

1.3. Objectius

L'objectiu general d'aquesta Tesi Doctoral, que s'emmarca dins la Química Bioinorgànica, és el d'aportar dades que permetin elucidar el comportament de les MT enfront d'alguns ions metàl·lics tòxics. Aquest coneixement pretén contribuir a establir els mecanismes de les reaccions biològiques que determinen la funcionalitat d'aquestes proteïnes. Més concretament, es pretén obtenir informació sobre la química de coordinació de MT recombinant de mamífer en presència de Hg(II), MeHg⁺ i Pb(II), la qual ajudi a entendre la possible activitat d'aquestes proteïnes com a agents detoxificants de metalls tòxics.

No obstant això, dins d'aquest objectiu principal, cal fixar unes fites més específiques les quals es resumeixen a continuació.

Estudiar les condicions experimentals necessàries per tal que tingui lloc la coordinació dels ions Hg(II), MeHg⁺ i Pb(II) a la MT recombinant de ratolí i als seus fragments constitutius.

Quantificar la capacitat coordinant de la MT recombinant de ratolí, i dels seus fragments constitutius, enfront de Hg(II), MeHg⁺ i Pb(II) i determinar la geometria de coordinació de l'ió metàl·lic en els agregats metall-proteïna formats i l'estabilitat d'aquests.

Determinar l'efectivitat de la MT recombinant de ratolí com a agent detoxificador de Hg(II), MeHg⁺ i Pb(II).

Aquests objectius impliquen la determinació de l'estequiometria metall:proteïna de les espècies formades en afegir els ions metàl·lics a

MT o als seus fragments i l'optimització de paràmetres (com el pH, els contraions majoritaris presents en solució, la temperatura, el temps d'estabilització necessari per a la formació dels diferents agregats metàl·lics, ...) que afecten les reaccions de formació i estabilització dels complexos metall-proteïna.

Així, amb la intenció d'assolir aquestes fites s'efectuen les valoracions de Zn₇-MT, Zn₄- MT i Zn₃- MT amb Hg(II), MeHg⁺ i Pb(II) seguides per espectroscòpia de DC i d'absorció UV-Visible. Per a l'estudi de la coordinació de cadascun dels ions esmentats es realitzen diferents valoracions variant els paràmetres que més afecten en cada cas. D'acord amb això, en la taula simplificada que es presenta a continuació s'indiquen les valoracions efectuades que es descriuen i discuteixen en el Bloc II.

METALL	PROTEÏNA	pH	TEMPS D'ESTABILITZACIÓ	CONTRAIÓ	TEMPERATURA
Hg(II)	fragment	7	24h 0h	Cl ⁻ i ClO ₄ ⁻ Cl ⁻	25°C
		3	24h 0h	Cl ⁻ i ClO ₄ ⁻ Cl ⁻	
		variable	0h	Cl ⁻	
	fragment	7	24h 0h	Cl ⁻ i ClO ₄ ⁻ Cl ⁻	
		3	24h 0h	Cl ⁻ i ClO ₄ ⁻ Cl ⁻	
		variable	0h	Cl ⁻	
MT	7	24h 0h	Cl ⁻ i ClO ₄ ⁻ Cl ⁻		
	3	24h 0h	Cl ⁻ i ClO ₄ ⁻ Cl ⁻		
	variable	0h	Cl ⁻		
MeHg ⁺	fragment	5-6	0h	Cl ⁻	25°C
	fragment				
	MT				
Pb(II)	fragment	7	0h 24h	ClO ₄ ⁻	25°C
		3	0h		
		variable	0h		
	fragment	7	0h 24h		
		3	0h		
		variable	0h		
MT	7	0h 24h 48h	Evolució amb el temps	5°C	
	4.5			25°C	

		3	0h		45°C 25°C
--	--	---	----	--	--------------

Talula 1.7. Variables experimentals estudiades mitjançant la valoració de MT i els seus fragments i amb Hg(II), MeHg⁺ o Pb(II).

