

Umwelttoxikologie

Umwelttoxikologie im Spannungsfeld zwischen Grundlagenforschung und Anwendung: Das Beispiel der Metallothioneine als Biomarker

Reinhard Dallinger

Institut für Zoologie, Universität Innsbruck, Technikerstraße 25, A-6020 Innsbruck (reinhard.dallinger@uibk.ac.at)

DOI: <http://dx.doi.org/10.1065/uwsf2007.03.177>

Bitte zitieren Sie diesen Beitrag wie folgt: Dallinger R (2007): Umwelttoxikologie im Spannungsfeld zwischen Grundlagenforschung und Anwendung: Das Beispiel der Metallothioneine als Biomarker. UWSF – Z Umweltchem Ökotox 19, Sonderheft Nr. 1, 35–42

Zusammenfassung

Hintergrund. Eines der zentralen Anliegen der Umwelttoxikologie ist die Entwicklung und Verfeinerung von Methoden und Ansätzen, die geeignet sind, die bestehende Artenvielfalt vor der Einwirkung toxischer Substanzen zu schützen. Eine immanente Schwierigkeit, der wir dabei auf Schritt und Tritt begegnen, ist die Tatsache, dass sich definierte toxische Effekte, die auf sub-individueller, individueller und artspezifischer Ebene beobachtbar sind, auf dem Niveau von Populationen oder Lebensgemeinschaften viel unspezifischer manifestieren. Daher sind wir bei der Interpretation solcher Veränderungen auf Hinweise angewiesen, die uns zu den basalen Mechanismen toxikologischer Wechselwirkungen führen. Nur dann, wenn wir diese Mechanismen auch verstehen, werden wir in der Lage sein, Arten, Populationen und Lebensgemeinschaften vor Schadstoff-Einwirkungen bestmöglich zu schützen. Ein gutes Beispiel für diesen Denkansatz sind jene toxikologischen Wechselwirkungen und Effekte auf verschiedenen Ebenen der biologischen Organisation, die mit der Expression von Metallothioneinen (MTs) einhergehen. MTs sind bekanntlich multifunktionale Stressproteine, denen eine wichtige Aufgabe bei der Bindung, Entgiftung und Speicherung von metallischen Spurenelementen im allgemeinen zugeschrieben wird, deren Aufgaben im einzelnen jedoch intra- und interspezifisch in einem breiten Funktions-Spektrum variieren und weit über eine bloße Metall-Entgiftung hinausreichen können. Der Einsatz von MTs als Biomarker für Metallexpositionen ist vor diesem Hintergrund daher zwar ein brauchbarer und vielversprechender, jedoch keinesfalls trivialer Ansatz.

Bisherige Ergebnisse: Spezifität der MT-Antwort auf Proteinebene. Die Erfassung und Quantifizierung von MTs als Antwort auf Metallstress ist in all jenen Fällen und bei Arten angebracht, in denen die Induktion von MTs aufgrund von Metallbelastung gegenüber anderen Induktionsursachen beträchtlich überwiegt. Als Induktor unter den Metallen kommt gelegentlich nur eine Metallspezies (z.B. Cd^{2+}) in Frage, sodass in einem solchen Fall die MT-Induktion als spezifischer Biomarker für die Belastung eines Habitats mit dem entsprechenden Metall herangezogen werden kann. Dies ist beispielsweise bei MTs bestimmter Helicidenarten der Fall. Bei den meisten Tierarten, wie z.B. bei *Drosophila melanogaster* oder bei zahlreichen Fischarten, kommen mehrere Metallspezies (Cd^{2+} , Cu^+ , Zn^{2+}) als MT-Induktoren in Frage, und dementsprechend komplexer ist die Induktions-Antwort. Zu beachten ist ferner, dass sich unterschiedliche MT-Isoformen in ihrer Induzierbarkeit durch verschiedene Metall-

Species stark voneinander unterscheiden können. Komplizierter wird die Lage, wenn MTs nicht nur durch Metalle, sondern in signifikantem Ausmaß auch (oder ausschließlich) durch intrinsische Faktoren (z.B. die Gonaden-Reifung) oder durch andere, extrinsische Stressfaktoren induziert werden. Als solche kommen z.B. Schadstoffe in Frage, die oxidativen Stress auslösen. Da die Induktion in derartigen Fällen über komplizierte Induktionskaskaden ausgelöst wird, kann sich die entsprechende Induktionsantwort auch in ihrem zeitlichen Muster beträchtlich von einer Metall-bedingten Induktion unterscheiden.

Molekulare Regulation der MT-Induktion. Völlig neue Aspekte ergeben sich dank molekularer Methoden und einer molekularen Betrachtungsweise der MT-Induktion. So zeigt sich, dass manche MT-Isoformen (z.B. bei der Weinbergschnecke) auf molekularer Ebene um mehr als das Hundertfache stärker induziert werden können als auf Proteinebene. Dabei kann z.B. die Transkriptionsrate anhand der Akkumulation von MT-mRNA mittels Real-Time-Detection-PCR quantitativ erfasst werden. Eine detaillierte Analyse zeigt darüber hinaus, dass manche MT-Gene eine Fülle von Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren zahlreicher anderer (also nicht nur Metallothionein-spezifischer) Stressproteine, sowie für Transkriptions-Enhancer, -Inhibitoren und -Silencer beherbergen. Dies ist ein Hinweis darauf, dass die MT-Expression *in vivo* einer fein regulierbaren Abstimmung mit zahlreichen intrinsischen und extrinsischen Modulatoren, Induktoren und Stressoren unterliegt ('fine tuning' und 'cross talk').

Neue Ansätze für die Entwicklung von Biomarkern. In den meisten bisherigen Anwendungen konnte der Anstieg (oder der Abfall) der MT-Konzentration einer Tierart nach Metall-Exposition oder bei Einwirkung anderer Stressoren als Biomarker für diese Exposition herangezogen und quantitativ erfasst werden. Dabei blieb es mitunter fraglich, inwieweit die so beobachtete Biomarker-Antwort nicht durch andere, physiologische oder extrinsische Faktoren (sogenannte 'confounding factors') mit beeinflusst bzw. moduliert wird. Die Verlagerung des Ansatzes auf die molekulare Ebene eröffnet allerdings nunmehr neue und vielversprechende Perspektiven zur Erfassung und Entwicklung zusätzlicher und wahrscheinlich viel empfindlicherer Biomarker für die Stress-Exposition, als sie bisher auf Protein-Ebene zur Verfügung standen.

Schlussfolgerungen. Eine der Konsequenzen dieser Betrachtungen ist sicherlich auch die Einsicht, dass biologische Grundlagenforschung und angewandte Umwelttoxikologie sinnvoller Weise nicht voneinander zu trennen sind. Das Bemühen um ein tieferes Verständnis toxikologischer Wechselwirkungen auf individueller und subindividueller Ebene ist für den angewandten Artenschutz auf Dauer nicht nur befruchtend, sondern unentbehrlich.

Schlagwörter: Cadmium; cross-talk; extrinsische Stressoren; fine-tuning; Gen-Expression; intrinsische Stressoren; Kupfer; Metallothionein-Gen; Metallothionein-Induktion; oxidativer Stress; Promotor-Region; Stress-Antwort; Transkriptionsfaktoren; Zink

Abstract**Ecotoxicology Between Basic Research and Application: Using Metallothioneins (MTs) as Biomarkers for Environmental Pollution**

Background. Ecotoxicology is devoted, besides other scopes, to develop and improve methods and approaches which aim at saving existent species from adverse effects of toxic chemicals. An inherent experience in this concern is the fact that distinct toxicological effects which can be observed at the sub-individual, individual and species-specific levels are manifested in a rather unspecific way at the population and community levels. The interpretation of adverse effects of pollution at these higher levels of biological hierarchy has to rely on those basic mechanisms of toxicological interactions which can only be observed at the individual and sub-individual levels of biological organization. Hence, understanding mechanisms of toxicity is just a precondition of successfully saving species, populations and communities from adverse toxicological effects. Nice examples for this kind of view are provided by the toxicological interactions and effects that are linked to the expression of metallothioneins (MTs). MTs are multifunctional stress proteins which play an important role in binding, detoxifying and storing certain metallic trace elements, and which exhibit, apart from metal-related tasks, a wide range of additional functions. Using MTs as biomarkers for environmental pollution seems therefore to be a promising, yet not very trivial, task.

