plant Biol.* **12**, 259–266 (2009)
25. Higham D.R., Sadler P.J., Scawen M.D.: Cadmium-resistant *Pseudomonas putida* synthesizes novel cadmium proteins. *Science*, **225**, 1043–1046 (1984)
26. Higham D.P., Sadler P.J., Scawen M.D.: Cadmium-binding proteins in *Pseudomonas putida*: pseudothioneins. *Environ. Health Persp.* **65**, 5–11 (1986)
27. Higgins K.A., Giedroc D.: Insights into protein allostery in the CsoR/RcnR family of transcriptional repressors. *Chem. Lett.* **43**, 20–25 (2014)
28. Huckle J.W., Morby A.P., Turner J.S., Robinson N.J.: Isolation of a prokaryotic metallothionein locus and analysis of transcriptional control by trace metal ions. *Mol. Microbiol.* **7**, 177–187 (1993)
29. Koszucka A.M., Dąbrowska G.: Roślinne metalotioneiny. *Post. Biol. Kom.* **33**, 285–302 (2006)
30. Kuroda M., Hayashi H., Ohta T.: Chromosome-determined zinc-responsible operon *czt* in *Staphylococcus aureus* strain 912. *Microbiol. Immunol.* **43**, 115–125 (1999)
31. Lane B., Kajojka R., Kennedy R.: The wheat-germ E<sub>c</sub> protein is a zinc-containing metallothionein. *Biochem. Cell Biol.* **65**, 1001–1005 (1987)
32. Lane T.W., Saito M.A., George G.N., Pickering I.J., Prince R.C., Morel F.M.M.: A cadmium enzyme from a marine diatom. *Nature*, **435**, 42 (2005)
33. Leszczyszyn O.I., White C.R.J., Blindauer C.A.: The isolated Cys<sub>2</sub>His<sub>2</sub> site in E<sub>c</sub> metallothionein mediates metal-specific protein folding. *Mol. Bio. Syst.* **6**, 1592–1603 (2010)
34. Leszczyszyn O.I., Imam H.T., Blindauer C.A.: Diversity and distribution of plant metallothioneins: a review of structure, properties and functions. *Metallomics*, **5**, 1146–1169 (2013)
35. Liu T., Nakashima S., Hirose K., Shibasaka M., Katsuhara M., Ezaki B., Giedroc P.D., Kasamo K.: A novel cyanobacterial SmtB/ArsR family repressor regulates the expression of a CPX-ATPase and a metallothionein in response to both Cu(I)/Ag(I) and Zn(II)/Cd(II). *J. Biol. Chem.* **279**, 17810–17818 (2004)
36. Liu T., Nakashima S., Hirose K., Uemura Y., Shibasaka M., Katsuhara M., Kasamo K.: A metallothionein and CPx-ATPase handle heavy-metal tolerance in the filamentous cyanobacterium *Oscillatoria brevis*. *FEBS Lett.* **542**, 159–163 (2003)
37. Ma Z., Jacobsen F.E., Giedroc D.P.: Metal transporters and metal sensors: how coordination chemistry controls bacterial metal homeostasis. *Chem. Rev.* **109**, 4644–4681 (2009)
38. Maret W., Sandstead H.: Zinc requirements and the risks and benefits of zinc supplementation. *J. Trace Elem. Med. Biol.* **20**, 3–20 (2005)
39. Margoshes M., Vallee B.L.: A cadmium protein from equine kidney cortex. *J. Am. Chem. Soc.* **79**, 4813–4814 (1957)
40. Morby A.P., Turner J.S., Huckle J.W., Robinson N.J.: SmtB is a metal-dependent repressor of the cyanobacterial metallothionein gene *smtA*: identification of a Zn inhibited DNA-protein complex. *Nucl. Acids Res.* **21**, 921–925 (1993)
41. Naik M.M., Pandey A., Dubey S.K.: *Pseudomonas aeruginosa* strain WI-1 from Mandovi estuary possesses metallothionein to alleviate lead toxicity and promotes plant growth. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **79**, 129–133 (2012)