Dels diversos procediments d'obtenció de MT (obtenció a partir d'organismes vius, síntesi química i Enginyeria Genètica) s'ha escollit el que proporciona preparacions de major puresa. Totes les MT utilitzades en aquest treball han estat obtingudes mitjançant la tècnica de l'ADN recombinant en el grup de recerca que dirigeix la Dra. Sílvia Atrian. La seva síntesi i caracterització es descriuen als Apèndixs I, II i III.

2. Disseny experimental, Tècniques i Metodologia d'anàlisi de les dades enregistrades

Un cop definides les fites del treball cal establir una metodologia experimental que permeti assolir els objectius proposats. Així, l'estudi de la capacitat coordinant de la isoforma 1 de la MT recombinant de ratolí, Zn₇-MT, i dels seus fragments i , Zn₄- MT i Zn₃- MT, amb Hg(II), MeHg⁺ i Pb(II), s'ha dut a terme mitjançant valoracions espectropolarimètriques (DC) i espectrofotomètriques (UV-Visible) de les proteïnes esmentades amb solucions de Hg(II), MeHg⁺ i Pb(II) com a agents valorants. El conjunt de totes les dades espectrals enregistrades en les valoracions realitzades en aquest treball es presenta en un llibret adjunt i seran discutides al llarg dels capítols següents.

Abans de descriure els resultats obtinguts en les valoracions esmentades cal especificar els criteris emprats per tal de fixar algunes variables (temperatura, pH, temps d'estabilització, ...) que, a causa de la naturalesa dels sistemes en estudi, afecten el transcurs de les valoracions. En l'apartat 2.1. s'expliquen els motius que han conduït a l'elecció d'uns valors determinats per a aquestes variables. A més a més, el fet de realitzar les valoracions amb solucions metàl·liques dels ions Hg(II) i Pb(II) imposa l'addició del contraió corresponent i, com es veurà, aquest paràmetre també és un factor que intervé en el comportament coordinatiu d'aquestes proteïnes.

Amb la finalitat d'alleugerir la presentació dels resultats i la seva discussió, en l'apartat 2.2. es detalla la metodologia d'anàlisi de les dades espectroscòpiques enregistrades al llarg de les valoracions amb la finalitat

d'ometre-la en els capítols següents i permetre una discussió més fluida dels resultats. Així mateix, en els darrers epígrafs d'aquest apartat es comenta l'aplicació d'altres tècniques d'anàlisi i estratègies experimentals aplicables als sistemes en estudi les quals permeten completar la informació que donen les dades espectroscòpiques. Es dona informació d'espectrometria de masses amb ionització per electroesprai (ESI-MS) per a la caracterització de les espècies M(II)-MT. D'altra banda, la utilització de la resina quelatant Chelex-100 permet esbrinar, en alguns casos, el contingut metàl·lic de les espècies M(II)-MT on M(II) pot ser Zn(II) i/o Hg(II) o Pb(II).

2.1. Disseny experimental

2.1.1. Efecte de la temperatura

La química de coordinació de les MT és una química dinàmica que depèn de la concentració relativa dels ions metàl·lics, de la proteïna i de les altres espècies presents en solució. Si bé les MT són unes proteïnes amb una elevada estabilitat tèrmica, alguns estudis han confirmat que les reaccions de coordinació metàl·lica de les MT són notablement sensibles a la temperatura pel que fa al nombre d'ions metàl·lics que s'enllacen i a la seva distribució en la proteïna. Així, Stillman i col·laboradors determinen que la valoració de Zn₇-MT₂ de fetge de conill amb Cd(II) dona lloc a espècies Cd₇Zn₇-MT₂ o Cd-MT les quals es reestructuren per efecte de la temperatura (Figura 2.1.); així mateix,

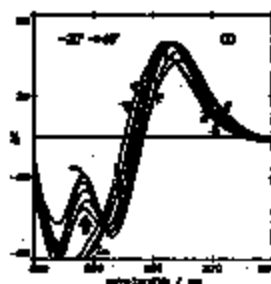


Figura 2.1. Efecte de l'escalfament des de -20 fins a 40 °C en l'espectre de DC d'una solució de Zn₇-MT que conté 7 eq molars de Cd(II).