Specificity of the MT response at the protein level. Assessment and quantification of MTs as a means of detection of metal stress may be promising in those cases and in species, where MT induction due to metal exposure strongly prevails over other kinds of induction. Rarely, one single metal species (such as Cd^{2+}) can act as an MT inducer. If so, MT induction may serve as a specific biomarker for exposure of a single species or a habitat to the respective metal. This is true, for example, for MTs of certain helioid pulmonate snails. In most animals, however, such as in *Drosophila melanogaster* or in many fish species, several metals (Cd^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{+}) are able to induce MT expression, thus leading to correspondingly complex response patterns of MT induction. In addition, different MT isoforms within one animal species may differ with respect to their metal inducibility. Even more complicated are those response patterns where MT induction can occur, apart from metals, by intrinsic physiological processes (such as gonadal development), or by extrinsic environmental stress factors such as chemicals causing oxidative stress. In such instances, MT induction can be promoted through complicated signal cascades, leading to induction response patterns which may differ in their time course from a simple metal-based induction.

Molecular regulation of MT induction. New insight into the mechanisms of MT induction comes from a molecular approach. In fact, at the molecular level, some MT isoforms (such as those of the Roman snail) seem to be induced up to hundred times more efficiently compared to MT induction at the protein level. In such cases we may measure MT transcription rates by quantifying MT mRNA concentrations by means of real time detection PCR. A detailed structural analysis shows that some MT genes contain a variety of DNA binding sites for transcription factors which are involved, apart from metal induction, in stress-related transcriptional regulation, by acting as enhancers, inhibitors and silencers of MT induction. This indicates that MT expression *in vivo* may be controlled by complex interactions of extrinsic and intrinsic transcriptional modulators, giving rise to fine-tuned patterns of induction ('fine tuning' and 'cross talk').

New approaches for the development of novel biomarkers. Up to date, MT response patterns to stressors have mainly been detected by quantifying the increase or decrease of MT concentration as a biomarker for metal pollution or exposure to other stressors. One of the problems inherent in such an approach may be that sometimes it remains questionable, whether or not the observed biomarker response might have been influenced or modulated, apart from specific stressors, by additional physiological or environmental (so-called 'confounding') factors and stimuli. In this concern, the increasing significance of a molecular perspective to MT induction will be promising, allowing to establish additional and perhaps, more sensitive MT-related biomarkers, compared to those used so far at the protein level.

Conclusion. One of the important messages of such considerations will be the understanding that applied ecotoxicology needs, in order to be persistent, a strong link to fundamental research. This means that our attempts towards conservation and saving of species from pollution effects will only be successful, if we include in our efforts the focus at the basic mechanisms of toxic interactions which occur at the individual and sub-individual levels.

Keywords: Cadmium; copper; cross talk; extrinsic stressors; fine-tuning; gene expression; intrinsic stressors; metallothionein gene; metallothionein induction; oxidative stress; promoter region; stress response; transcription factor; zinc

1 Einleitung und Problemstellung

MTs sind niedermolekulare Proteine mit einer spezifischen Affinität zur gewissen Metallionen (z.B. Zn^{2+} , Cd^{2+} , Cu^{+}), die dank der reichlich vorhandenen Cysteinreste fest an das Protein gebunden werden, wobei die Metallbindungs-Konstanten je nach gebundenem Metall in der Größenordnung von 10^{13} bis $> 10^{17}$ liegen und in der Reihenfolge $Zn^{2+} < Cd^{2+} < Cu^{+}$, Ag^{+} , Hg^{2+} ansteigen (Kägi und Kojima 1987, Kägi 1993). Dabei bilden sich zwischen den Schwefelatomen der Cysteinreste und den Metallionen stabile Komplexverbindungen in Form sogenannter Metall-Thiolat-Cluster, die in den meisten Fällen in zwei separaten Proteindomänen lokalisiert sind (Vasak 2005, Meloni et al. 2006). MTs bilden eine Protein-Superfamilie (Binz und Kägi 1999) und wurden bisher bei Vertretern fast aller Organismenreiche (mit Ausnahme der Eubacteria) nachgewiesen (Capdevila et al. 2005). Die primäre Funktion der MTs hängt offenbar mit dem Stoffwechsel der an diese Proteine gebundenen metallischen Übergangselemente zusammen (siehe oben), deren intrazelluläre Homöostase und Entgiftung von den MTs reguliert bzw. kontrolliert wird (Roesijadi 1994, Dallinger et al. 2000, Egli et al. 2006a). Darüber hinaus haben sich MTs im Lauf der Evolution zahlreiche zusätzliche Funktionen angeeignet, die zumeist im Zusammenhang mit der zellulären Stress-Bewältigung stehen (Beattie et al. 2005, Fu und Miao 2006). So können MTs beispielsweise auch beim Schutz vor oxidativem Stress (Yoshida et al. 2005, Baird et al. 2006), der Immun-Abwehr (Sugiura et al. 2004, Yin et al. 2005), dem Ablauf der Apoptose, der Genregulation (Kanekiyo et al. 2002), sowie bei der Chemo-Resistenz gegenüber organischen Schadstoffen eine wesentliche Rolle spielen (Kägi 1993, Theocharis et al. 2003). Daher werden MTs allgemein auch als multifunktionale Proteine bezeichnet (Dallinger 1996, Dallinger et al. 2000, Theocharis et al. 2003). Im Einzelfall variiert das Spektrum der MT-Funktionen in artspezifischer Weise, und mitunter können verschiedene MT-Isoformen innerhalb einer Art unterschiedliche Funktionen ausüben (Dallinger et al. 1997, Egli et al. 2006b). Eine der wichtigsten Eigenschaften vieler MTs ist die Induzierbarkeit ihrer Synthese durch Einwirkung von Metallen und / oder anderen Stressfaktoren. Durchwegs die stärksten MT-Induktoren sind zumeist die Übergangsmetall-Ionen Cd^{2+} , Cu^{+} und Zn^{2+} , wobei verschiedene MT-Isoformen auf die metallischen Induktoren unterschiedlich stark ansprechen (Egli et al. 2006b). Die Metallinduktion beruht auf einer Signalkaskade, die bisher nicht zur Gänze aufgeklärt werden konnte (Otsuka 2004). Eine wesentliche Rolle spielt dabei der Transkriptions-

faktor MTF-1 (Metal Transcription Factor 1), der bei Metall-einwirkung an die sogenannten Metal Responsive Elements (MREs) in der Promotorregion des MT-Gens bindet und dadurch dessen Transkription initiiert (Saydam et al. 2002, Balamurugan et al. 2004). Abgesehen von Metallen können auch andere chemische Substanzen (Bi et al. 2004, Bobillier-Chaumont et al. 2006), organische Schadstoffe (Mosleh et al. 2004, Mosleh et al. 2005, Fletcher et al. 2005), Östrogene (Werner et al. 2003), sowie Stress und physiologische Stimuli (Cai et al. 1999, Rubenstrunk et al. 2003, Baird et al. 2006, Fu und Miao 2006) zu einer Induktion der MT-Synthese führen (Kägi 1991), wobei sich die jeweiligen Signalkaskaden von jener der Metall-Induktion fallweise unterscheiden können (Karin et al. 1984).

