

Metalo-tioneiny w procesie starzenia się mózgu i w chorobach neurozwyrodnieniowych

Metallothioneins in ageing brain and in neurodegenerative diseases

Agnieszka Kotarska

SUM na kierunku Neurobiologia, Uniwersytet Jagielloński, Kraków

Streszczenie

Stres oksydacyjny i zaburzona homeostaza metali, takich jak miedź i cynk, są czynnikami w dużym stopniu przyczyniającymi się do powstawania patologicznych zmian w układzie nerwowym osób starzejących się lub cierpiących na choroby neurozwyrodnieniowe. Metalotioneiny (MT) to małe białka bogate w cysteinę, które wiążą wolne formy tlenu oraz metale, chroniąc tym samym komórki przed uszkodzeniami. U starzejących się osób ekspresja MT w układzie nerwowym zwiększa się, natomiast w chorobach neurozwyrodnieniowych obserwuje się najczęściej spadek ekspresji izoformy MT-III, zidentyfikowanej jako czynnik hamujący wzrost neuronów (GIF, ang. growth inhibitory factor). Sugeruje się duże potencjalne możliwości wykorzystania MT w opracowywaniu terapii chorób neurozwyrodnieniowych. W pracy zebrano wyniki badań dotyczących roli tych białek w fizjologicznie starzejącym się mózgu i w przypadku niektórych chorób neurozwyrodnieniowych. *Geriatrics 2013; 7: 231-237.*

Słowa kluczowe: metalotioneiny, starzenie się, układ nerwowy, choroby neurozwyrodnieniowe

Abstract

Oxidative stress and lack of metal (mainly zinc and copper) homeostasis are responsible for most of pathological changes in ageing nervous system and in neurodegenerative diseases. Metallothioneins (MT) are small, cysteine-rich proteins which, being capable of binding both reactive oxygen species and metals, provide defense against cellular damage. Expression of MT in ageing nervous system is upregulated, while in neurodegenerative diseases researchers frequently report the downregulation of expression of MT-III – the isoform of MT identified as growth inhibitory factor (GIF). The use of MT in developing new therapies against neurodegenerative diseases is suggested. This paper summarizes the current state of knowledge regarding MT in physiologically ageing brain and in some neurodegenerative diseases. *Geriatrics 2013; 7: 231-237.*

Keywords: metallothioneins, ageing brain, nervous system, neurodegenerative diseases

Wstęp

Procesami, które przyczyniają się do upośledzenia funkcji komórek podczas starzenia się układu nerwowego, są między innymi stres oksydacyjny oraz nieprawidłowa regulacja enzymów i innych białek związanych z produkcją reaktywnych form tlenu (RFT) lub substancji, których zadaniem jest obrona przed ich szkodliwym działaniem [1]. Rodziną białek zdolnych do wiązania wolnych form tlenu, jak również metali odpowiedzialnych m.in. za prawidłowy przebieg

procesów komórkowych są metalotioneiny (MT) [2].

MT odkryte zostały w 1957 roku przez M. Margoshes i B.L. Vallee w końskiej nerce i zidentyfikowane jako białka wiążące kadm. Rozpowszechnione są one w świecie organizmów żywych i obecne u bakterii, grzybów i eukariontów. Są to małe białka bogate w cysteinę i zdolne do wiązania dwuwartościowych jonów metali, takich jak jony cynku i miedzi [2]. Ich zdolność do wiązania jonów metali, wyrażona jako zawartość jonów w jednym molu tych białek,

jest w organizmie największa zaraz po ferrytynie – białkach wiążących dwuwartościowe jony żelaza i magazynujących je w wątrobie. MT biorą też udział w ochronie komórek przed RFT [3].

Pierwsze badania na ulegających ekspresji w komórkach nerwowych MT przeprowadzono w latach 1984-1989, a na MT ulegających ekspresji w astrocytach – w latach 1990-1996. Wykazany wysoki poziom występowania MT w ośrodkowym układzie nerwowym i odkrycie swoistej dla mózgu klasy tych białek – MT-III, sugerują duże ich znaczenie w procesach fizjologicznych zachodzących w mózgu. Rola MT w ośrodkowym układzie nerwowym stała się dodatkowo przedmiotem licznych badań naukowych po tym, gdy okazało się, że MT-III może mieć udział w etiologii chorób neurodegeneracyjnych [2].

