

1.2. Metal·lotioneïnes

1.2.1. Definició

Els estudis sobre les metal·lotioneïnes comencen després del descobriment i caracterització, per Margoshes i Vallee l'any 1957,¹⁵ d'una proteïna associada a Zn i Cd, aïllada a partir de còrtex de ronyó de cavall. Aquesta proteïna va ser anomenada "metal·lotioneïna" (MT) per Kägi i Vallee, l'any 1960, a causa del seu contingut metàl·lic i de sofre.^{71,72} Posteriorment, s'han aïllat MT de la majoria de teixits de vertebrats, invertebrats, plantes, microorganismes eucariotes i alguns procariotes. Totes elles es caracteritzen per tenir:

Pes molecular baix (3-10 KDa).

Contingut cisteínic elevat (30%), el qual explica la gran reactivitat de les MT enfront d'agents electrofílics i en processos d'intercanvi de metalls.⁷³

Escassetat de residus hidrofòbics, histidina i arginina.⁷⁴

Absència d'aminoàcids aromàtics (propietat que té repercussions molt importants quant a les seves empremtes espectroscòpiques).⁷⁵

Presència d'unitats Cys-X-Cys i Cys-X-Y-Cys en la seva seqüència aminoacídica, on X i Y són residus diferents de Cys.^{75,76,77}

Habilitat per a enllaçar metalls formant agregats metall-tiolat. En forma nativa, *in vivo*, les MT són aïllades contenint metalls essencials, com Zn

71. J.H.R. Kägi, B.L. Vallee, *J. Biol. Chem.*, (1960) 235, 3460.

72. J.H.R. Kägi, B.L. Vallee, *J. Biol. Chem.*, (1961) 236, 2435.

73. J.D. Otvos, D.H. Petering, C.F. Shaw III, *Comments Inorg. Chem.*, (1989) 9, 1.

74. D.R. Winge, C.T. Dameron, G.N. George, *Advances in Inorganic Biochemistry*, (1994) 10, 1.

75. B.L. Vallee, W. Maret, *Metallothionein III*, Birkhäuser Verlag, Basel, 1993, 1.

76. J. Kay, A. Cryer, B.M. Darke, P. Kille, W.E. Lees, C.G. Norey, J.M. Stark, *Int. J. Biochem.*, (1991) 23, 1.

77. P. Kille, A. Hemmings, E.A. Lunney, *Biochimica et Biophysica Acta*, (1994) 1205, 151.

i Cu, però també metalls tòxics, com Cd i Hg.^{76,78} Els estudis realitzats *in vitro* descriuen MT enllaçades a un nombre molt més variat de metalls.⁷⁸

1.2.2. Classificació

El gran nombre de treballs d'investigació dedicats a les MT en els darrers anys ha fet que el seu coneixement hagi avançat considerablement i que, per tant, la seva classificació pateixi els canvis de criteri conseqüents. Fins fa molt poc, les MT s'han classificat en base a la seva homologia i a les seves característiques estructurals ja que encara no s'ha pogut establir una relació funcional clara que permeti distingir-les en diferents tipus.^{13,79} Així, la classificació tradicional acceptada proposa tres classes de MT.⁸⁰

Les MT de Classe I comprenen unes 60 MT aïllades a partir de vertebrats, crustacis i alguns mol·luscs. Totes elles tenen una seqüència peptídica primària d'aproximadament 60 aminoàcids alineable amb la de la MT de ronyó de cavall i es caracteritzen per tenir una estructura terciària en dos dominis.

Les MT de Classe II es troben en invertebrats, plantes, llevats, fongs i alguns cianobacteris. Es caracteritzen per tenir una seqüència aminoacídica diferent a la de la MT de ronyó de cavall i només la meitat

78. M.J. Stillman, *Coordination Chemistry Reviews*, (1995) 144, 461.

79. K.T. Suzuki, N. Imura, M. Kimura, *Metallothionein III*, Birkhäuser Verlag, Basel, 1993.

80. M.G. Cherian, H.M. Chan, *Metallothionein III*, Birkhäuser Verlag, Basel, 1993, 87.

de residus de Cys que els pèptids de Classe I, característica que explica que la majoria d'aquestes MT estiguin constituïdes per un sol domini en la seva estructura terciària.

Finalment, els pèptids de la Classe III es caracteritzen per la seva síntesi enzimàtica, per la qual cosa no són considerats com a proteïnes ja que no són expressats a partir d'ARN missatger, i la presència d'agregats metall-tiolat (sovint amb Zn(II), Cd(II) i Cu(I)) constituïts a base de repeticions de la unitat -Glu-Cys amb un residu de Gly a l'extrem C-terminal. En aquest grup es troben les cadistines i fitoquelatines de fongs,⁸¹ algues⁸² i plantes.⁸³

Recentment, en el darrer congrés internacional sobre MT celebrat l'any 1997, s'ha proposat una nova classificació molt més detallada que les divideix en famílies, subfamílies, subgrups, isoformes i subisoformes.⁸⁴ Així, les MT de mamífer constitueixen una subfamília de la família dels vertebrats i existeixen en quatre isoformes diferents, dos d'elles, MT 1 i MT 2, es troben en tots els teixits parenquimàtics (fetge, ronyons, pàncrees, intestins) mentre que MT 3 es troba únicament en els astròcits cerebrals i MT 4 en l'epiteli. L'ordenació esmentada es basa en els criteris seqüencials tradicionals però també té en compte les relacions taxonòmiques trobades darrerament gràcies al gran nombre de MT descobertes en els últims anys. Tot i així, algunes MT aïllades després de la publicació d'aquest criteri de classificació no poden ser incloses en cap

81. E. Grill, E.L. Winnacker, M.H. Zenk, *FEBS Letters*, (1986) 197, 115.

82. B.A. Ahner, F.M.M. Morel, *Limnol. Oceanogr.*, (1995) 40, 658.

83. E. Grill, E.L. Winnacker, M.H. Zenk, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, (1987) 84, 439.

84. P.A. Binz, J.H.R. Kägi, *Metallothionein IV*, Birkhäuser Verlag, Basel, 1999, 7.

dels grups proposats^{85,86} i això indica la necessitat de realitzar estudis encara més exhaustius per tal de trobar un criteri més precís.

En qualsevol cas, cap de les dues classificacions esmentades proporciona informació sobre la funcionalitat de les MT ja que ambdues estan únicament basades en la similitud en les posicions dels residus de Cys dels polipèptids considerats.