Insbesondere die Induzierbarkeit der MT-Synthese durch Umwelt-relevante, toxische Metalle und Spurenelemente (Cadmium, Kupfer, Quecksilber) gab wiederholt Anlass zur Entwicklung von Assays für die Quantifizierung von MTs als Biomarker für das Monitoring von Metallbelastungen in der Umwelt (Roesijadi 1994, Dallinger et al. 2004a, Dallinger et al. 2004b, Dallinger et al. 2004c, Amiard et al. 2006). Andererseits wurden auch Arbeiten publiziert, aus denen unmissverständlich hervorgeht, wie sehr die MT-Induktion bei manchen Arten durch zusätzliche physiologische und Umwelt-Faktoren oder durch eine Kombination von Stressoren beeinflusst und moduliert werden kann (Kammenga et al. 2000, Serafim und Bebianno 2001, Werner et al. 2003, Wlostowski et al. 2004), sodass die Aussagekraft von Monitoringprogrammen auf Basis von MT-Biomarkern immer wieder diskutiert und in Frage gestellt wurde (Perceval et al. 2004, Gorbi et al. 2005, Ivankovic et al. 2005, Dragun et al. 2006).

2 Spezifität der Metallothionein-Antwort auf Protein-Ebene: Ein frommer Wunsch ?

Der übliche Ansatz bei der Verwendung von MTs als Biomarker beruht bzw. beruhte bisher auf der Quantifizierung eines Konzentrations-bezogenen MT-Parameters (wie z.B. der MT-Konzentration, der Intensität eines MT-Signals durch histochemische Färbung oder immunologische Fällung, der Höhe eines MT-Peaks mittels Chromatographie, etc.) nach Exposition an einen Stressor (zumeist ein Metall) oder unter dem Einfluss einer Belastungs-Situation (z.B. im Freiland). Vom methodischen Standpunkt aus können dabei verschiedene Ansätze unterschieden werden. Bei den direkten Ansätzen wird die MT-Konzentration direkt gemessen, wobei hier häufig immunologische (RIA, ELISA) (Chu et al. 2006, Butcher et al. 2003) oder spektrometrische Methoden (UV-Absorption nach Aufreinigung mittels Chromatographie) (Viarengo et al. 2000), sowie Western Blot und Proteinfärbungen (nach Elektrophorese) zum Einsatz kommen (Sumner und Klein 1991). Bei den indirekten Methoden wird die MT-Konzentration aus dem molaren Metallanteil oder dem Gehalt an funktionellen Gruppen (z.B. an SH-Gruppen) des MT-Proteins ermittelt (Zorita et al. 2005). Dabei müssen natürlich die Stöchiometrie der Metallbindung, sowie die Anzahl der funktionellen Gruppen eines MT-Moleküls bekannt sein. Zu den indirekten Methoden der MT-Quantifizierung gehören z.B. die sogenannten Metallsättigungs-Verfahren (Engl. 'Metal saturation methods'). Sie beruhen

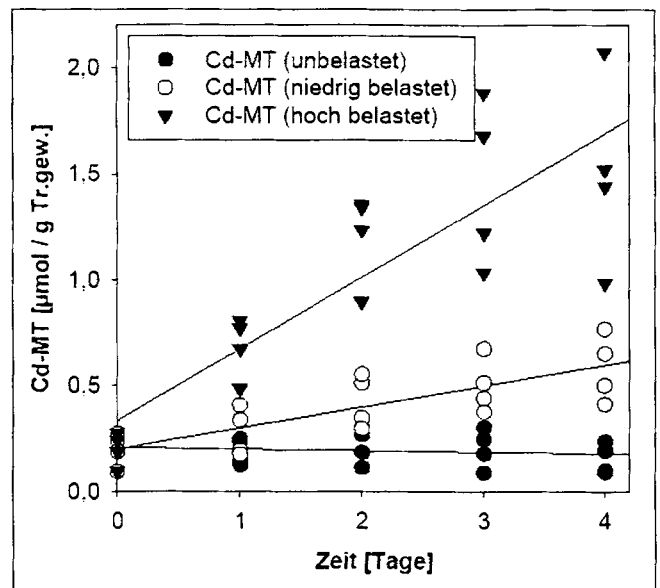


Abb. 1: Zeitlicher Verlauf (Abszisse) der Konzentration von Cd-MT (Ordinate) in der Mitteldarmdrüse der Weinbergschnecke (*Helix pomatia*) nach Fütterung mit unbelastetem ($0,04 \mu\text{mol Cd/g Tr.gew.}$), niedrig belastetem ($0,31 \mu\text{mol Cd/g Tr.gew.}$) und hoch belastetem ($2,3 \mu\text{mol Cd/g Tr.gew.}$) Salat (*Lactuca sativa*)

im wesentlichen darauf, dass die zu quantifizierenden MT-Moleküle im Assay-Ansatz mit einer bestimmten Metallspecies (z.B. Cd^{2+} , Hg^{2+} , Cu^+ , Ag^+) abgesättigt werden (Shaw-Allen et al. 2003, Dallinger et al. 2004a). Alle Schwefel-Bindungsstellen am Proteinmolekül werden dadurch mit dem entsprechenden Metall besetzt, wobei allenfalls noch vorhandene andere Metallspecies mit einer geringeren Bindungsaffinität (siehe oben) vom Assay-Metall verdrängt werden. Nach Entfernung der nicht an MT gebundenen Metallfraktionen kann anschließend die MT-Konzentration aus der Konzentration des Assay-Metalls berechnet werden.

Wie immer auch die MT-Konzentration ermittelt wird: Erwünscht ist dabei, dass es einen reproduzierbaren, quantitativen Zusammenhang zwischen dem MT-Signal und einer Belastung gibt, und dass die gemessene Antwort möglichst sensitiv und spezifisch auf den Belastungsfaktor reagiert (Abb. 1).

In der Realität zeigt sich jedoch, dass die Reproduzierbarkeit der Signal-Intensität nicht immer gegeben ist oder zumindest großen Schwankungen unterliegt, wobei letztere im Freiland besonders ausgeprägt sein können. Darüber hinaus ist die MT-Antwort oft wenig spezifisch. Mehrere Gründe können dafür verantwortlich gemacht werden. Zunächst gibt es dafür methodische Ursachen, die – je nach Assay – zu systematischen Fehlern führen können. Dabei muss man sich vergegenwärtigen, dass aufgrund der Praktikierbarkeit eines Biomarker-Assays die MT-Bestimmung zumeist in einem möglichst einfachen, zeitsparenden und ökonomisch vertretbaren Verfahren erfolgen soll, sodass man sich eine langwierige und kostenintensive MT-Aufreinigung ersparen kann. Am einfachsten sind Quantifizierungsverfahren, die direkt an einer gereinigten Zellsuspension oder einem Gewebe-Homogenat ansetzen. Der Nachteil solcher Assays besteht darin,