s'afirma que les primeres mantenen el Zn(II) coordinat a temperatures per sota de 5°C i el perden per a valors superiors.¹⁷⁶ D'altra banda, el mateix autor també proposa que en valorar Zn₇-MT 2 de fetge de conill amb HgCl₂, l'estructura de l'espècie Hg₁₈-MT 2 que s'obté a pH 2.4 varia amb la temperatura perdent quiralitat a mesura que aquesta disminueix (Figura 1.8.).¹⁵⁵ En la valoració anàloga efectuada a pH 7 la temperatura no només afecta el grau d'estructuració de les espècies Hg-MT sinó que fins i tot determina la seva formació i estequiometria (Figura 2.2.-2.5.).¹⁵³

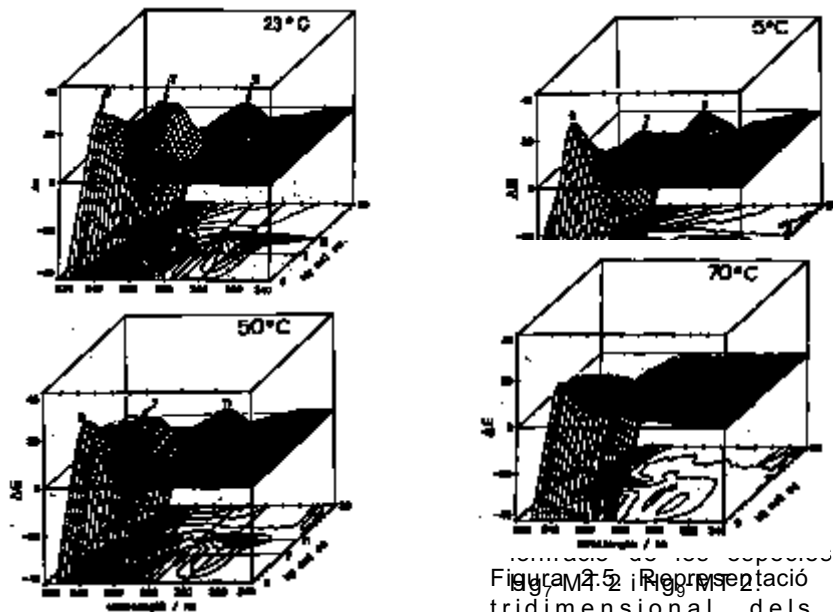


Figura 2.4. Representació tridimensional dels espectres de DC enregistrats al llarg de la valoració de Zn₇-MT 2 de fetge de conill amb HgCl₂ a pH 7 a 50 °C. S'observa la formació de les espècies Hg₇-MT 2 i Hg₁₁-MT 2.

Figura 2.5. Representació tridimensional dels espectres de DC enregistrats al llarg de la valoració de Zn₇-MT 2 de fetge de conill amb HgCl₂ a pH 7 a 70 °C. S'observa una intensitat mínima dels espectres que no permet proposar la formació de cap espècie.

176. M.J. Stillman, A.J. Zelazowski, *J. Biol. Chem.*, (1988) 263, 6128.

Donat que la major part dels estudis de MT s'han dut a terme a temperatura ambient, i pensant en la possible aplicació dels resultats obtinguts en aquest treball per a la interpretació del comportament de les MT *in vivo*, totes les valoracions s'han realitzat a temperatura ambient. Tot i així, en alguns casos que es comentaran al llarg de l'exposició dels resultats, i especialment en el cas del Pb(II), també s'han dut a terme estudis a temperatures superiors i/o inferiors per tal d'obtenir informació sobre l'estabilitat de les espècies caracteritzades.