Dins del marc dels estudis que duu a terme l'equip de recerca en el qual s'integra aquesta Tesi Doctoral s'acaba de publicar un treball sobre MT de crustaci que ha donat lloc a una nova proposta de classificació de les MT.⁸⁷ Donat que els ions metàl·lics que es coordinen a la MT són responsables de l'estructura dels seus agregats i tenint en compte la relació estructura/funció, s'ha proposat que les MT podrien classificar-se d'acord amb les seves preferències metàl·liques. Així, segons el metall fisiològic, Zn o Cu, que enllacen preferentment les MT es classifiquen com a Zn-tioneïnes o Cu-tioneïnes, entenent per Cu-tioneïnes aquelles MT que quan s'expressen *in vivo* en medis rics en Cu únicament donen lloc a agregats homometàl·lics Cu-MT, mentre que en les mateixes condicions les Zn-tioneïnes donen lloc a agregats mixtes Zn,Cu-MT.

1.2.3. Estructura

85. P.J. Hensbergen, M.H. Donker, M.J. Van Velzen, D. Roelofs, R.C. Van der Schors, P.E. Hunziker, N.M. Van Straalen, *Eur. J. Biochem.*, (1999) 259, 197.

86. S.R. Stuzenbaum, P. Kille, A.J. Morgan, *FEBS Letters*, (1998) 431, 437.

87. M. Valls, R. Bofill, R. González-Duarte, P. González-Duarte, M. Capdevila, S. Atrian, *J. Biol. Chem.*, (2001) 276, 32835.

És plenament conegut que en absència de metalls (forma apo) les MT presenten una estructura desordenada (*random coil*).^{88,89,90} En canvi, en presència de metalls (forma holo) aquestes proteïnes formen agregats metall-tiolat polinuclears, els quals defineixen l'estructura espacial de les MT. Així doncs, els residus no cisteïnics de les MT serveixen com a espaiadors que connecten les Cys coordinants.⁷⁸ No obstant això, la formació d'agregats estables només pot ser aconseguida si la cadena polipeptídica es plega de manera que els àtoms de S_{Cys} quedin disposats en una situació espacial acceptable per a la geometria de coordinació dels ions metàl·lics i sense produir tensions excessives en la conformació de la proteïna.⁷⁸ D'aquesta manera l'estructura terciària de les MT està principalment determinada pel nombre i la naturalesa dels ions metàl·lics que tenen coordinats. Tot i així, la sorprenent propietat de les MT per a amotllar-se a metalls que difereixen força en el seu radi atòmic sense provocar massa canvis en la geometria de coordinació d'aquests ni en la conformació de la proteïna s'explica mitjançant la seva plasticitat estructural.

88. M. Vašák, A. Galdes, H. Allen, O. Hill, J.H.R. Kägi, I. Bremmer, B.W. Young, *Biochemistry*, (1980) 19, 416.

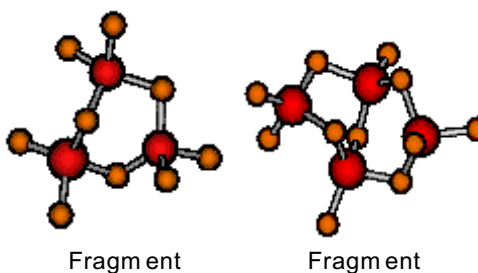
89. J.H.R. Kägi, A. Schäffer, *Biochemistry*, (1988) 27, 8509.

90. D.R. Winge, C.T. Dameron, *Metallothionein III*, Birkhäuser Verlag, Basel, 1993, 381.

Les tècniques de RMN de ^{111}Cd , ^{113}Cd i/o ^1H i de difracció de raigs X han permès disposar d'informació precisa sobre l'estructura tridimensional de diverses MT. Així, estudis amb MT de mamífer^{91,92,93,94,95,96} han permès proposar que l'ordenació d'aquestes cadenes peptídiques té lloc en dos dominis globulars de quiralitat oposada, d'aproximadament la mateixa mida i essencialment no interactius, on



Figura 1.1. Estructura de Cd_5Zn_2 -MT 2 de mamífer i els seus agregats metàl·lics i



els residus hidrofílics estan exclosos de l'interior de la molècula. El fragment N-terminal, anomenat domini , forma l'agregat M_3S_9 amb 3 S_{Cys} pontals i 6 terminals, i el fragment C-terminal, anomenat domini , forma l'agregat M_4S_{11} amb 5 S_{Cys} pontals i 6 terminals, essent $\text{M} = \text{Zn}(\text{II}), \text{Cd}(\text{II})$ coordinats als S_{Cys} tetraèdicament (Figura 1.1.). La coordinació tetraèdrica de 7 ions divalents a 20 residus de Cys introdueix 42 enllaços intramoleculars Cys-metall-Cys els quals determinen, en part, l'estabilitat de la proteïna. Així, l'estructura terciària ve donada per la unió de la proteïna als ions metàl·lics i la saturació metàl·lica dels dos dominis

91. J.D. Otvos, I.M. Armitage, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, (1980) 77, 7094.
 92. A. Arseniev, P. Schultze, E. Wörgötter, W. Braun, G. Wagner, M. Vašák, J.H.R. Kägi, K. Wüthrich, *J. Mol. Biol.*, (1988) 201, 637.
 93. B.A. Krizek, B.T. Amann, V.J. Kilfoil, D.L. Merkle, J.M. Berg, *J. Am. Chem. Soc.*, (1991) 113, 4518.
 94. B.A. Messerle, A. Schäffer, M. Vašák, J.H.R. Kägi, K. Wüthrich, *J. Mol. Biol.*, (1990) 214, 765.
 95. A.H. Robbins, D.E. McRee, M. Williamson, S.A. Collett, N.H. Xuong, W.F. Furey, B.C. Wang, C.D. Stout, *J. Mol. Biol.*, (1991) 221, 1269.
 96. G. Öz, K. Zangger, I.M. Armitage, *Biochemistry*, (2001) 40, 11433.

confereix a les MT una resistència contra la proteòlisi i l'oxidació.⁹⁷ En el cas de metalls monovalents no es disposa de dades de RMN ni cristal·logràfiques.