U ssaków MT dzieli się na cztery grupy, nazywane MT-I, MT-II, MT-III i MT-IV. Izoformy MT-I i MT-II, które różnią się tylko pojedynczym ujemnym ładunkiem w cząsteczce, są najbardziej rozpowszechnione i występują w różnych typach tkanek [4]. Wśród naładowanych elektrycznie form MT-I i MT-II zaobserwowano występowanie form o podobnym ładunku, ale innej strukturze. Te izoformy oznaczane są przez litery alfabetu, np. MT-Ia, a ich ilość jest różna u różnych gatunków. MT-III ulega ekspresji w mózgu i wydawała się być dla niego swoista, aczkolwiek niedawno jej obecność wykryto również w narządach rozrodczych, języku, żołądku, sercu i nerkach [5]. Z kolei ekspresja MT-IV ograniczona jest do komórek nabłonka płaskiego skóry, języka i górnej części przewodu pokarmowego [2].

Struktura metalotionein

MT to wewnątrzkomórkowe izoformy jednołańcuchowego białka, które charakteryzują się dużą zawartością aminokwasu cysteiny (około 30%) i brakiem aminokwasów aromatycznych w strukturze cząsteczki [6]. Istnieje duża homologia sekwencji aminokwasów wśród MT poszczególnych gatunków i rodzin organizmów. W MT ssaków 56% miejsc wiązania dla cząstek i jonów jest takich samych – obejmują one miejsca wszystkich 20 grup cysteinylowych oraz większość grup aminokwasów lizyny, seryny i argininy [4]. Ssacze MT składają się z 61 lub 68 aminokwasów. Zawierają one charakterystyczne dla danej grupy MT, powtarzające się, kilkuaminokwasowe fragmenty, w których reszty cysteinylowe oddzielone są od siebie jednym lub dwoma aminokwasami różnymi od cysteiny (np.

-cys-x-cys-, -cys-x-y-cys-) [2]. W związku z tym, że w sekwencji aminokwasowej MT 20 cząsteczek aminokwasu cysteiny znajduje się blisko siebie, wiązania disiarczkowe tworzą się głównie w obrębie pojedynczych cząsteczek [6].

MT-I i MT-II. Analiza struktury Cd₅Zn₂-MT-II, Cd₇-MT-II, a także Cd₇-MT-I wykazała, że białka te sfałdowane są w bardzo podobny sposób. Pojedyncze białko ma kształt dzwonu z niemal sferycznymi domenami alfa na C-końcu i beta na N-końcu. Domeny mają średnicę 15-20 Å [7]. Domena beta posiada 9 reszt cysteiny i wiąże trzy jony metali dwuwartościowych w koordynacji Me₃S₉, podczas gdy domena alfa posiada 11 reszt cysteiny i wiąże cztery jony dwuwartościowe w koordynacji Me₄S₁₁ [8]. Obie domeny mogą wiązać po 6 jonów jednowartościowych. Jony związanych metali mają koordynację tetraedryczną. Dwie domeny białka połączone są ze sobą segmentem zbudowanym z dwóch cząsteczek aminokwasu lizyny (pozycje 30. i 31. w łańcuchu aminokwasowym) [7].

MT-III. Strukturalna forma MT-III z przyłączonymi jonami metali nie została scharakteryzowana [3]. Jako białko należące do rodziny MT, wykazuje ona około 70% podobieństwo sekwencji aminokwasowej z MT-I i MT-II, włączając w to 20 grup cysteinylowych i dwie identyczne domeny. Jednak MT-III posiada kilka elementów różniących ją od MT-I i -II. Są to aminokwas treonina na pozycji piątej w sekwencji, bogaty w kwas glutaminowy heksapeptyd w pobliżu C-końca białka, a także charakterystyczny dla GIF motyw aminokwasowy (6.-9. pozycje aminokwasów w sekwencji białka) [9].