dass es nicht immer gelingt, alle Faktoren auszuschalten, die mit dem spezifischen MT-Signal interferieren. So können z.B. bei Metallsättigungs-Verfahren zusätzliche Komplexbildner (Proteine, Kohlehydrate, Glutathion), die sich nicht immer vollständig entfernen lassen, einen Teil des Assay-Metalls binden und dadurch das Signal verfälschen (Dallinger et al. 2004a). Außerdem besitzen die meisten Organismenarten verschiedene MT-Isoformen, sodass das gemessene Signal bestenfalls einen Summenparameter für möglicherweise unterschiedlich spezifisch reagierende MT-Fraktionen darstellt (Lacorn et al. 2001, Geret und Cosson 2002). Eine weitere Fehler-Ursache liegt in der Natur der Metallothionein-Antwort selber. Wie bereits erwähnt (siehe oben), kann die MT-Induktion je nach Art des betrachteten Organismus und je nach Rahmenbedingungen in der Umwelt durch zusätzliche, oft auch unbekannte, Faktoren moduliert und verfälscht werden. Dies kann insbesondere dann ein Problem sein, wenn beispielsweise die MT-Antwort von Populationen aus verschiedenen und unterschiedlich kontaminierten Standorten im Freiland miteinander verglichen werden soll (Ivankovic et al. 2005, Schiedek et al. 2006). Warum es angesichts derartiger Schwierigkeiten dennoch in vielen Fällen sinnvoll ist, Metallothioneine als Biomarker zu verwenden (anstatt beispielsweise einfach nur Metalle zu analysieren), hat mehrere Gründe. Zum ersten ist die Induktion von MT ein adäquateres Signal für eine durch einen Schadstoff (ein Metall) ausgelöste physiologischen Stress-Antwort, als dies eine Metallkonzentration in einem Gewebe je sein kann. Zweitens erlaubt die Quantifizierung von Cd-MT als Biomarker dessen Vernetzung mit anderen Parametern der Stress-Antwort, wobei deren Aussagekraft oftmals erst in einer integrativen Zusammenschau über mehrere Ebenen hinweg an Bedeutung gewinnt (Dallinger et al. 2004 c). Nicht zuletzt deswegen wird von vielen Autoren darauf hingewiesen, dass der Einsatz von MTs als Biomarker im Verband mit zusätzlichen Biomarkern (sogenannten 'Biomarker-Batterien') zu meist sinnvoller und oft notwendig ist, um Freilandbefunde besser interpretieren zu können (Kammenga et al. 2000, Weeks et al. 2004).

3 Qualität vor Quantität: Von der Notwendigkeit der Grundlagenforschung für die angewandte Umwelttoxikologie

Manche der oben geschilderten methodischen Nachteile lassen sich nur schwer ausräumen, da sie die notwendige Folge der Vereinfachung von Rahmenbedingungen sind, die einen Biomarker-Assay erst praktikabel machen. Um so notwendiger ist es angesichts dessen, mögliche Fehlerquellen auszuschalten, die auf einen unüberlegten Einsatz von MTs in Biomarker-Studien zurückzuführen sind. Diese Gefahr besteht dann, wenn wesentliche physiologische, biochemische und molekulare Rahmenbedingungen der MT-Expression in einer gewählten Tierart nicht beachtet werden oder unzureichend bekannt sind. Denn trotz der oftmals verallgemeinernden Zuschreibung von generellen Eigenschaften (wie z.B. der Metall-Induktion) an diese Proteinfamilie zeigt sich, dass MTs im konkreten Fall Art-spezifische Adaptationen erfahren haben, sodass deren biologische Funktion und deren

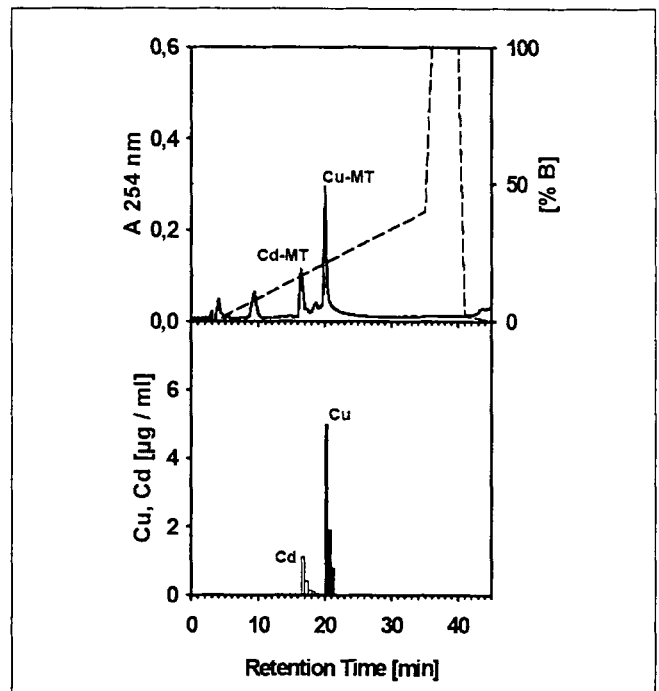


Abb. 2: HPLC-Chromatogramm der beiden MT-Isoformen (Cd-MT und Cu-MT) in der Mitteldarmdrüse der Weinbergschnecke (*Helix pomatia*) mit Darstellung der Absorption bei 254 nm und des Elutionsgradienten (obere Graphik), sowie des Metallgehaltes (Cd und Cu) in den beiden eigenständigen und voneinander getrennten Peaks (modifiziert nach Dallinger et al. 2005)

Antwort auf bestimmte Stressoren nur im Kontext mit der Anpassung der jeweils betrachteten Tierart an ihre Umwelt zu verstehen sind.

So ist der Einsatz von MTs als Biomarker für eine Metall-Exposition etwa zulässig, wenn in der ausgewählten Tierart die Induktion von MT aufgrund von Metallbelastungen gegenüber anderen Induktionsursachen beträchtlich überwiegt, sodass die Gefahr einer Verfälschung des MT-Signals durch andere Faktoren vernachlässigbar gering erscheint. Gelegentlich wird in einer Art die MT-Expression sogar ausschließlich durch eine einzige Metallspezies (z.B. Cd²⁺) induziert. In einem derartigen Fall kann die MT-Induktion als spezifischer Biomarker für die Belastung des jeweiligen Habitats mit dem entsprechenden Metall herangezogen werden. Bei der Weinbergschnecke (*Helix pomatia*) trifft dies zu, da diese als eine der wenigen bisher bekannten Tierarten zwei MT-Isoformen mit klar zueinander abgegrenzten Strukturen, Metallbindungs-Affinitäten und Metall-spezifischen Funktionen besitzt (Dallinger et al. 1997). Dabei spielt eine dieser Isoformen als typisches Cd-MT eine wesentliche Rolle bei der Cd-Entgiftung, während die zweite Isoform für den Kupferstoffwechsel zuständig ist (Dallinger et al. 2005) (Abb. 2).

Bei den meisten Tierarten, wie z.B. bei der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster*, kommen mehrere Metallspezies (Cd²⁺, Cu⁺, Zn²⁺) als MT-Induktoren in Frage (Egli et al. 2006b). Außerdem stellen die meisten bisher bekannten MT-Isoformen in Bezug auf ihre Metall-Präferenz Mischformen dar, die jeweils mehrere Metallspezies gleichzeitig binden kön-

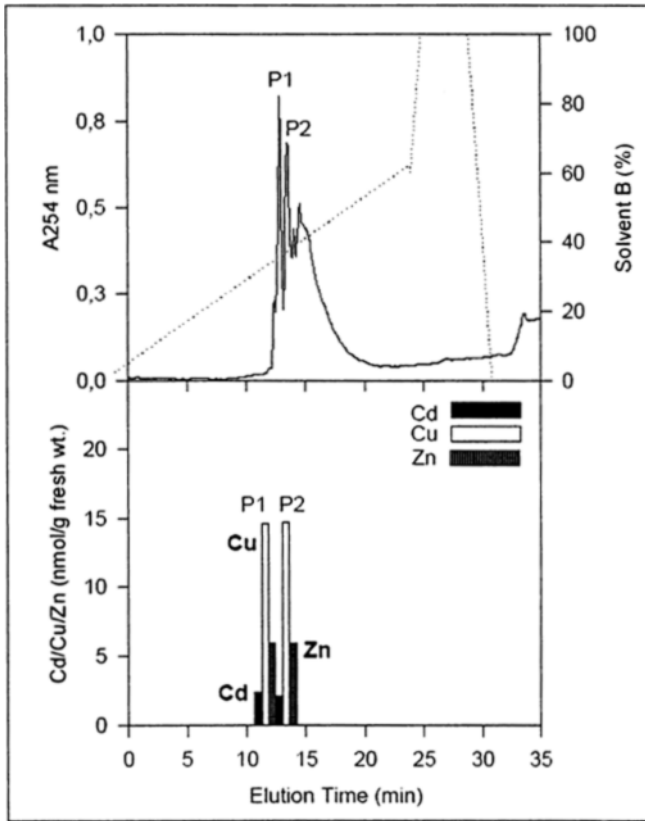


Abb. 3: HPLC-Chromatogramm zweier MT-Isoformen (P1 und P2) in der Leber des Seesaiblings (*Salvelinus alpinus*) aus einem hochalpinen See mit Darstellung der Absorption bei 254 nm und des Elutionsgradienten (obere Graphik), sowie des Metallgehaltes (Cd, Cu, Zn) in den beiden Isoformen, die im Unterschied zu den MTs der Weinbergschnecke (siehe **Abb. 2**) als Metall-Mischformen auftreten (modifiziert nach Dallinger et al. 1996)