També s'ha estudiat per RMN l'estructura que formen les MT de crustaci en presència de Cd(II) i s'ha pogut determinar que constitueixen dos agregats independents Cd_3S_9 d'estequiometria idèntica a la de l'agregat Cd_3S_9 de MT de mamífer.^{98,99,100}

El darrer grup de MT que han estat estudiades per RMN ha estat el de les MT de llevat. Aquestes proteïnes estan constituïdes per un sol domini que conté 12 Cys, i en el cas de CUP 1, una de les dues MT de *Sacharomices cerevisiae*, s'ha pogut determinar l'estructura tridimensional de la proteïna nativa Cu_7 -MT (Figura 1.2.).^{101,102,103,104,105}



Figura 1.2. Estructura 3D de Cu_7 -MT de llevat.

Tot i que la difracció de raigs X i la RMN són les tècniques d'elucidació estructural per excel·lència, cal remarcar que l'espectroscòpia de DC i d'emissió han proporcionat una informació considerable sobre la coordinació d'alguns metalls a les MT. Així, s'han identificat diversos

97. J.H.R. Kägi, Y. Kojima, *Metallothionein II Exp. Suppl.*, (1987) 52, 25.

98. Z. Zhu, E.F. De Rose, G.P. Mullen, D.H. Petering, C.F. Shaw III, *Biochemistry*, (1994) 33, 8858.

99. Z. Zhu, D.H. Petering, C.F. Shaw III, *Inorg. Chem.*, (1995) 34, 4477.

100. S.S. Narula, M. Brouwer, Y. Hua, I.M. Armitage, *Biochemistry*, (1995) 34, 620.

101. S.S. Narula, D.R. Winge, I.M. Armitage, *Biochemistry*, (1993) 32, 6773.

102. I. Bertini, H.J. Hartmann, T. Klein, G. Liu, C. Luchinat, U. Weser, *Eur. J. Biochem.*, (2000) 267, 1008.

103. G.N. George, J. Byrd, D.R. Winge, *J. Biol. Chem.*, (1988) 263, 8199.

104. S.S. Narula, R.K. Mehra, D.R. Winge, I.M. Armitage, *J. Am. Chem. Soc.*, (1991) 113, 9354.

105. C.W. Peterson, S.S. Narula, I.M. Armitage, *FEBS Letters*, (1996) 379, 85.

motius estructurals a partir d'estudis realitzats amb Zn(II), Cd(II), Hg(II), Cu(I) o Ag(I). S'ha determinat que la MT nativa de fetge de conill forma els agregats Zn₇-MT, Cd₇-MT, Cu₁₂-MT, Ag₁₂-MT, Ag₁₈-MT o Hg₁₈-MT.⁷⁸ Estudis realitzats per aquest grup de recerca amb MT 1 recombinant de ratolí i els seus fragments han demostrat l'extraordinària capacitat coordinant d'aquestes proteïnes per tal de formar espècies de diversa estructura i nuclearitat en presència de Cd(II),¹⁰⁶ Cu(I),¹⁰⁷ Ag(I)¹⁰⁸ i Hg(II)¹⁰⁹ i Pb(II).

1.2.4. Reactivitat i funció fisiològica

Generalment, les reaccions en les quals es veuen involucrades les MT estan relacionades amb les seves propietats com a lligands multidentats o com a agents reductors. Les reaccions de MT més ben estudiades són les d'incorporació i substitució de metalls. S'ha descrit que, enfront dels metalls estudiats, aquestes reaccions són força ràpides ja que la coordinació d'aquests a les MT presenta una elevada estabilitat termodinàmica però en canvi una estabilitat cinètica molt baixa, de manera que la unió de metalls és forta però aquests poden ser fàcilment intercanviats amb els d'altres proteïnes.¹¹⁰ Així les MT participen ràpidament en reaccions d'intercanvi o substitució de metalls en les que un ió metàl·lic amb més afinitat d'unió a les MT, o sigui, als tiolats alifàtics de les seves Cys, desplaça un ió metàl·lic inicialment unit a una MT amb

106. Núria Romero Isart, *Tesi Doctoral*, Universitat Autònoma de Barcelona, 1998.

107. Roger Bofill Arasa, *Tesi Doctoral*, Universitat Autònoma de Barcelona, 2000.

108. Òscar Palacios Bonilla, *Treball de Recerca*, Universitat Autònoma de Barcelona, 1997.

109. S. Atrian, R. Bofill, M. Capdevila, N. CoIs, P. González-Duarte, R. González-Duarte, A. Leiva, O. Palacios, N. Romero-Isart, *Metallothionein IV*, Birkhäuser Verlag, Basel, 1999, 55.

110. K. Zangger, G. Öz, J.D. Otvos, I.M. Armitage, *Prot. Sci.*, (1999) 8, 2630.

una afinitat menor. L'ordre d'afinitats d'unió d'alguns ions metàl·lics a les MT és el següent:

Bi(III)>Hg(II)>Ag(I) Au(I)>Cu(I)>Cd(II)>Pb(II)>Co(II) Zn(II) Fe(II).¹¹¹

Existeixen dos possibles mecanismes de coordinació dels ions metàl·lics a les MT de dos dominis: específicament per dominis, quan els ions s'enllacen preferentment a un dels dominis, o estadísticament distribuïts als dos dominis, quan no hi ha una preferència clara per cap dels dominis i els ions s'hi uneixen de manera aleatòria.

L'extremada habilitat de les MT per a enllaçar ions metàl·lics, tant directament com mitjançant reaccions de desplaçament, és conseqüència de la plasticitat i flexibilitat de la seva estructura així com de la labilitat cinètica dels agregats metall-tiolat formats. Les dades de RMN i de difracció de raigs X demostren clarament la manca de rigidesa dels agregats polinuclears en base al desordre dinàmic dels girs polipeptídics que uneixen les Cys coordinants i al ràpid intercanvi dels protons amídics de llur estructura.⁹⁴ És precisament aquesta flexibilitat el que dificulta estudiar la possibilitat d'interacció entre els dominis de les MT bidominials.

Els partidaris de la hipòtesi de la independència dels dos dominis en les MT bidominials argumenten que s'obtenen espècies de la mateixa estequiometria i estructura per als fragments aïllats que quan aquests estan junts en la proteïna sencera.^{73,112,113,114,115} No obstant això, estudis

111. M. Vašák, *Methods in Enzymology*, (1991) 205, 452.

112. K.B. Nielson, D.R. Winge, *J. Biol. Chem.*, (1985) 260, 8698.

113. Y.J. Li, U. Weser, *Inorg. Chem.*, (1992) 31, 5526.

114. S. Matsumoto, S. Nakayama, Y. Nishiyama, Y. Okada, K.S. Min, S. Onosaka, K. Tanaka, *Chem. Pharm. Bull.*, (1992) 40, 2694.