Funkcje metalotionein

MT cechuje wysokie powinowactwo do metali przejściowych, pełniących w organizmie funkcje niezbędnych pierwiastków śladowych, jak np. cynk i miedź; MT chronią także komórki przed toksycznością wywołaną przez metale ciężkie [7]. Grupy tiolowe umożliwiają MT wiązanie 7-10 g atomów metali na mol MT w dwóch domenach tych białek [4]. Kilka metali mniej rozpowszechnionych od cynku i miedzi również wiąże się z MT w warunkach *in vitro* lub *in vivo* w tkankach zwierzęcych eksponowanych na ich działanie, a są to: kadm, platyna, bizmut, srebro i rtęć [10].

Bardzo ważnym odkryciem w badaniach nad MT było wykazanie dokładnego powiązania między metabolizmem cynku i reakcjami redoks z udziałem MT. Grupa sulfonowa nadaje aktywność redoks kom-

pleksowi Zn-MT i może być utleniana i redukowana z jednoczesnym uwalnianiem i wiązaniem cynku w oksydoredukcyjnym środowisku. Uwalnianie cynku z MT sprawia, że staje się on dostępny dla innych molekuł. Redukcja utlenionej MT przywraca jej zdolność do wiązania cynku. Proces ten nazywany jest cyklem redoks z udziałem MT [11].

Z racji wysokiego potencjału redoks, MT przypisuje się zasadniczy udział w sekwestracji RFT i reaktywnych form azotu. MT cynkowa bardzo szybko reaguje z anionorodnikiem ponadtlenkowym oraz wyjątkowo toksycznym rodnikiem wodorotlenowym. Różne izoformy MT mają różne powinowactwo do wiązania się z RFT [12].

MT-I i MT-II. Te dwie ogólnoustrojowe izoformy MT traktowane są jako podstawowe i często opisywane łącznie, jako MT-I/MT-II lub ogólnie, metalotioneina -MT. W mózgu MT te ulegają ekspresji głównie w astrocytach. Uważa się, że MT-I/MT-II mogą znacząco przyczynić się do redukcji odpowiedzi zapalnej związanej z uszkodzeniem układu nerwowego, prowadząc do efektywniejszej naprawy uszkodzenia. Co interesujące, podanie tych MT dootrzewnowo również przyczyniało się do zwiększonej regeneracji układu nerwowego u szczurów, co sugeruje możliwość zewnątrzkomórkowego działania MT. Spośród trzech izoform MT obecnych w ludzkim mózgu, MT-I i -II ulegają ekspresji niemal we wszystkich regionach mózgu i rdzenia kręgowego, głównie w astrocytach. Ekspresję MT-I i -II zaobserwowano również w komórkach śródbłonna naczyń krwionośnych, opon mózgowych, ependymocytach i neuronach. Również komórki mikrogleju, makrofagi i monocyty mogą syntetyzować MT-I i -II, ale tylko, gdy znajdują się w stanie reaktywnym [12].

MT-III. Po raz pierwszy rola tej MT jako czynnika hamującego wzrost neuronów została odkryta podczas obserwacji i szacowania czasu przeżywania szczurzych neuronów korowych w hodowlach komórkowych pochodzących ze zdrowego mózgu i z mózgu szczura z objawami przypominającymi chorobę Alzheimera (AD, ang. *Alzheimer's disease*). Okazało się, że neurony pochodzące z mózgu szczura z objawami AD przeżywały w większym stopniu niż neurony z mózgu zdrowego szczura, sugerując brak występowania MT-III [13]. MT-III może działać toksycznie na komórki, lecz dokładny mechanizm jej toksyczności nie jest znany. Ta właściwość potwierdzona została w badaniach *in vivo*, w których myszy z nadekspresją MT-III umierały