nen (Dallinger et al. 1996), indem unterschiedliche Metall-species auf die zwei Domänen des Proteins ungleichmäßig verteilt werden (Li et al. 1996, Duncan et al. 2006) (**Abb. 3**).

In jüngerer Zeit wurden auch Arbeiten veröffentlicht, in denen sich die Biomarker-Funktion der MTs nicht auf eine bloße Protein-Quantifizierung erstreckt. So konnte etwa bei der Weinbergschnecke gezeigt werden, dass der Grad der stöchiometrischen Sättigung (bzw. der Über-Sättigung) von MT mit Cd²⁺ mit akut toxischen Effekten (Apoptose, Mortalität) korreliert werden kann, die auf eine Überlastung des Entgiftungssystems 'Cd-MT' hinweisen (Chabicovsky et al. 2004). Wenn dies zutrifft, dann wäre damit der Beweis erbracht, dass MTs in gewissen Fällen auch als Biomarker für den Effekt von toxischen Metallen eingesetzt werden könnten.

Vielfach werden MTs jedoch nicht nur durch Metalle, sondern in signifikantem Ausmaß auch (oder ausschließlich) durch intrinsische physiologische Faktoren (z.B. die Gonaden-Reifung), extrinsische Umweltbedingungen (z.B. Jahreszeit, Temperatur) und Stressfaktoren induziert. Als solche kommen neben zahlreichen physikalischen Stressoren und toxischen Substanzen z.B. auch Schadstoffe in Frage, die oxidativen Stress verursachen (siehe oben). Da die MT-Expression in derartigen Fällen über komplizierte Induktionskaskaden ausgelöst wird, kann sich die entsprechende Induktionsantwort auch in ihrem zeitlichen Muster beträcht-

lich von einer Metall-bedingten Induktion unterscheiden. Prinzipiell ist es denkbar, die MT-Induktion auch in solchen Fällen als Biomarker für nicht-metallische Stressauslöser einzusetzen, wobei sich dann aber eher molekulare Ansätze für die Erfassung der Stressantwort eignen (siehe unten). In jedem Fall aber muss der Einsatz von MTs als Biomarker stets vor einem ausreichend fundierten Hintergrundwissen über die physiologischen und biochemischen Zusammenhänge der artspezifischen MT-Expression erfolgen (Dallinger et al. 2004a).

4 Molekulare Regulation der MT-Induktion: Neue Ansätze für die Entwicklung hoch empfindlicher Biomarker

Eine über die Protein-Ebene hinausführende molekulare Betrachtungsweise gewährt nicht nur tiefgehende Erkenntnisse zur Regulation der MT-Induktion, sondern öffnet auch neue Wege für die Entwicklung von Biomarkern. Denn im Unterschied zu Protein-biochemischen Methoden erlauben molekulare Ansätze dank der komplementären Natur der aus Nukleotidketten zusammengesetzten Erbinformations-Träger DNA und RNA viel spezifischere und präzisere Einblicke in die Vorgänge rund um die Induktion und Expression von Proteinen. So zeigt sich beispielsweise, dass manche MT-Isoformen (z.B. bei der Weinbergschnecke *Helix pomatia*) auf transkriptioneller Ebene um mehr als das Hundertfache stärker induziert werden können als auf Proteinebene. Dabei kann z.B. die Transkriptionsrate anhand der Akkumulation von MT-mRNA mittels Real-Time-Detection-PCR quantitativ erfasst werden (**Abb. 4**). Die Gründe für derartig unterschiedliche Induktionsraten zwischen Transkriptions- und Translationsebene sind nur zum Teil bekannt (Greenbaum et al. 2003). Vor allem Proteine, die in die Regulation der zellulären Stressbewältigung involviert sind (was für das Cd-MT der Weinbergschnecke zutrifft), scheinen in der Regel auf transkriptioneller Ebene stärker induziert zu

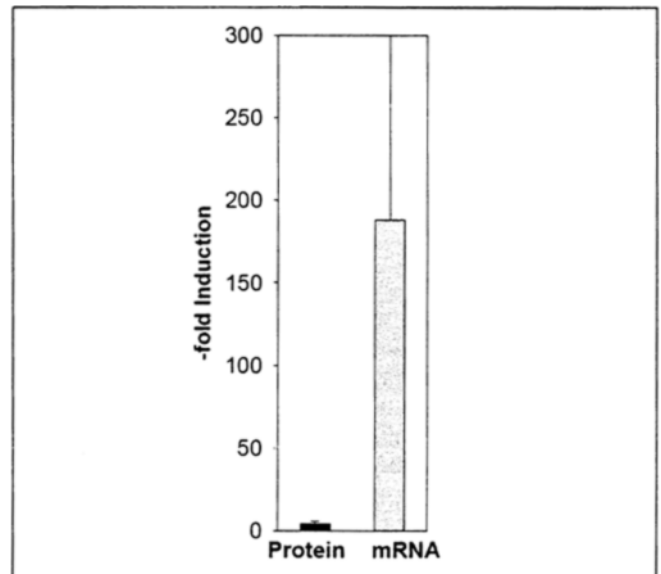


Abb. 4: Anstieg der Induktion von Cd-MT ('-fold induction') in der Mitteldarmdrüse der Weinbergschnecke (*Helix pomatia*) nach Cd-Belastung (verglichen mit unbelasteten Tieren) auf Protein-Ebene ('Protein') und auf transkriptioneller Ebene ('mRNA')