115. S. Matsumoto, Y. Nishiyama, Y. Okada, K.S. Min, S. Onosaka, K. Tanaka, *Chem. Pharm. Bull.*, (1992) 40, 2701.

més recents realitzats per membres d'aquest grup d'investigació indiquen que la independència dels dos dominis correspon a situacions gairebé excepcionals essent molt més freqüent la seva interacció mútua.¹¹⁶

Les metal·lotioneïnes presenten també una alta reactivitat enfront d'electròfils com el disulfur de glutatió (GSSG) o el 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoat) (DTNB). La reacció que té lloc és l'oxidació dels grups tiolat de la MT a disulfur,¹¹⁷ prèvia pèrdua dels metalls que presentaven units, i la reducció del GSSG o DTNB a glutatió (GSH) o 5-tio-2-nitrobenzoat (TNB), respectivament. La reacció amb DTNB és la base del mètode anomenat d'Ellman de determinació colorimètrica del contingut de grups tiol en MT.¹¹⁸

També s'ha descrit la interacció de les MT amb CCl_4 , agents orgànics alquilants com el clorambucil o el iodoacetat, drogues antiartrítiques de Au(I), agents antitumorals de Pt(II), radicals hidroxil o superòxid i amb òxid nítric o N-etilmaleïmida.^{73,119}

La diversitat de metalls que coordinen les MT, la gran varietat d'organismes en què es troben i l'elevat grau de conservació que presenten les seves seqüències aminoacídiques, especialment els residus de Cys, en organismes diferents del mateix ordre, fa creure que les MT són proteïnes de gran importància biològica. Així mateix, el fet que la síntesi de moltes d'elles sigui induïda per metalls suggereix que aquestes

116. M. Capdevila, N. Romero, N. Cols, S. Atrian, R. González-Duarte, P. González-Duarte, *Cell. Mol. Life Sci.*, (1997) 53, 681.

117. W. Maret, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, (1994) 91, 237.

118. G.L. Ellman, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, (1959) 82, 70.

119. K.D. Kroncke, K. Fchsel, T. Schmidt, F.T. Zenke, I. Dasting, J.R. Wesener, H. Bettermann, K.D. Breunig, V. Kolb-Bachofen, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, (1994) 200, 1105.

proteïnes tenen un paper important en la regulació i detoxificació de metalls en els éssers vius.¹²⁰ Si bé 44 anys després del seu descobriment, la funció de les MT encara no està totalment establerta, i per tant gran part dels treballs actuals apunten en aquesta direcció, se'ls han atribuït les funcions següents, estretament relacionades les unes amb les altres, com a conseqüència de les seves característiques físicoquímiques pel fet de formar agregats metàl·lics.

Emmagatzematge intracel·lular d'ions metàl·lics essencials, Zn(II) i Cu(I).⁸⁰

Segrestament d'ions metàl·lics tòxics.^{74,121}

Detoxificació de radicals lliures, en base al caràcter reductor dels grups sulfhidril,^{122,123,124,125,126} i resistència a la toxicitat induïda per agents alquilants.^{127,128,129}

Transport d'ions metàl·lics essencials i reconstitució de proteïnes i enzims demetal·lats.^{117,130,131,132}

120. D.H. Hamer, *Ann. Rev. Biochem.*, (1986) 55, 913.

121. E.J. Kasarskis, W.D. Ehm ann, W.R. Markesbery, *Essencial and Toxic Trace Elements in Human Health and Disease: an update*, Prasad S.A. Ed., New York, 1993, 299.

122. M.G. Cherian, S.B. Howell, N. Imura, C.D. Klaassen, J. Koropatnik, J.S. Lazo, M.P. Waalkes, *Toxic. Appl. Pharm.*, (1994) 126, 1.

123. K.T. Tamai, E.B. Gralla, L.M. Ellerby, J.S. Valentine, D.J. Thiele, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, (1993) 90, 8013.

124. S.K. De, M.T. McCaster, G.K. Andrews, *J. Biol. Chem.*, (1990) 265, 15267.

125. B.L. Vallee, *Neurochem. Int.*, (1995) 27, 23.

126. R.D. Palmiter, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, (1998) 95, 8428.

127. S.L. Kelley, A. Basu, B.A. Teicher, M.P. Hacker, D.H. Hamer, J.S. Lazo, *Science*, (1988) 241, 1813.

128. X. Yu, Z. Wu, C. Fenselau, *Biochemistry*, (1995) 34, 3377.

129. J. Zaia, L. Jiang, M.S. Han, J.R. Tabb, Z. Wu, D. Fabris, C. Fenselau, *Biochemistry*, (1996) 35, 2830.

130. W. Evering, S. Haywood, I. Bremmer, A.M. Wood, J. Trafford, *Chem. Biol. Interactions*, (1991) 78, 297.

131. T. Wlostowski, *Biom etals*, (1993) 6, 71.

132. J. Zeng, R. Heuchel, W. Schaffner, J.H.R. Kägi, *FEBS Letters*, (1991) 279, 310.

A la isoforma 3 de la MT humana se li ha atribuït un paper com a inhibidor del creixement neuronal.^{133,134,135,136}

1.2.5. Tècniques de caracterització

L'aplicació de les diferents tècniques espectroscòpiques a l'estudi de les MT permet obtenir informació sobre els agregats metàl·lics a què donen lloc aquestes proteïnes. Molts dels estudis requereixen, però, la substitució de tots els ions metàl·lics enllaçats originalment a les MT, que són predominantment ions espectroscòpicament silenciosos, Zn(II), Cu(I), per altres espectroscòpicament actius o bé per isòtops sensibles a la tècnica triada.^{45,137,138} La Taula 1.4. mostra un resum de les tècniques espectroscòpiques més utilitzades aplicades per als diferents estudis.