na skutek atrofii trzustki, podczas gdy porównywalny poziom ekspresji MT-I nie wywoływał podobnych efektów [14]. W przeciwieństwie do MT-I i MT-II, ekspresji MT-III nie indukują metale ciężkie, co wskazuje na inny sposób regulowania tej izoformy MT [15]. MT-III i MT-I reagują odmiennie na brak cynku w kulturach komórkowych. W takich warunkach obniżeniu ulega poziom MT-I, natomiast nie ma to wpływu na poziom MT-III [16]. ZnMT-III, ale nie ZnMT-I jest zdolna do hamowania wzrostu neuronów pobranych od osobników z objawami AD, jednakże w komórkach pobranych z mózgow prawidłowych zarówno ZnMT-I, jak i ZnMT-III stymulują wzrost neuronów [17]. Najwięcej trzeciej formy MT występuje w korze nowej, ciele migdałowatym, hipokampie, a także w opuszcze węchowej. Regiony mózgu o wysokim stężeniu MT-III charakteryzują się także wysoką zawartością cynku. Uważa się, że MT-III jest białkiem odpowiedzialnym za specyficzną sekwestrację i dystrybucję jonów cynku w zakończeniach neuronów magazynujących ten pierwiastek w pęcherzykach synaptycznych [2]. Wykazano również, że poziom jej syntezy zwiększa się w astrocytach zlokalizowanych w pobliżu miejsca, w którym mechanicznie uszkodzono fragment ośrodkowego układu nerwowego [18].

Metalotioneiny w starzejącym się mózgu

W ciągu życia osobnika wraz z wiekiem w jego astrocytach zwiększa się ekspresja MT-I i -II. W ośrodkowym układzie nerwowym ekspresja MT-I i MT-II w okresie rozwoju płodowego pozostaje na stosunkowo niskim poziomie i wzrasta znacząco po narodzinach, jak opisano to na podstawie obserwacji rozwijającego się mózgu owiec [19]. Zwiększanie się poziomu tych MT w mysim mózgu ma miejsce w ciągu całego rozwoju osobniczego [20]. W mózгах starych szczurów MT-I i -II zlokalizowano w korze mózgowej i w pobliżu naczyń krwionośnych, gdzie obserwowano wyraźne zmiany morfologiczne towarzyszące zaawansowanemu wiekowi [21]. Podobnie, wykazano, że ekspresja mRNA MT-III, jak i samego białka była podwyższona u starych szczurów. Obserwowano zwiększoną liczbę komórek MT-III-immunopozytywnych zlokalizowanych w korze czołowej, ciemieniowej i gruszkowatej, w podwzgórzu, ciele migdałowatym i zakręcie zębatym hipokampa [22]. MT wpływają na przebieg procesu starzenia się przez zmniejszenie odpowiedzi zapalnej i apoptozy komórek, działając jako czynnik neurotroficzny w ośrodkowym układzie nerwowym [23].

Metalotioneiny w chorobach neurozwyrodnieniowych

Metalotioneiny w chorobie Alzheimera.

Regulacja ekspresji MT-III w mózgach osób chorych na AD jest specyficzna – ekspresja ta zmniejsza się w astrocytach zlokalizowanych w warstwach od 2 do 6 kory mózgowej [13], podczas gdy ekspresja MT-I i -II jest zwiększona [24]. Jednakże na zmniejszenie poziomu ekspresji MT-III u chorych wskazują wyniki tylko niektórych eksperymentów, albowiem inne badania nie wykazały zmian w regulacji ekspresji tego białka. Sugeruje się, że te sprzeczne wyniki mogą być spowodowane brakiem standaryzacji procedur badawczych [10]. Zmiany patologiczne w AD – płytki starcze, splątki neurofibrylarne (NFT, ang. *neurofibrillary tangles*) i utrata komórek nerwowych nie pojawiają się globalnie, ale tylko w niektórych regionach i warstwach kory mózgowej, a rozmiary tych patologii zależą także od klinicznego stadium choroby [25]. NFT i wynikająca z ich pojawienia się degeneracja najpierw zachodzi w hipokampie i dotyczy zwłaszcza neuronów piramidalnych pola CA1, a także warstwy drugiej kory śródmózgowej. Na tym etapie nie obserwuje się żadnych zmian w funkcjonowaniu poznawczym czy też znaczącego ubytku w liczbie neuronów. W kolejnych stadiach klinicznych choroby NFT rozprzestrzeniają się w strukturach układu limbicznego i korze nowej. Największy ubytek neuronów obserwuje się w hipokampie i dolnej korze skroniowej [10]. W badaniach mających na celu oszacowanie ilości białka lub mRNA kodującego MT-III nie przykładano dostatecznej wagi do tego specyficznego wzoru degeneracji mózgu w AD. Badania immunohistochemiczne wykazały, że zmniejszony poziom MT-III odzwierciedla w znacznym stopniu wzór zanikania immunoreaktywności MT-III w astrocytach zewnętrznych warstw istoty szarej w mózgach osób chorych na AD [26]. W tych samych mózgach, w głębszych warstwach istoty szarej wciąż obserwowano dużą immunoreaktywność MT-III w astrocytach. Zmiany w ilości białka MT-III i mRNA kodującego tę MT mogą również odzwierciedlać kliniczne stadium choroby [27]. Dokładny mechanizm wywołujący ten spadek ekspresji MT-III nie jest do końca poznany. Badania *in vitro* pozwoliły ustalić, że poziom mRNA kodującego MT-III, jak i poziom samego białka jest zależny od stadium cyklu komórkowego, a nie od interakcji komórek nerwowych i glejowych w tkance mózgowej. Badania wykazały, że cytokiny i czynniki wzrostu nie wywołują spadku