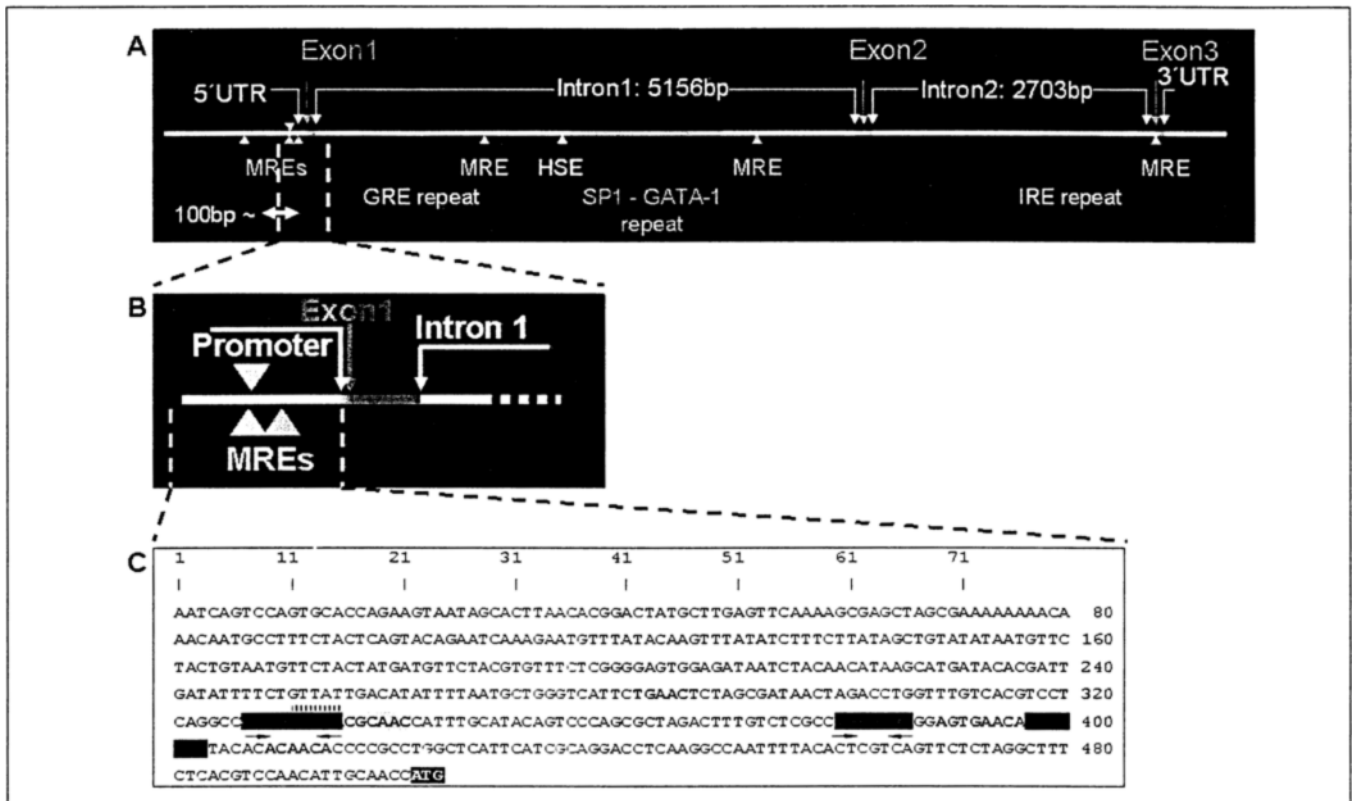


Abb. 5: Struktur des Cd-MT-Gens der Weinbergschnecke (*Helix pomatia*). **A:** Exon-Intron-Struktur mit Darstellung der 5'-untranslated region (5'UTR) in der Promotor-Region, sowie den Exons 1–3 und den Introns 1–2. Die beiden Introns enthalten regulatorische Repeat-Kassetten von Bindungsstellen für nukleare Transkriptionsfaktoren (Intron 1: SP1 – GATA), sowie für Stress-modulierende Transkriptionsfaktoren im Zusammenhang mit der Stressbewältigung und Immunabwehr (Intron 1: GRE; Intron 2: IRE). Außerdem finden sich über das ganze Gen verteilt, insbesondere aber in der Promotorregion, zahlreiche Bindungsstellen für weitere Stress-regulatorische Transkriptionsfaktoren (z.B. MREs, Metal Responsive Elements; GREs, Glucocorticoid Responsive Elements; HSE, Heat Shock Responsive Elements; IREs, Interferon Responsive Elements). **B:** Struktur der proximale Promotorregion mit Darstellung der DNA-Bindungsstellen (MREs, Metal Responsive Elements) für die Bindung des Transkriptionsfaktors MTF-I (Metal Transcription Factor I), dessen Andocken an die DNA die Transkription des Cd-MT-Gens nach Metall-Induktion initiiert. **C:** Detail der Sequenz der proximalen Promotorregion mit zahlreichen Bindungsstellen für Stress-regulatorische Transkriptionsfaktoren (in verschiedenen Grautönen), die neben den MREs (siehe oben) auch GREs (Glucocorticoid Responsive Elements), XREs (Xenobiotic Responsive Elements) und ILRs (Interleukin Responsive Elements) beherbergen

werden als auf translationeller Ebene (Hack und López 2004). Mit anderen Worten: für solche Proteine ist der Anstieg der mRNA-Konzentration bei Stress-Induktion zumeist sehr viel stärker ausgeprägt als der Anstieg der beobachteten Protein-Konzentrationen. Der Vorteil dieser Beobachtung für die angewandte Umwelttoxikologie liegt darin, dass damit viel empfindlichere und möglicherweise auch spezifischere Biomarker für die Stressantwort eines Organismus entwickelt werden können, als dies bisher auf Protein-Ebene der Fall war.

Eine detaillierte Analyse der Genstruktur zeigt darüber hinaus, dass manche MT-Gene eine Fülle von Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren zahlreicher anderer (also nicht nur Metallothionein-spezifischer) Stressproteine, sowie für Transkriptions-Enhancer, -Inhibitoren und -Modulatoren beherbergen. Dies ist ein Hinweis darauf, dass die MT-Expression *in vivo* einer fein regulierbaren Abstimmung mit zahlreichen intrinsischen und extrinsischen Modulatoren, Induktoren und Stressoren unterliegt ('fine tuning' und 'cross talk'). Das erklärt letztlich auch, warum viele MT-Gene nicht nur durch gewisse Metalle, sondern zusätzlich auch durch zahlreiche andere Noxen, Stressoren und Umwelteinflüsse induziert werden können (siehe oben). So ist beispielsweise das

Cd-MT-Gen der Weinbergschnecke (*Helix pomatia*) mit einer Länge von 10.017 bp nicht nur das bisher größte bekannte MT-Gen quer durch alle Organismenreiche; es enthält darüber hinaus in seinen beiden Introns lange Kassetten-artige Repeat-Strukturen von DNA-Bindungsstellen für nukleare und Stress-modulatorische Transkriptionsfaktoren (Abb. 5A). Die Promotorregion (Abb. 5B) enthält erwartungsgemäß mehrere Erkennungssequenzen (sogenannte MREs, Metal Responsive Elements) für die Bindung des Transkriptionsfaktors MTF-I (Metal Transcription Factor I), dessen Andocken an die entsprechende Promotorregion bei Metallstress die Transkription des Cd-MT-Gens auslöst. Darüber hinaus aber zeigt sich, dass die proximale Promotorregion des Cd-MT-Gens noch weitere Bindungsstellen für Stress-regulatorische Transkriptionsfaktoren enthält (Abb. 5C), deren Aktivität im Zusammenhang mit physiologischen, Immunrelevanten und Umwelt-bezogenen Stressauslösern steht.

Diese Komplexität von Stress-bezogenen Erkennungssequenzen im Cd-MT-Gen der Weinbergschnecke (aber natürlich auch anderer MT-Gene) ist einer der Schlüssel für ein tiefergehendes Verständnis der vielfältigen Induktions-Mechanismen von MT-Genen bei Stressbelastung überhaupt und geht weit über eine bloß Metall-bezogene Stressantwort hinaus.

Gleichzeitig öffnet diese Vielfalt und Komplexität, die einer experimentellen Überprüfung natürlich zugänglich ist (etwa durch Einsatz von unmutierten und mutierten Reportergen-Konstrukten), den Weg hin zur Entwicklung Stress-spezifischer und hoch empfindlicher molekularer Biomarker. Dies gilt nicht nur für die MT-Gene der Weinbergschnecke.

5 Schlussfolgerungen

Die angewandte Umwelttoxikologie steht oftmals unter Druck und Erfolgszwang von Seiten der Öffentlichkeit und potentieller Auftraggeber. Es erweist sich jedoch immer wieder als trügerisch, zugunsten eines vermeintlich schnellen Erfolges auf die Mühen (und Freuden!) eingehender und detaillierter Grundlagenforschung zu verzichten. Vielleicht kann das Beispiel der Weinbergschnecke und ihres scheinbar einfachen, in Wirklichkeit jedoch hoch-komplexen MT-Systems dazu beitragen, dass sich diese Einsicht festigt. Das Bemühen um ein tieferes Verständnis toxikologischer Wechselwirkungen ist für den angewandten Artenschutz auf Dauer nicht nur befruchtend, sondern unentbehrlich.