Mètodes espectroscòpics aplicats a l'estudi de la coordinació metàl·lica en MT

Objectiu de l'estudi	Tècnica espectroscòpica	Metall examinat
Identificació del lligand	Espectroscòpia d'absorció electrònica	Zn, Cd, Hg, Co
	Espectroscòpia fotoelectrònica de raigs X	Zn, Cd, Hg, Cu
Geometria de coordinació	Espectroscòpia d'absorció electrònica	Co, Fe
	Ressonància paramagnètica electrònica	Co
	Dicroisme Circular magnètic	Co

133. M. Nordberg, *Talanta*, (1998) 46, 243.

134. Y. Uchida, K. Takio, K. Titani, Y. Yhara, M. Tomonaga, *Neuron.*, (1991) 7, 3337.

135. R.D. Palmiter, S.D. Findley, T.E. Whitmore, D.M. Durnam, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, (1992) 89, 6333.

136. S. Tsuji, H. Kobayashi, Y. Uchida, Y. Yhara, T. Miyatake, *EMBO J.*, (1992) 11, 4843.

137. M. Vašák, *J. Am. Chem. Soc.*, (1980) 102, 3953.

138. M. Vašák, J.H.R. Kägi, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, (1981) 78, 6709.

	Ressonància magnètica nuclear de ^{113}Cd	^{113}Cd
	Espectroscòpia Mössbauer EXAFS	^{57}Fe Zn, Cu, Hg ^{113}Cd , ^{111}Cd ,
	Ressonància magnètica nuclear	^{107}Ag , ^{109}Ag , ^{15}N , $^1\text{H}(2\text{D})$
Estructura del cluster metall-tiolat	Ressonància paramagnètica electrònica	Co
	Espectroscòpia Mössbauer	^{57}Fe
	Espectroscòpia d'absorció electrònica	Zn, Cd, Hg, Co, Fe, Bi, Pb
	Dicroisme Circular	Zn, Cd, Hg, Co, Fe, Bi, Pb
	Dicroisme Circular magnètic	Zn, Cd, Hg, Co, Fe, Bi, Pb
	Luminiscència	Cu, Ag, Au

Taula 1.4. Tècniques espectroscòpiques emprades per a l'elucidació de la coordinació dels ions metàl·lics en MT.^{89,97,139}

D'aquesta taula es dedueix que una part de l'estudi conformacional dels clusters metàl·lics es pot efectuar mitjançant l'espectroscòpia de Dicroisme Circular (DC). D'una banda, durant molt de temps la tècnica del DC ha estat emprada únicament per a determinar els diferents tipus d'estructura secundària de les proteïnes: hèlix, làmina o *random coil* (estructuració desordenada de la seqüència de residus de la proteïna), ja que cadascun d'aquests tipus d'ordenació mostra uns espectres de DC altament característics (Figura 1.3.).^{140,141} D'altra, la incorporació de cromòfors metall-sofre a proteïnes amb una estructura secundària i terciària ben definida

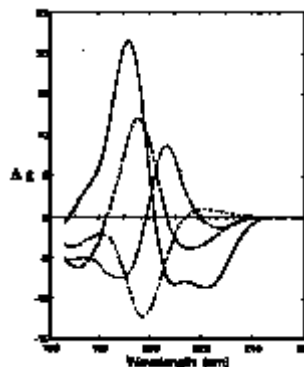


Figura 1.3. Espectres de DC característics de proteïnes amb diferents estructures secundàries: hèlix (continu), làmines antiparal·leles (discontínu llarg), -turn (puntejat) i *random coil* (discontínu curt).

139. J.H.R. Kägi, *Methods in Enzymology*, (1991) 205, 613.

140. W.C. Curtis, *Proteins: Structure, Function, and Genetics*, (1990) 7, 205.

141. M.R. Ghadiri, C. Choi, *J. Am Chem. Soc.*, (1990) 112, 1630.

comporta una transferència de quiralitat des de la proteïna al cromòfor. Aquesta inducció de quiralitat es manifesta en els espectres de DC, els quals són característics del tipus d'interacció cromòfor-proteïna. Més concretament, el senyal de DC dóna informació directa de l'entorn del cromòfor. Les MT representen un cas especial d'augment de quiralitat. La presència de metalls coordinats obliga a la formació d'una estructura tridimensional, la qual indueix quiralitat a les bandes d-d o de transferència de càrrega del metall, que apareixen en una regió clarament diferenciada de la característica de l'enllaç peptídic. En conseqüència, els experiments de DC proporcionen informació sobre el replegament de la cadena peptídica al voltant dels enllaços metall-S_{Cys} i de la geometria de coordinació dels centres metàl·lics.

A més a més, quan es formen agregats metàl·lics fortament estructurats, en l'espectre de DC hi ha un increment en la intensitat de les transicions que condueixen als estats excitats, ja que en aquestes condicions té lloc l'acoblament entre cromòfors, fenomen conegut com a "*exciton coupling*". Aquesta ordenació a nivell tridimensional es manifesta molt clarament en els espectres de DC, particularment sensibles a les transicions que s'originen en una estructura quiral, però no representa cap modificació en l'espectre electrònic.¹⁴²

D'altra banda, és conegut que les intensitats de les bandes de DC depenen de la naturalesa de les espècies existents en solució i, en conseqüència, de la relació metall:proteïna en el medi.¹⁴³

Així doncs, l'espectroscòpia òptica proporciona informació sobre el comportament de la proteïna com a agent quelatant de metalls. L'anàlisi

142. H. Willner, M. Vašák, J.H.R. Kägi, *Biochemistry*, (1987) 26, 6287.

143. E.L. Eliel, S.H. Wilen, *Stereochemistry of Organic Compounds*, John Wiley and Sons, New York, 1994.

dels espectres de DC i d'absorció UV-Visible en un interval determinat de longituds d'ona, on no hi hagi absorcions causades per la cadena peptídica, permet caracteritzar els agregats metall-tiolat que constitueixen els centres actius de les MT. El fet que la MT no tingui residus aromàtics fa que les transicions electròniques de menor energia observades corresponguin a transicions de la cadena peptídica, essent la més important la transició $n \rightarrow \pi^*$ a 213 nm corresponent al grup carbonil. Així doncs, si no hi ha oxidació dels tiolats cisteínics a disulfur, que presenta una banda ampla negativa entre 250 i 280 nm,¹⁴⁴ l'absorció a 213 nm és la transició de major energia observada. Així, l'apo-MT és totalment incolora i transparent a longituds superiors a 215 nm.¹³ A mesura que els grups tiolat de l'apo-MT coordinen ions metàl·lics apareixen absorcions entre 230 i 800 nm.^{97,145} Aquestes bandes són les que donen informació de l'estereoquímica de coordinació dels centres metàl·lics. Com que els espectres electrònics de metalls d^{10} no presenten bandes de transició d-d, la informació queda restringida a la que proporcionen les bandes de transferència de càrrega. En els espectres de DC, aquestes bandes són molt més intenses i ben resoltes que en els espectres d'absorció UV-Visible i, en conseqüència, permeten una anàlisi molt més detallada. Així, en les valoracions en les que un metall amb elevada afinitat pel S s'afegeix a Zn₇-MT o als fragments corresponents, les variacions en la intensitat de les bandes de DC indiquen per a cada punt de la valoració: a) si l'estructura del centre actiu es manté anàloga a la de Zn(II) (l'embolcall espectral continua essent el mateix però desplaçat a una altra longitud d'ona)