42. Olafson R.W., Abel K., Sim R.G.: Prokaryotic metallothionein: preliminary characterization of a blue-green alga heavy metal-binding protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **89**, 36–43 (1979)
43. Olafson R.W., Loya S., Sim R.G.: Physiological parameters of prokaryotic metallothionein induction. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **95**, 1495–1503 (1980)
44. Olafson R.W., McCubbin W.D., Kay C.M.: Primary- and secondary- structural analysis of a unique prokaryotic metallothionein from a *Synechococcus* sp. cyanobacterium. *Biochem. J.* **251**, 691–699 (1988)
45. Palmer C.M., Guerinot M.L.: Facing the challenges of Cu, Fe and Zn homeostasis in plants. *Nat. Chem. Biol.* **5**, 333–340 (2009)
46. Pedersen M., Larsen A., Stoltenberg M., Penkova M.: Cell death in the injured brain: Roles of metallothioneins. *Prog. Histochem. Cytochem.* **44**, 1–27 (2009)
47. Pedersen M., Larsen A., Stoltenberg M., Penkova M.: The role of metallothionein in oncogenesis and cancer prognosis. *Prog. Histochem. Cytochem.* **44**, 29–64 (2009)
48. Robinson N.J., Tommey A.M., Kuske C., Jackson P.J.: Plant metallothioneins. *Biochem. J.* **295**, 1–10 (1993)
49. Robinson N.J., Whitehall S.K., Cavet J.S.: Microbial metallothioneins. *Adv. Microb. Physiol.* **44**, 183–213 (2001)
50. Rowland J.L., Niederweis M.: Resistance mechanism of *Mycobacterium tuberculosis* against phagosomal copper overload. *Tuberculosis*, **92**, 202–210 (2012)
51. Shi J., Lindsay W.P., Huckle J.W., Morby A.P., Robinson N.J.: Cyanobacterial metallothionein gene expressed in *Escherichia coli*. Metal-binding properties of the expressed protein. *FEBS Lett.* **2–3**, 159–163 (1992)
52. Shimizu T., Hiyama T., Ikeuchi M., Inoue Y.: Nucleotide sequence of a metallothionein gene of the thermophilic cyanobacterium *Synechococcus vulcanus*. *Plant Mol. Biol.* **20**, 565–567 (1992)
53. Silver S., Phung L.T.: Bacterial heavy metal resistance: new surprises. *Annu. Rev. Microbiol.* **50**, 753–789 (1996)
54. Stepkowska I.M.: Właściwości biologiczne metalotionein i ich udział w procesach oksydoredukcyjnych w komórkach, ze szczególnym uwzględnieniem ośrodkowego układu nerwowego człowieka. *Post. Biol. Kom.* **37**, 869–885 (2010)
55. Sutherland D.E., Stillman M.J.: The “magic numbers” of metallothionein. *Metallomics*, **3**, 444–463 (2011)
56. Thelwell C., Robinson N.J., Turner-Cavet J.S.: An SmtB-like repressor from *Synechocystis* PCC 6803 regulates a zinc exporter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 10728–10733 (1998)
57. Turner J.S., Glands P.D., Samson A.C.R., Robinson N.J.: Zn<sup>2+</sup>-Sensing by the cyanobacterial metallothionein repressor SmtB: different motifs mediate metal-induced protein-DNA dissociation. *Nucl. Acids Res.* **24**, 3714–3721 (1996)
58. Turner J.S., Morby A.P., Whitton B.A., Gupta A., Robinson N.J.: Construction and characterisation of Zn<sup>2+</sup>/Cd<sup>2+</sup> hypersensitive cyanobacterial mutants lacking a functional metallothionein locus. *J. Biol. Chem.* **268**, 4494–4498 (1993)
59. Vašák M.: Advances in metallothionein structure and functions. *J. Trace Elem. Med. Biol.* **19**, 13–17 (2005)
60. Waldron K.J., Robinson N.J.: How do bacterial cells ensure that metalloproteins get the correct metal? *Nat. Rev. Microbiol.* **7**, 25–35 (2009)