Literatur

- Amiard JC, Amiard-Triquet C, Barka S, Pellerin J, Rainbow PS (2006): Metallothionein in aquatic invertebrates: Their role in metal detoxification and their use as biomarkers. *Aquat Toxicol* 76 (2) 160–202
- Balamurugan K, Egli D, Selvaraj A, Zhang B, Georgiev O, Schaffner W (2004): Metal-responsive transcription factor (MTF-1) and heavy metal stress response in *Drosophila* and mammalian cells: A functional comparison. *Biol Chem* 385 (7) 597–603
- Baird SK, Kurz T, Brunk UT (2006): Metallothionein protects against oxidative stress-induced lysosomal destabilization. *Biochem J* 394, 275–283
- Beattie JH, Owen HL, Wallace SM, Arthur JR, Kwun IS, Hawksworth GM, Wallace HM (2005): Metallothionein overexpression and resistance to toxic stress. *Toxicol Lett* 157 (1) 69–78
- Bi Y, Palmiter RD, Wood KM, Ma Q (2004): Induction of metallothionein by phenolic antioxidants requires metal-activated transcription factor 1 (MTF-1) and zinc. *Biochem J* 380 (Pt 3) 695–703
- Binz PA, Kägi JHR (1999): Metallothionein: molecular evolution and classification. *Metallothionein IV*. Birkhäuser Verlag, Basel
- Bobillier-Chaumont S, Maupoil V, Berthelot A (2006): Metallothionein induction in the liver, kidney, heart and aorta of cadmium and isoproterenol treated rats. *J Appl Toxicol* 26 (1) 47–55
- Butcher H, Kennette W, Collins O, Demoor J, Koropatnick J (2003): A sensitive time-resolved fluorescent immunoassay for metallothionein protein. *J Immunol Methods* 272 (1) 247–256
- Cai L, Satoh M, Tohyama C, Cherian MG (1999): Metallothionein in radiation exposure: its induction and protective role (Review). *Toxicol* 132, 85–98
- Capdevila M, Domènech J, Pagani A, Tio L, Villarreal L, Atrian S (2005): Zn- and Cd-Metallothionein recombinant species from the most diverse Phyla may contain sulfide (S²⁻) ligands. *Angw Chem Int Ed* 44, 4618–4622
- Chabicoovsky M, Klepal W, Dallinger R (2004): Mechanisms of cadmium toxicity in terrestrial pulmonates: programmed cell death and metallothionein overload. *Environ Toxicol Chem* 23 (3) 648–655
- Chu MM, Guo ZQ, Muto N, Itoh N, Tanaka K, Ren HW (2006): Development of ELISA for metallothionein-II allows determination of heavy metal pollution of fresh water. *Front Biosci* 11, 2113–2122
- Dallinger R (1996): Metallothionein research in terrestrial invertebrates: Synopsis and perspectives. *Comp Biochem Physiol* 113C (2) 125–133
- Dallinger R, Egg M, Köck G, Hofer R (1996): The role of metallothionein in cadmium accumulation of Arctic char (*Salvelinus alpinus*) from high alpine lakes. *Aquat Toxicol* 38, 47–66
- Dallinger R, Berger B, Hunziker PE, Kägi JHR (1997): Metallothionein in snail Cd and Cu metabolism. *Nature (London)* 388 (6639) 237–238
- Dallinger R, Berger B, Gruber C, Stürzenbaum S (2000): Metallothioneins in Terrestrial Invertebrates: Structural Aspects, Biological Significance, and Implications for their Use as Biomarkers. *Cell Mol Biol* 46 (2) 331–346
- Dallinger R, Chabicoovsky M, Berger B (2004a): Isoform-specific quantification of metallothionein in the terrestrial gastropod *Helix pomatia* L. I. Molecular, biochemical, and methodical background. *Environ Toxicol Chem* 23 (4) 890–901
- Dallinger R, Chabicoovsky M, Lagg B, Schipflinger R, Weirich HG, Berger B (2004b): Isoform-specific quantification of metallothionein in the terrestrial gastropod *Helix pomatia* L. II. A differential biomarker approach under laboratory and field conditions. *Environ Toxicol Chem* 23 (4) 902–910
- Dallinger R, Lagg B, Egg M, Schipflinger R, Chabicoovsky M (2004c): Cd accumulation and Cd-Metallothionein as a biomarker in *Cepaea hortensis* (Helicidae, Pulmonata) from laboratory exposure and metal-polluted habitats. *Ecotoxicology* 13 (8) 757–772
- Dallinger R, Chabicoovsky M, Hödl E, Prem C, Hunziker P, Manzl C (2005): Copper in *Helix pomatia* (Gastropoda) is regulated by one single cell type: differently responsive metal pools in rhogocytes. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 289, 1185–1195
- Dragun Z, Raspor B, Erk M, Ivankovic D, Pavicic J (2006): The influence of the biometric parameters on metallothionein and metal level in the heat-treated cytosol of the whole soft tissues of transplanted mussels. *Environ Monitor Assess* 114 (1–3) 49–64
- Duncan KE, Ngu TT, Chan J, Salgado MT, Merrifield ME, Stillman MJ (2006): Peptide folding, metal-binding mechanisms, and binding site structures in metallothioneins. *Exp Biol Med* (Maywood) 231 (9) 1488–1499
- Egli D, Yepiskoposyan H, Selvaraj A, Balamurugan K, Rajaram R, Simons A, Multhaup G, Mettler S, Varadanyan A, Georgiev O, Schaffner W (2006a): A family knockout of all four *Drosophila metallothioneins* reveals a central role in copper homeostasis and detoxification. *Mol Cell Biol* 26 (6) 2286–2296
- Egli D, Domènech J, Selvaraj A, Balamurugan K, Hua H, Capdevila M, Georgiev O, Schaffner W, Atrian S (2006b): The four members of the *Drosophila* metallothionein family exhibit distinct yet overlapping roles in heavy metal homeostasis and detoxification. *Genes to Cells* 11, 647–658
- Fletcher N, Wahlstrom D, Lundberg R, Nilsson CB, Nilsson KC, Stockling K, Hellmold H, Hakansson H (2005): 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) alters the mRNA expression of critical genes associated with cholesterol metabolism, bile acid biosynthesis, and bile transport in rat liver: a microarray study. *Toxicol Appl Pharmacol* 207 (1) 1–24
- Fu C, Miao W (2006): Cloning and characterization of a new multi-stress inducible metallothionein gene in *Tetrahymena pyriformis*. *Protist* 157 (2) 193–203
- Geret F, Cosson RP (2002): Induction of specific isoforms of metallothionein in mussel tissues after exposure to cadmium or mercury. *Arch Environ Contam Toxicol* 42 (1) 36–42