ekspresji MT-III w kulturach komórek astrocytów [26]. Pomimo tego, że w obecności płytek starczych ekspresja MT-III spada, białko beta-amyloidu nie wywołuje spadku ekspresji tej MT [10].

Metalotioneiny w chorobie Parkinsona.

W chorobie Parkinsona (PD, ang. *Parkinson's disease*) zarejestrowano w szczurzych astrocytach spadek ekspresji MT-III [26]. W liniach komórek glejowych dopamina zwiększa generację RFT, co koreluje z podwyższoną ekspresją mRNA kodującego MT-III [28]. Zmiany w ekspresji MT-III były badane w prądkowiu i istocie czarnej u szczurów, u których wywołano parkinsonizm podając 6-hydroksydopaminę (6-OHDA) do pęczka przyśrodkowego przodomózgowia [29]. Doświadczenie to miało na celu ustalenie, jakie zmiany zachodzą w ekspresji tej MT po podaniu lewodopy – biologicznie aktywnej postaci dopaminy używanej w leczeniu objawów PD. U szczurów kontrolnych podanie lewodopy/karbidopy znacząco zwiększyło ekspresję MT-III w prądkowiu w 24 godziny po podaniu. Indukcja MT-III w mózgu zdrowym jest reakcją obronną na stres oksydacyjny wywołany przez lewodopę. Natomiast u szczurów, którym podano wcześniej 6-OHDA, podanie lewodopy nie wywołało podobnych efektów. Wynik tego eksperymentu świadczy o tym, że w mózgu zwierząt z wywołanym parkinsonizmem lewodopa być może nie jest w stanie spowodować zwiększenia ekspresji MT-III. Tym samym wychwytywanie wolnych rodników, w którym uczestniczy MT-III może być zredukowane, co w konsekwencji nasila postępowanie PD [10]. Działanie MT-I/-II w przypadku neurotoksyczności wywołanej podawaniem 6-OHDA zbadano podając tę substancję dokomorowo. Utrata neuronów dopaminergicznych istoty czarnej po podaniu 6-OHDA była większa u myszy z nokautem MT-I/-II, co świadczy o neuroprotektynym działaniu tych MT prawdopodobnie przez ochronę przed uszkodzającym działaniem RFT [30]. Interwencja farmakologiczna prowadząca do indukcji ekspresji MT w mysich modelach PD umożliwiała syntezę koenzymu Q, aktywację kompleksu-1 w mitochondriach oraz zahamowanie produkcji cytokin prozapalnych, zaangażowanych w etiopatogenezę m.in. także PD [31].

Metalotioneiny w chorobie Huntingtona.