2.1.2. Efecte del pH

La dependència dels sistemes biològics amb el pH és ben coneguda. Únicament tenint en compte que en funció de l'acidesa del medi hi ha més o menys possibilitats de formació d'enllaços d'hidrogen i reconeixent que aquest tipus d'enllaç té un paper fonamental en la formació i estabilitat de nombroses espècies químiques, també és d'esperar que les MT es comportin de manera diferent segons el pH al qual es trobin. Els estudis de Stillman i col·laboradors en l'espècie Hg₁₈-MT formada a pH 2 confirmen aquesta dependència en el cas de MT natives ja que, com es veu a la Figura 1.8., la intensitat dels espectres de DC, i, per tant, el grau d'estructuració de l'agregat metàl·lic que es forma, canvien força amb el pH.

De manera anàloga a l'apartat anterior, amb la intenció de reproduir unes condicions fisiològiques, el més adequat és estudiar el comportament d'aquestes metal·loproteïnes a un pH al voltant de 7. Tal com s'esmenta a l'Apèndix I, les proteïnes que s'estudien en aquest treball han estat obtingudes mitjançant tècniques d'Enginyeria Genètica en medis rics en Zn(II) i, per tant, s'han expressat en forma de Zn(II)-MT, i es troben a un pH proper a 7. Així, les valoracions a pH 7 s'inicien amb les holo-proteïnes: Zn₇-MT, Zn₄- MT i Zn₃- MT, de forma que quan al llarg d'una valoració se'ls addicionen ions metàl·lics (Hg(II) o Pb(II)) aquests troben els ions Zn(II) coordinats als seus centres actius. És per aquest motiu que es poden establir dues vies de comportament de la proteïna segons tingui lloc una substitució total o parcial del Zn(II) pel Hg(II) o el Pb(II), en base a la major afinitat d'aquests ions pel S, o bé hi hagi coexistència de Zn(II) i els nous ions coordinats, sense desplaçament del primer, en una mateixa espècie. Un dels factors que justifiquen la diferència de comportament de les MT a pH diferents ve determinada per la forma inicial en què es troben aquestes metal·loproteïnes en funció del pH. Així, si es valoren apo-proteïnes, és a dir, holo-proteïnes de les quals s'han desplaçat els ions Zn(II) acidificant el medi fins a pH 3, els ions metàl·lics addicionats poden coordinar-se lliurement sense restriccions estructurals imposades pels Zn(II). Per tant, hi ha un avantatge implícit en el fet de realitzar valoracions a diferents pH ja que unes poden donar informació per interpretar les dades obtingudes en les altres. És per això que per tal de poder analitzar el comportament de les Zn(II)-MT enfront de Hg(II) i Pb(II) a pH 7 cal estudiar també el comportament de les apo-MT corresponents evitant així la competència dels ions Zn(II).

Així doncs, tant en el cas del Hg(II) com en el de Pb(II), per a cada proteïna estudiada es realitza una valoració a pH 7 i una altra a pH 3. A

causa de que les solucions de Hg(II) i de Pb(II) utilitzades com a agents valorants tenen pH 3 i 4.5, respectivament, en les valoracions que s'efectuen a pH 7 cal tamponar el medi a aquest pH i acidificar-lo fins a 3 en les que transcorren invariablement a pH 3. Així mateix, i en base a algunes discrepàncies entre les dades obtingudes en aquest estudi i les de la bibliografia sobre la coordinació de Hg(II) a MT, s'ha considerat interessant dur a terme un altre conjunt de valoracions sense tamponar el medi. Això significa que tot i que les valoracions comencen a pH 7, a mesura que s'afegeix agent valorant, el medi s'acidifica fins a arribar a pH 3 i esdevé així una valoració a pH variable. D'altra banda, els resultats obtinguts en les valoracions de les proteïnes estudiades a pH 7 i a pH 3 utilitzant Pb(II) com a agent valorant han indicat la necessitat de realitzar addicionalment valoracions a pH 4.5.