- Corbi S, Baldini C, Regoli F (2005): Seasonal variability of metallothioneins, cytochrome P450, bile metabolites and oxyradical metabolism in the European eel *Anguilla anguilla* L. (Anguillidae) and striped mullet *Mugil cephalus* L. (Mugilidae). *Arch Environ Contam Toxicol* 49 (1) 62–70
- Greenbaum D, Colangelo C, Williams K, Gerstein M (2003): Comparing protein abundance and mRNA expression levels on a genomic scale. *Gen Biol* 4 (9) 117
- Hack CJ, López JA (2004): An exploration of some factors affecting the correlation of mRNA and proteomic data. In: López JA, Benfenati E, Dubitzky W (eds), *Proceedings of the KELSI Symposium*, Milan, Italy, November 25–26. Springer, pp 9–19
- Ivankovic D, Pavicic J, Erk M, Filipovic-Marijic V, Raspor B. (2005): Evaluation of the *Mytilus galloprovincialis* Lam. digestive gland metallothionein as a biomarker in a long-term field study: Seasonal and spatial variability. *Mar Pollut Bull* 50 (11) 1303–1313
- Kägi JHR (1991): Overview of Metallothionein. *Methods in Enzymology* Vol 205, 613–626
- Kägi JHR (1993): Evolution, structure and chemical activity of class I metallothioneins: An overview. In: Suzuki KT, Imura N, Kimura M (eds), *Metallothionein III*. Birkhäuser Verlag, Basel (Switzerland), pp 29–55
- Kägi JHR, Kojima Y (1987): Chemistry and biochemistry of metallothionein. In: Kägi JHR, Kojima Y (eds), *Metallothionein II*. Birkhäuser Verlag, Basel, Switzerland, pp 25–61
- Kammenga JE, Dallinger R, Donker MH, Köhler HR, Simonsen V, Triebkorn R, Weeks JM (2000): Biomarkers in terrestrial invertebrates: Potential and Limitations for Ecotoxicological Soil Risk Assessment. *Rev Environ Contam Toxicol* 164, 93–147
- Kanekiyo M, Itoh N, Kawasaki A, Matsuda K, Nakanishi T, Tanaka K (2002): Metallothionein is required for zinc-induced expression of the macrophage colony stimulating factor gene. *J Cell Biochem* 86 (1) 145–153
- Karin M, Haslinger A, Holtgreve H, Richards RI, Krauter P, Westphal HM, Beato M (1984): Characterization of DNA sequences through which cadmium and glucocorticoid hormones induce human metallothionein-IIA gene. *Nature (London)* 308, 513–519
- Lacorn M, Lahrssen A, Rotzoll N, Simat TJ, Steinhart H (2001): Quantification of metallothionein isoforms in fish liver and its implication for biomonitoring. *Environ Toxicol Chem* 20 (1) 140–145
- Meloni G, Zovo K, Kazantseva J, Palumaa P, Vasak M (2006): Organization and assembly of metal-thiolate clusters in epithelium-specific metallothionein-4. *J Biol Chem* 281 (21) 14588–14595
- Mosleh YY, Paris-Palacios S, Arnoult F, Couderchet M, Biagianti-Risbourg S, Vernet G (2004): Metallothionein induction in aquatic oligochaete *Tubifex tubifex* exposed to herbicide isoproturon. *Environ Toxicol* 19 (1) 88–93
- Mosleh YY, Paris-Palacios S, Couderchet M, Biagianti-Risbourg S, Vernet G (2005): Metallothionein induction, antioxidative responses, glycogen and growth changes in *Tubifex tubifex* (Oligochaeta) exposed to the fungicide, fenhexamid. *Environ Pollut* 135 (1) 73–82
- Otsuka F (2004): Transcriptional regulation of the Metallothionein Genes. *J Hlth Sci* 50 (4) 332–335
- Perceval O, Couillard Y, Pinel-Alloul B, Giguere A, Campbell PG (2004): Meal-induced stress in bivalves living along a gradient of Cd contamination: Relating sub-cellular metal distribution to population-level responses. *Aquat Toxcol* 69 (4) 327–345
- Roesijadi G (1994): Metallothionein induction as a measure of response to metal exposure in aquatic animals. *Environ Health Perspect* 102 (Suppl 12) 91–95
- Rubenstrunk A, Orsini C, Mahfoudi A, Scherman D (2003): Transcriptional activation of the metallothionein I gene by electric pulses in vivo: basis for the development of a new gene switch system. *J Gene Med* 5 (9) 773–783
- Saydam N, Adams TK, Steiner F, Schaffner W, Freedman JH (2002): Regulation of metallothionein transcription by the metal-responsive transcription factor MTF-1. *J Biol Chem* 277 (23) 20438–20445
- Schiedek D, Broeg K, Basiene J, Lehtonen KK, Gercken J, Pfeifer S, Vuontisjarvi H, Vuorinen PJ, Dedonyte V, Koehler A, Balk L, Schneider R (2006): Biomarker responses as indications of contaminant effects in blue mussel (*Mytilus edulis*) and female eelpout (*Zoarces viviparus*) from the southwestern Baltic Sea. *Mar Pollut Bull* 53 (8–9) 387–405
- Shaw-Allen P, Elliott M, Jagoe CH (2003): A microscaled mercury saturation assay for metallothionein in fish. *Environ Toxicol Chem* 22 (9) 2005–2012
- Serafim MA, Bebianno MJ (2001): Variation of metallothionein and metal concentrations in the digestive gland of the clam *Ruditapes decussatus*: sex and seasonal effects. *Environ Toxicol Chem* 20 (3) 544–552
- Sugiura T, Kuroda E, Yamashita U (2004): Dysfunction of macrophages in metallothionein-knock out mice. *J UOEH* 26 (2) 193–205
- Summer KH, Klein D (1991): Determination of metallothionein in biological materials. *Methods in Enzymology* 205, 57–60
- Theocharis SE, Margeli AP, Koutselinis A (2003): Metallothionein: a multifunctional protein from toxicity to cancer. *Int J Biol Markers* 18 (3) 162–169
- Valls M, Bofill R, Gonzalez-Duarte R, Gonzalez-Duarte P, Capdevilla M, Atrian S (2001): A new insight into metallothionein (MT) classification and evolution. The *in vivo* and *in vitro* metal binding features of *Homarus americanus* recombinant MT. *J Biol Chem* 276 (35) 32835–32843
- Vasak M (2005): Advances in metallothionein structure and functions. *J Trace Elem Med Biol* 19 (1) 13–17
- Viarengo A, Lafaurie M, Gabrielides GP, Fabbri R, Marro A, Romeo M (2000): Critical evaluation of an intercalibration exercise undertaken in the framework of the MED POL biomonitoring program. *Mar Environ Res* 49 (1) 1–18
- Weeks JM, Spurgeon DJ, Svendsen C, Hankard PK, Kammenga JE, Dallinger R, Köhler HR, Simonsen V, Scott-Fordsmand J (2004): Critical analysis of soil invertebrate biomarkers: A field case study in Avonmouth, UK. *Ecotoxicology* 13 (8) 817–822
- Werner J, Wautier K, Evans RE, Baron CL, Kidd K, Palace V (2003): Waterborne ethynylestradiol induces vitellogenin and alters metallothionein expression in lake trout (*Salvelinus namaycush*). *Aquat Toxicol* 62 (4) 321–328
- Wlostowski T, Bonda E, Krasowska A (2004): Photoperiod affects hepatic and renal cadmium accumulation, metallothionein induction, and cadmium toxicity in the wild bank vole (*Clethrionomys glareolus*). *Ecotoxicol Environ Saf* 58 (1) 29–36
- Yoshida M, Saegusa Y, Fukuda A, Akama Y, Owada S (2005): Measurement of radical-scavenging ability in hepatic metallothionein of rat using in vivo electron spin resonance spectroscopy. *Toxicology* 213 (1–2) 74–80
- Yin X, Knecht DA, Lynes MA (2005): Metallothionein mediates leukocyte chemotaxis. *BMC Immunol* 6, 21
- Zorita I, Strogyloudi E, Buxens A, Mazon LI, Papathanassiou E, Soto M, Cajaraville MP (2005): Application of two SH-based methods for metallothionein determination in mussels and intercalibration of the spectrophotometric method: Laboratory and field studies in the Mediterranean Sea. *Biomarkers* 10 (5) 342–359

Eingegangen: 29. Januar 2007

Akzeptiert: 19. März 2007

OnlineFirst: 20. März 2007