W chorobie Huntingtona (HD, ang. *Huntington's disease*) zarówno w mysich modelach choroby, jak i u chorych na tę chorobę ludzi obserwuje się aku-

mulację żelaza i miedzi w ośrodkowym układzie nerwowym. Oba te metale mogą pośrednio wywoływać patologiczne zmiany strukturalne obserwowane w mózgach chorych [32]. Opublikowano badania, które wskazują na duże znaczenie miedzi w HD [33]. Kliochnol – chelator miedzi i żelaza, znacząco opóźnia pojawianie się zmian neuropatologicznych w mysim modelu HD [34]. N-koniec białka huntingtyny wiąże miedź w warunkach *in vitro* i *in vivo*. Wykazano, że huntingtyna redukuje ilość miedzi na drugim stopniu utlenienia [32]. Badania ekspresji genów w komórkach pobranych od chorych ludzi i w mysich modelach choroby wykazały, że wiążące miedź białka, w tym MT-III, ulegały ekspresji na wyższym poziomie niż miało to miejsce w grupach kontrolnych. Może to być odpowiedzią obronną na podwyższone stężenie RFT, jonów miedzi, jak i zaburzenie homeostazy miedzi. Sugeruje się, że występowanie w tkankach chorych na HD miedzi sprzyja zwiększeniu agregacji poliglutaminy (poliQ), a nadekspresja MT redukuje nadmierną agregację i toksyczność poliQ i chroni przed wpływem zmutowanej huntingtyny, co wykazano w badaniach *in vivo* i *in vitro* [33].

Metalotioneiny w stwardnieniu zanikowym bocznym.

W jednym z badań dotyczących MT i stwardnienia zanikowego bocznego (ALS, ang. *amyotrophic lateral sclerosis*) skrzyżowano myszy będące modelem ALS (mutacja genu kodującego dysmutazę ponadtlenkową (SOD, ang. *superoxide dismutase*) – G93A SOD1) z myszami z nokautem dla MT-I/MT-II lub MT-III. Tak uzyskane osobniki potomne przeżywały krócej i wykazywały szybszy postęp choroby [35]. Wykazano też, że myszy z rodzinną formą ALS (z mutacją w genie kodującym SOD) i zmniejszoną ekspresją MT-I/-II wcześniej niż myszy kontrolne przejawiają kliniczne cechy choroby i wcześniej umierają [36]. Analiza rdzeni kręgowych ludzi ze sporadyczną formą ALS wykazała, że w motoneuronach u tych osób zmieniony był poziom ekspresji sześciu genów. Jednym z nich był gen dla MT-III, którego ekspresja była w rdzeniach

kręgowych zmniejszona [37]. Jednak inne badania nie potwierdziły tej tendencji, a wręcz wykazano zwiększenie ekspresji MT-III [38]. Możliwe, że różnice te wynikały z faktu, iż tkankę do badań pobrano z różnych regionów rdzenia, a także na różnych etapach rozwoju choroby [10]. Ekspresja tej MT jest również wyższa w mysim modelu ALS (G93A SOD1) [39]. Implantacja wektora adenowirusowego przenoszącego gen kodujący MT-III zapobiegała utracie twarzowych neuronów ruchowych po awulsji nerwu twarzowego u szczurów [40]. Wskazuje to na możliwość wykorzystania potencjału terapeutycznego MT-III w leczeniu degeneracji lub uszkodzeń neuronów ruchowych [10].

Podsumowanie

Nie ulega wątpliwości, że dokładniejsze poznanie funkcji i mechanizmów działania MT może w dużym stopniu przysłużyć się do opracowania metod ochrony komórek ośrodkowego układu nerwowego przed skutkami procesu starzenia się i do osłabienia uszkadzającego wpływu patologicznych procesów związanych z chorobami neurodegeneracyjnymi.

Podziękowania

Serdeczne podziękowania kieruję ku Pani Prof. PAN dr hab. Grażynie Niewiadomskiej z Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN w Warszawie za inspirowanie autorki i sprawowanie nad nią opieki podczas tworzenia pracy licencjackiej, na podstawie której powstał niniejszy artykuł.