2.1.3. Efecte del temps d'estabilització

Un altre factor clau a l'hora de dissenyar els experiments ha estat el de determinar el temps necessari que cal esperar entre addició i addició d'agent valorant, o dit d'una altra manera, el temps d'estabilització que s'ha de proporcionar per a la formació i conformació de les espècies presents en solució abans d'afegir un nou equivalent d'ió metàl·lic. Aquest és un paràmetre que no ha estat contemplat ni estudiat en cap dels estudis bibliogràfics comentats en els apartats anteriors però que, com es veurà al llarg d'aquest treball, també determina la formació i el grau d'estructuració d'algunes espècies.

Quan es va començar aquest treball es va considerar, en base a les dades bibliogràfiques i als resultats obtinguts per aquest grup de recerca

amb Cd(II),^{16,116} que la formació dels agregats metàl·lics amb aquestes proteïnes era força ràpida. Així, tradicionalment la metodologia habitual seguida en les valoracions ha consistit en afegir una quantitat determinada d'agent valorant i enregistrar els espectres de DC i d'absorció UV-Visible, esperar 10 minuts i enregistrar novament les dades espectrals, i així successivament. Quan els espectres no varien respecte als enregistrats 10 minuts abans, es procedeix a la següent addició d'agent valorant. En aquest treball, les valoracions realitzades seguint aquesta metodologia s'anomenen "a t=0h".

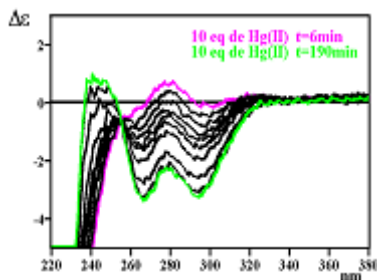


Figura 2.6. Evolució amb el temps de l'espectre de DC corresponent a l'addició de 10 eq de Hg(II) a Zn₇-MT 1 recombinant de ratolí a pH 7.

En les primeres valoracions amb Hg(II) es va observar que en alguns casos les corbes de DC podien variar força amb el temps (Figura 2.6.) de manera que de vegades era necessari esperar molt temps per tal que dos espectres successius fossin idèntics. Fins i tot es va observar que les reaccions de formació d'alguns agregats Hg(II)-MT procedien de maneres diferents segons el temps d'estabilització donat a l'espècie de què es partia. Tot això va indicar que la formació d'espècies Hg(II)-MT pot procedir per dos camins de reacció diferents regits per criteris de control cinètics o termodinàmics. Per tal d'establir el temps necessari per a diferenciar aquestes dues vies de reacció es van realitzar diversos assaigs donant temps d'estabilització diferents i, en el cas de Hg(II), es va determinar que 24 hores era un temps suficient per a la constitució de les espècies termodinàmicament estables. Així doncs, la metodologia escollida ha donat lloc a dues famílies de valoracions: unes anomenades "a t=0h", on la formació de les espècies té lloc sota control cinètic, i unes altres anomenades "a t=24h",

on la formació dels agregats Hg(II)-MT té lloc sota control termodinàmic.

En canvi, en el cas del Pb(II), aquests assajos van portar a la conclusió que no hi ha un temps de formació fix per a totes les valoracions ni per a totes les proteïnes, sinó que cada cas és diferent. Fins i tot ha estat

necessari efectuar estudis de seguiment de l'evolució d'una mateixa espècie amb el temps per tal de determinar la seva

empremta espectral característica (Figura 2.7.). Així doncs, les valoracions s'han realitzat a t=0h i a t=24h però també s'han efectuat alguns assajos a t=48h i s'ha estudiat l'evolució d'algunes espècies amb el temps.

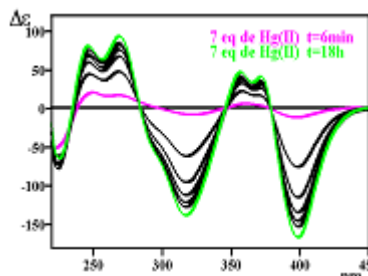


Figura 2.7. Evolució amb el temps de l'espectre de DC corresponent a l'addició de 7 eq de Hg(II) a Zn₇-MT 1 recombinant de ratolí a pH 7.