144. H. Rupp, U. W eser, *Biochimica et Biophysica Acta*, (1978) 533, 209.

145. M. Vašák, J.H.R. Kägi, H.A.O. Hill, *Biochemistry*, (1981) 20, 2852.

- b) si es forma una nova estructura a causa de la influència del metall que desplaça el Zn(II) (es desenvolupa un nou embolcall espectral, també a una energia diferent)
- c) si el centre actiu s'obre i es perd l'estructura tridimensional (el senyal de DC colapsa)

En definitiva, les espectroscòpies que han proporcionat més dades sobre la coordinació metàl·lica de les MT han estat les de DC i absorció UV-Visible. Així, s'han identificat diversos motius estructurals a partir d'estudis realitzats amb Zn(II), Cd(II), Hg(II), Cu(I) i Ag(I) amb MT natives⁷⁸ i recombinants^{16,108,116,146,147,148,149} que demostren l'extraordinària capacitat d'aquestes proteïnes per formar espècies metàl·liques d'estructura i nuclearitat ben diversa.

D'altra banda, una de les tècniques més desenvolupades en els darrers anys per a l'estudi del contingut metàl·lic de les MT ha estat l'espectrometria de masses i, més concretament, l'espectrometria de masses amb ionització per electrospai (ESI-MS).¹⁵⁰

L'ESI-MS ofereix molts avantatges respecte a altres tipus d'espectrometria de masses, però els que més destaquen són: la capacitat d'estudiar espècies d'elevat pes molecular, l'elevada sensibilitat i la poca quantitat

146. S. Atrian, M. Capdevila, N. Cols, R. González-Duarte, P. González-Duarte, N. Romero, M.J. Stillman, *J. Inorg. Biochem.*, (1995) 59, 103.

147. M. Capdevila, N. Romero, N. Cols, S. Atrian, M.J. Stillman, R. González-Duarte, P. González-Duarte, *Anales de Química, Int. Ed.*, (1996) 92, 199.

148. N. Cols, N. Romero-Isart, R. Bofill, M. Capdevila, P. González-Duarte, R. González-Duarte, S. Atrian, *Prot. Engng.*, (1999), 12, 265.

149. R. Bofill, O. Palacios, M. Capdevila, N. Cols, R. González-Duarte, S. Atrian, P. González-Duarte, *J. Inorg. Biochem.*, (1999), 73, 57.

150. P.A. Brady, J.K.M. Sanders, *New J. Chem.*, (1998) 411.

de mostra requerida per a efectuar una mesura. El seu principal inconvenient és la seva baixa selectivitat, és a dir, que qualsevol espècie iònica present a la mostra, com pot ser per exemple el tampó, és susceptible de ser ionitzada i dificultar així l'anàlisi dels pics corresponents a l'analit a estudiar. Aquest problema pot ser resolt acoblant a l'aparell d'ESI-MS una tècnica prèvia que permeti la separació de les substàncies que interfereixen en la mostra en estudi com són cromatografia de líquids, de tipus HPLC, i tècniques d'electroforesi capil·lar (CZE).^{151,152}

151. R. Lobinski, H. Chassaigne, J. Szpunar, *Talanta*, (1998) 46, 271.

152. K. Poléc, J. Szpunar, O. Palacios, P. González-Duarte, S. Atrian, R. Lobinski, *J. Anal. At. Spectrom.*, (2001) 16, 567.

1.2.7. Metal·lotioneïnes que contenen Pb(II)

D'entre els pocs estudis realitzats amb metal·lotioneïnes de Pb(II) cal destacar que la major part han estat duts a terme amb fitoquelatines (PC) i només es poden trobar uns quants treballs amb MT. La dispersió de dades bibliogràfiques i la poca informació referent a complexos Pb-MT dificulta l'anàlisi de les estequiometries d'aquests agregats alhora que no permet establir sense ambigüitats els nombres i geometries de coordinació dels ions Pb(II) en MT. Tot i així, a continuació es resumeixen les conclusions a què han arribat els diferents autors que han estudiat metal·lotioneïnes que contenen Pb(II).

Fa uns 20 anys Vašák i col·laboradors¹⁶⁵ van proposar que quan s'addiciona Pb(II) a les MT es formen diferents tipus d'agregats Pb-MT en funció del pH de la solució i del nombre d'ions de Pb(II) afegits. La Figura 1.16. mostra les empremtes espectrals de DC i d'absorció UV-Visible de l'agregat Pb₇-MT format a pH 7. En aquest mateix treball es proposa que és probable que en aquest complex el Pb(II) adopti una geometria de coordinació tetraèdrica Pb(S_{Cys})₄.

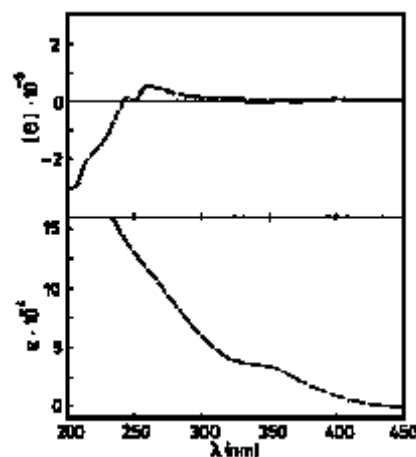


Figura 1.16. Espectres de DC i d'absorció UV-Visible de Pb(II)₇-MT.