Konflikt interesów / Conflict of interest

Brak/None

Adres do korespondencji:

✉ Agnieszka Kotarska
ul. Kolejowa 8; 42-130 Wręczyca Wielka
☎ (+48 22) 627 39 86
✉ aga.kotarska90@gmail.com

Piśmiennictwo

1. Dittmann J, Fung SJ, Vickers JC, et al. Metallothionein biology in the ageing and neurodegenerative brain. *Neurotox Res* 2004;7(1-2): 87-93.
2. Aschner M, Cherian GM, Klaassen CD, et al. Metallothioneins in brain – the role in physiology and pathology. *Toxicol Appl Pharmacol* 1997;142(2): 229-42.
3. Ghazi IE, Martin BL, Armitage IM. Metallothionein-3 is a component of a multiprotein complex in the mouse brain. *Exp Biol Med (Maywood)* 2006;231(9):1500-6.
4. Kägi JH. Overview of metallothionein. *Methods Enzymol* 1991;205:613-26.
5. Miles AT, Hawksworth GM, Beattie JH, et al. Induction, regulation, degradation and biological significance of mammalian metallothioneins. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 2000;35(1):35-70.
6. Kröncke KD, Fehsel K, Schmidt T, et al. Nitric oxide destroys zinc-sulfur clusters inducing zinc release from metallothionein and inhibition of the zinc finger-type yeast transcription activator LAC9. *Biochem Biophys Res Commun* 1994;200(2):1105-10.
7. Vašák M. Advances in metallothionein structure and functions. *J Trace Elem Med Biol* 2005;19(1):13-7.
8. Zanger K, Oz G, Otvos JD, et al. Three-dimensional solution structure of mouse [Cd7]-metallothionein-1 by homonuclear and heteronuclear NMR spectroscopy. *Protein Sci* 1999;8(12):2630-8.
9. Ding ZC, Ni FY, Huang ZX. Neuronal growth-inhibitory factor (metallothionein-3): structure–function relationships. *FEBS J* 2010;277(14): 2912-20.
10. Hozumi I, Asanuma M, Yamada M, et al. Metallothioneins and neurodegenerative diseases. *J Health Science* 2004;50(4):323-31.
11. Kang YJ. Metallothionein redox cycle and function. *Exp Biol Med (Maywood)* 2006;231(9):1459-67.
12. Hidalgo J, Penkowa M, Giralt M, et al. Metallothionein expression and oxidative stress in the brain: *Methods Enzymol* 2002;348:238-49.
13. Uchida Y, Takio K, Titani K, et al. The growth inhibitory factor that is deficient in the Alzheimer's disease brain is a 68 amino acid metallothionein-like protein. *Neuron* 1991;7(2):337-47.
14. Bremner I, Morrison JN, Wood AM, et al. Effects of changes in dietary zinc, copper and selenium supply and of endotoxin administration on metallothionein I concentrations in blood cells and urine in the rat. *J Nutr* 1987;117(9):1595-602.
15. Belloso E, Henandez J, Giralt M, et al. Effect of stress on mouse and rat brain metallothionein I and III mRNA levels. *Neuroendocrinology* 1996; 64(6):430-9.
16. Palmiter RD. Constitutive expression of metallothionein-III (MT-III), but not MT-I, inhibits growth when cells become zinc deficient. *Toxicol Appl Pharmacol* 1995;135(1):139-46.
17. Sewell AK, Jensen LT, Erickson JC, et al. Bioactivity of metallothionein-III correlates with its novel b-domain sequence rather than metal binding properties. *Biochemistry* 1995;34(14):4740--7.
18. Carrasco J, Giralt M, Molinero A, et al. Metallothionein (MT)-III: generation of polyclonal antibodies, comparison with MT-I+II in the freeze lesioned rat brain and in a bioassay with astrocytes, and analysis of Alzheimer's disease brains. *J Neurotrauma* 1999;16(11):1115-129.
19. Chung RS, Holloway AF, Eckhardt BL, et al. Sheep have an unusual variant of the brain-specific metallothionein, metallothionein-III. *Biochem J* 2002;365(Pt 1):323-8.
20. Natale JE, Knight JB, Cheng Y, et al. Metallothionein I and II mitigate age-dependent secondary brain injury. *J Neurosci Res* 2004;78(3):303-14.
21. Kojima S, Shimada A, Morita T, et al. Localization of metallothioneins-I & -II and -III in the brain of aged dog. *J Vet Med Sci* 1999;61(4):343-9.
22. Miyazaki I, Asanuma M, Higashi Y, et al. Age-related changes in expression of metallothionein-III in rat brain. *Neurosci Res* 2002;43(4):323-33.
23. Inoue K, Takano H, Shimada A, et al. Metallothionein as an anti-inflammatory mediator. *Mediators Inflamm* 2009;101659.
24. Duguid JR, Bohmont CW, Liu N, et al. Changes in brain gene expression shared by scrapie and Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989;86(18):7260-4.
25. Braak H, Braak E. Neuropathological staging of Alzheimer – related changes. *Acta Neuropathol* 1991;82(4):239-59.
26. Uchida Y. Regulation of growth inhibitory factor expression by epidermal growth factor and interleukin 1-beta in cultured rat astrocytes. *J Neurochem* 1999;73(5):1945-53.
27. Kawashima T, Doh-ura K, Torisu M, et al. Differential expression of metallothioneins in human prion diseases. *Dement Geriatr Cogn Disord* 2000;11(5): 251-62.
28. Sogawa CA, Miyazaki I, Sogawa N, et al. Antioxidants protect against dopamine-induced metallothionein-III (GIF) mRNA expression in mouse glial cell line (VR-2g). *Brain Res* 2000;853(2):310-6.
29. Miyazaki I, Sogawa CA, Asanuma M, et al. Expression of metallothionein-III mRNA and its regulation by levodopa in the basal ganglia of hemi-parkinsonian rats. *Neurosci Lett* 2000; 293(1):65-8.
30. Asanuma M, Miyazaki I, Higashi Y, et al. Aggravation of 6-hydroksydopamine-induced dopaminergic lesions in metallothionein-I and -II knock-out mouse brain. *Neurosci Lett* 2002;327(1):61-5.
31. Ebadi M, Brown-Borg H, El Refaey H, et al. Metallothionein-mediated neuroprotection in genetically engineered mouse models of Parkinson's disease. *Brain Res Mol Brain Res* 2005;134(1):67-75.
32. Fox JH, Kama JA, Lieberman G, et al. Mechanisms of copper ion mediated Huntington's disease progression. *PLoS ONE* 2007;2(3):e334.