2.1.4. Efecte del contraïó

La presència d'una concentració prou elevada d'un lligand suficientment coordinant en els sistemes que s'estudien, MT o fragments i Hg(II) o Pb(II), fa pensar en la possible competència entre els S_{Cys} de les proteïnes i aquest lligand en la formació dels agregats M(II)-MT, o, si més no, en una coordinació simultània o addicional que pot afectar l'estructura i estabilitat dels agregats metàl·lics esmentats. Si bé no hi ha massa treballs bibliogràfics respecte a aquest punt, els estudis realitzats per Stillman i col·laboradors demostren que l'espècie Hg₁₈-MT, detectada en valorar apo-MT 2 amb Hg(II) a pH 2, no es constitueix en absència de Cl⁻ en el medi.¹⁵⁵ Així, per tal d'analitzar exclusivament el comportament de les MT enfront dels ions metàl·lics triats seria desitjable eliminar o evitar

la presència d'altres lligands. Això implica utilitzar com a agents valorants sals d'ions metàl·lics en les quals els anions siguin no coordinants, però, tot i així, la solució inicial de proteïna es troba tamponada amb Tris-HCl o bé amb Tris-HClO₄ i, per tant, ja aporta una certa concentració d'aquests lligands. D'altra banda, si es desitja reproduir el medi intracel·lular per tal que els resultats tinguin significat en medis biològics potser tampoc interessa eliminar la presència de possibles contraions coordinants. En qualsevol cas, les sals metàl·liques que s'utilitzen com a agents valorants cal que compleixin els requisits de ser solubles en aigua i de no presentar absorcions en el rang de λ en què apareixen les absorcions pròpies dels cromòfors M(II)-S_{Cys} per tal de no emascarar els espectres. En el cas de Hg(II), les sals metàl·liques més adequades són HgCl₂ i Hg(ClO₄)₂, mentre que en el cas de Pb(II), l'elevada insolubilitat de les seves sals ha fet que només es pugui utilitzar Pb(ClO₄)₂. Així doncs, en els resultats que es presenten en els capítols següents, pel cas de Hg(II) s'ha pogut fer un estudi comparatiu de dos contraions, un de menys coordinant, ClO₄⁻, i un de més coordinant però més present en medis biològics, Cl⁻, mentre que en el cas de Pb(II) no ha estat possible fer aquesta comparació. En ambdós casos s'ha de destacar que d'entre tots els possibles lligands presents en el medi de reacció, el que es troba en una concentració major és el contraió corresponent de la sal de l'ió metàl·lic que s'afegeix com a agent valorant i, a més a més, que a mesura que la valoració avança aquesta concentració augmenta i, per tant, l'efecte que pugui causar la presència d'aquest lligand és més notable.

2.2. Tècniques i Metodologia d'anàlisi de les dades enregistrades

En un estudi com aquest, on es treballa amb un conjunt d'espectres tan nombrós, és important determinar, acotar i descriure la metodologia d'anàlisi de les dades espectroscòpiques que permet establir quines espècies M(II)-MT es formen al llarg de les valoracions per tal de no repetir successivament els mateixos raonaments al llarg de la presentació i discussió dels resultats. Així, la proposta d'existència d'una espècie determinada es basa en l'avaluació conjunta i global de les dades espectroscòpiques obtingudes al llarg de la valoració. En un primer pas, s'efectua una dissecció de la totalitat de les dades en diferents fases, en les quals es divideix la valoració. En cada fase s'analitzen les diverses evolucions espectroscòpiques i els canvis en les tendències espectrals, alhora que es consideren les dades bibliogràfiques de què es disposa. Tot això permet determinar les espècies que tenen una importància individual rellevant, les quals són les proposades en els esquemes de reacció de cada valoració, i també el tipus d'entorn de coordinació dels ions metàl·lics que contenen.

A causa de la gran complexitat i variabilitat dels espectres enregistrats, resulta feixuga una descripció detallada de la seva evolució al llarg de les valoracions. És per aquest motiu que en els capítols següents només es fa referència als aspectes més remarcables de cada valoració a partir dels quals es dedueixen les estequiometries i, en alguns casos, la geometria de coordinació més probable de les espècies metall-MT. A continuació s'indiquen els diferents aspectes que cal analitzar al llarg de les valoracions i es donen exemples representatius.