La resta de treballs bibliogràfics referents a la coordinació del Pb(II) a MT són molt més actuals si bé, pel fet de procedir de grups de recerca

165. W. Bernhard, M. Good, M. Vašák, J.H.R. Kägi, *Inorg. Chim. Acta*, (1983) 79, 154.

xinesos, només es disposa dels *abstracts* ja que els articles estan publicats en xinès. Així, els estudis realitzats per He i col laboradors^{166,167} proposen que apo-MT 2 de fetge de conill reacciona amb Pb(II) a diferents pH donant lloc a la formació d'una única espècie Pb₇-MT si bé consideren que la geometria de coordinació del Pb(II) en aquesta espècie depèn del pH. Així, i d'acord amb els estudis de Vašák i col laboradors, a l'espècie Pb₇-MT 2 constituïda a pH 6.52 (Figura 1.17.) se li s'assigna un entorn de coordinació tetraèdric Pb(S_{Cys})₄. En canvi, quan Pb₇-MT 2 es forma a pH 2.18 (Figura 1.18.) es proposa que el Pb(II) prèn una "coordinació múltiple" que inclou la digonal.

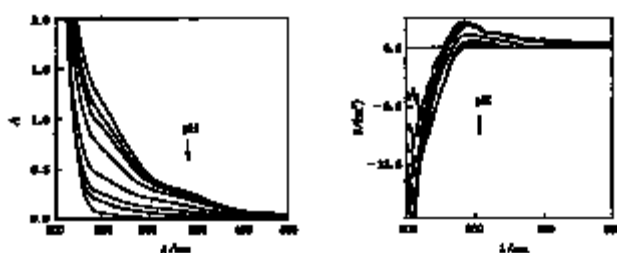


Figura 1.17. Espectres d'absorció UV-Visible (esquerra) i DC (dreta) enregistrats durant la valoració d'una solució d'apo-MT que conté 8 eq de Pb(II) ajustant el pH

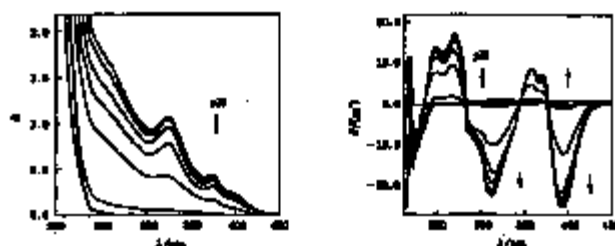


Figura 1.18. Espectres d'absorció UV-Visible (esquerra) i DC (dreta) enregistrats durant la valoració d'una solució d'apo-MT que conté 8 eq de Pb(II) ajustant el pH des de 2,18 fins a 5,90.

166. W.G. He, D.Y. Chu, J.Y. Yang, D.F. Yao, M.C. Shao, *Chem. J. Chinese Univ.*, (1999) 20, 248.

167. W.G. He, D.Y. Chu, J.Y. Yang, D.F. Yao, M.C. Shao, *Chin. Chem. Lett.*, (1999) 10, 87.

Per una altra banda, Chu i col·laboradors¹⁶⁸ han publicat que la valoració de Zn₇-MT 2 amb Pb(II) a pH 4.70 dona lloc a la formació d'una única espècie Pb₇-MT l'estructura de la qual proposen que és molt similar a la del cluster inicial Zn₇-MT.

Respecte a la substitució de Zn(II) per Pb(II) en MT, es troba un treball realitzat per Ji i col·laboradors¹⁶⁹ en el qual s'estudia la coordinació d'aquests ions a les isoformes 1 i 2 de MT de fetge de conill addicionant Pb(II) o bé Zn(II) i Pb(II) a apo-MT, Zn₇-MT i Zn₂Cd₅-MT. Els autors conclouen que la competició de Zn(II) i Pb(II) per a coordinar-se a apo-MT depèn de la isoforma de la proteïna que es consideri. Així, Zn(II) i Pb(II) competeixen per a enllaçar-se a apo-MT 1 per donar lloc a la formació d'espècies mixtes Zn,Pb-MT 1, mentre que en el cas de la isoforma 2 només es detecta la formació d'agregats Pb-MT 2. D'altra banda, en afegir Pb(II) a solucions de les formes holo, Zn₇-MT i Zn₂Cd₅-MT, d'ambdues isoformes s'observa que el Pb(II) no desplaça el Zn(II) coordinat a Zn₇-MT mentre que aquest desplaçament sí es detecta en Zn₂Cd₅-MT tot i que de manera diferent en les isoformes 1 i 2. Els autors finalitzen el treball suggerint que, en la seva forma apo, la isoforma 2 de MT és més sensible a la coordinació de Pb(II) que no pas la 1 i que Zn₂Cd₅-MT pot ser emprada efectivament per a la detoxificació de Pb(II).

El darrer estudi publicat sobre la coordinació de Pb(II) a MT¹⁷⁰ és l'únic que estudia el comportament dels fragments apo-MT i apo-MT enfront de Pb(II). D'aquest treball es dedueix que en valorar aquests fragments

168. D. Chu, Y. Tang, Y. Huan, W. He, W. Cao, *Thermochim. Acta*, (2000) 352-353, 205.

169. Q. Ji, L. Wang, Y. Zhou, B. Ru, *Beijing Daxue Xuebao, Ziran Kexueban*, (2000) 36, 503.

170. X. Li, S. Hao, Y. Liu, B. Ru, *Weisheng Yanjiu*, (2001) 30, 198.

amb Pb(II) té lloc la formació de les espècies Pb_4^- MT, Pb_7^- MT i Pb_3^- MT, de les quals la primera és la més estable.

Respecte als treballs realitzats amb Pb(II) i PC cal recordar que les PC són pèptids derivats del glutatió amb una estructura general (-Glu-Cys)_nGly (n=2-11). La presència de motius -Cys-X-Cys- en les PC suggereix que les seves característiques de coordinació metàl·lica podrien ser similars a les de les MT, les quals contenen motius similars.

S'ha publicat que la coordinació de Pb(II) a PC, GSH o MT 2 de rata indueix l'aparició de bandes de transferència de càrrega específiques i característiques d'unes estequiometries de coordinació determinades pel Pb(II).^{13,171,172}

Els estudis de Mehra i col·laboradors¹⁴ mostren que, independentment de l'agent donador de Pb(II) ($Pb(ClO_4)_2$, $Pb(CH_3COO)_2$ o Pb-GSH), les PC coordinen aquest ió metàl·lic i que la geometria de coordinació del Pb(II) depèn de la llargada de la cadena de les PC. Així, les de cadena més curta transfereixen els ions de Pb(II) a les de cadena més llarga la qual cosa indica que la força de l'enllaç Pb(II)-S_{Cys} augmenta amb la llargada de la cadena de les PC.