33. Hands SL, Mason R, Sajjad MU, et al. Metallothioneins and copper metabolism are candidate therapeutic targets in Huntington's disease. *Biochem Soc Trans* 2010;38(2):552-8.
34. Nguyen T, Hamby A, Massa SM. Clioquinol down-regulates mutant huntingtin expression in vitro and mitigates pathology in a Huntington's disease mouse model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102(33):11840-5.
35. Puttapparthi K, Gitomer WL, Krishnan U, et al. Disease progression in a transgenic model of familial amyotrophic lateral sclerosis is dependent on both neuronal and non-neuronal zinc binding proteins. *J Neurosci* 2002;15;22(20):8790-6.
36. Nagano S, Satoh M, Sumi H, et al. Reduction of metallothioneins promotes the disease expression of familial amyotrophic lateral sclerosis mice in a dose dependent manner. *Eur J Neurosci* 2001;13(7):1363-70.
37. Ishigaki S, Niwa J, Ando Y, et al. Differentially expressed genes in sporadic amyotrophic lateral sclerosis spinal cords screening by molecular indexing and subsequent cDNA microarray analysis. *FEBS Lett* 2002;531(2):354-8.
38. Blaauwgeers HGT, Chand MA, Berg FM, et al. Expression of different metallothionein messenger ribonucleic acids in motor cortex, spinal cord and liver from patients with amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Sci* 1996;142(1-2):39-44.
39. Olsen MK, Roberds SL, Ellerbrock BR, et al. Disease mechanisms revealed by transcription profiling in SOD1-G93A transgenic mouse spinal cord. *Ann Neurol* 2001;50(6):730-40.
40. Sakamoto T, Kawazoe Y, Uchida Y, et al. Growth inhibitory factor prevents degeneration of injured adult rat motoneurons. *Neuroreport* 2003;14(17):2147-51.