Aquests mateixos autors¹⁴ han realitzat vibracions amb Pb(II) de PC ((-Glu-Cys)_nGly) amb valors de n iguals a 2 (PC2), 3 (PC3) i 4 (PC4) (Figura 1.19.). A partir d'aquests resultats espectroscòpics es proposa la formació

171. L.A.P. Kane-Maguire, P.J. Riley, *J. Coord. Chem.*, (1993) 28, 105.

172. B.J. Fuhr, D.L. Rabenstein, *J. Am. Chem. Soc.*, (1973) 95, 6944.

de Pb_1 -PC2, Pb_1 -PC3 i Pb_1 -PC4 i Pb_2 -PC4 en les quals els ions $Pb(II)$ presenten nombres de coordinació 2, 4, 4 i 2, respectivament. El fet que amb PC4 es puguin obtenir espècies de diferents estequiometries en les que el $Pb(II)$ presenta entorns de coordinació diferents pot atribuir-se a la particular disposició dels residus de Cys a llarg de la cadena peptídica.

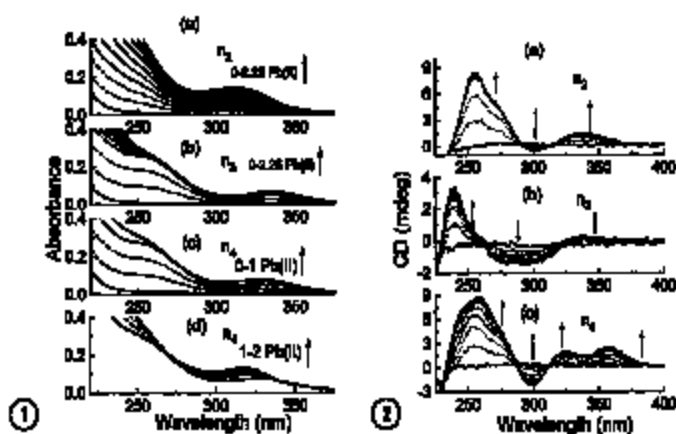


Figura 1.19. Espectres d'absorció UV-Visible (1) i de DC (2) enregistrats al llarg de les valoracions de PC2 (a), PC3 (b) i PC4 (c i d) amb $Pb(II)$.

Finalment, a la bibliografia també es pot trobar un treball dedicat a l'estudi de l'enllaç del $Pb(II)$ a tres dominis de dits de $Zn(II)$ que únicament difereixen entre ells en el nombre de residus de

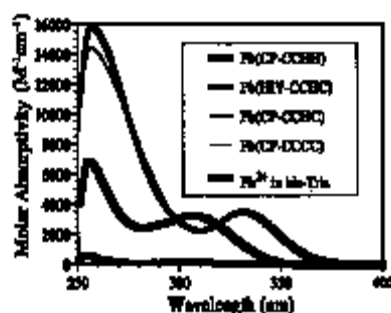


Figura 1.20. Espectres d'absorció UV-Visible dels complexos Pb -CCHH, Pb -CCHC i Pb -CCCC.

Cys: CCCC,¹⁷³ CCHC¹⁷⁴ i CCHH.¹⁷⁵ Aquest estudi posa de manifest que el Pb(II) competeix amb el Zn(II) pels mateixos llocs de coordinació i s'hi enllaça fortament.⁶⁹ Segons els autors el desplaçament del Zn(II) pel Pb(II) dificulta un plegament correcte d'aquests pèptids i possiblement els inactiva funcionalment. S'observa que els complexos Pb(II)-pèptid formats presenten, en els espectres d'absorció UV-Visible, bandes de transferència de càrrega metall-tiolat molt intenses en la regió compresa entre 250 i 400 nm (Figura 1.20.) les quals són molt similars a les detectades pels agregats Pb-MT i Pb-PC. Les dades de RMN enregistrades pels agregats Pb-pèptid suggereixen que els complexos formats són força fluxionals. També es proposa que el Pb(II) no s'enllaça fortament als residus d'His i, llavors, probablement completa el seu entorn de coordinació amb molècules d'aigua o de tampó (Tris) presents al medi. Així mateix, els autors dedueixen que l'afinitat relativa de Zn(II) i Pb(II) per aquests pèptids ve regida per criteris d'estabilitat termodinàmica, determinats per les corresponents constants de formació, més que no pas per criteris de control cinètic.

A continuació es resumeixen en forma de taula les dades espectroscòpiques de DC i d'absorció UV-Visible dels agregats Pb-proteïna o pèptid detectades a la bibliografia i s'indiquen les geometries de coordinació proposades pels ions de Pb(II) en aquestes espècies.

173. La seqüència d'aa del pèptid amb 4 Cys (CCCC) és la següent:
PYKCPECGKSFSQKSDLVKCQRTCTG.

174. La seqüència d'aa dels pèptids amb 3 Cys i 1 His (CCHC) són les següents:
PYKCPECGKSFSQKSDLVKHQRTCTG i VKCFNCGKEGHIARNCRA.

175. La seqüència d'aa del pèptid amb 2 Cys i 2 His (CCHH) és la següent:
PYKCPECGKSFSQKSDLVKHQRTHTG.

Espècie	Bandes de DC	Bandes d'absorció UV-Visible	Geometria de coordinació del Pb(II)
Pb ₇ -MT	245(+) 260(+)	260(sh) 350	tetraèdric
Pb ₇ -MT 2	245(+)	260(sh) 350	tetraèdric
Pb ₇ -MT 2	250(+) (doble) 310(-) (doble) 350(+) (doble) 395(-)	325 375 400(sh)	múltiple, digonal
Pb ₁ -PC2	250(+) 300(-) 330(+)	260(sh) 310	digonal
Pb ₁ -PC3	225(+) 290(-) 337(+)(feble)	250(sh) 330	tetraèdric
Pb ₁ -PC4	---	---	tetraèdric
Pb ₂ -PC4	---	---	digonal
Pb-pèptid	---	250-400	---

Taula 1.6. Dades espectros còpiques de DC i d'absorció UV-Visible dels agregats Pb(II)-proteïna o pèptid.