2.2.1. Dicroisme Circular

És ben sabut que els espectres de DC de les holo-proteïnes, Zn_7 -MT, Zn_4 -MT i Zn_3 -MT, presenten un senyal en forma de derivada (*exciton coupling*), amb un màxim i un mínim situats, respectivament, a 244(+) i 228(-) nm, causat per les bandes de transferència de càrrega $S_{Cys} Zn(II)$. Els senyals de DC que apareixen per sota de 220 nm corresponen a les absorpcions dels enllaços peptídics de la cadena proteica i donen informació sobre la seva estructura secundària i terciària. D'altra banda, els espectres de DC de les apo-proteïnes, sense ions metàl·lics coordinats, no mostren cap banda a superiors a 220 nm (Figura 2.8.).¹³

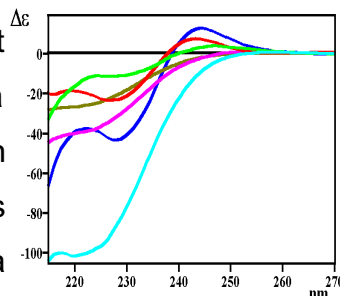


Figura 2.8. Espectres de DC de Zn_7 -MT, apo-MT, Zn_4 -MT, apo-MT, Zn_3 -MT i apo-MT.

La primera dada que permet assenyalar l'existència d'una espècie com a tal és el seu espectre de DC. Es requereix que aquest espectre indiqui: a) que l'evolució de les bandes que el caracteritzen culmina en aquest punt ja que correspon al final d'una tendència espectral, bé perquè s'assoleixen els màxims i/o mínims absoluts o bé perquè constitueixen l'últim espectre

que presenta les mateixes bandes que l'anterior però desplaçades a unes superiors o inferiors, b) que es tracta d'un espectre individual, és a dir, que és diferent de l'anterior i del següent quant al tipus, posició o nombre de bandes que presenta. Un exemple detallat de l'anàlisi d'aquestes dades és el que es presenta a continuació.

En la Figura 2.9. es mostra la variació dels espectres de DC corresponents a l'addició de $HgCl_2$ a Zn_7 -MT a pH 7 a $t=0h$. En el primer requadre s'observa que, partint de l'espècie que conté 5 eq de $Hg(II)$ (espectre negre), l'addició de $Hg(II)$ fins a arribar a l'espècie amb 9 eq de $Hg(II)$ (espectre rosa) provoca una desaparició gradual de les bandes situades a 244(+) i 281(-) nm i un corriment de les situades a 261(+) i 300(+) nm fins a 269(+) i 321(+) nm respectivament. Observant alhora el primer i segon requadres pot deduir-se que

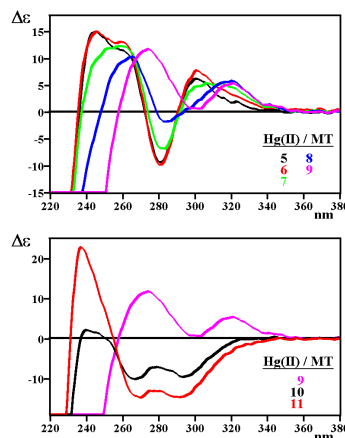


Figura 2.9. Espectres de DC corresponents a l'addició de $Hg(II)$ a Zn_7 -MT 1 recombinant de ratolí a pH 7 a $t=0h$.

l'espectre corresponent a 9 eq de $Hg(II)$ afegits és, clarament, l'espectre final de la primera etapa de la valoració ja que l'espectre corresponent a l'addició de 10 eq de $Hg(II)$ (espectre negre del segon requadre), mostra un perfil espectral que segueix una altra tendència, justament la de l'espectre corresponent a 11 eq de $Hg(II)$ afegits (espectre vermell).

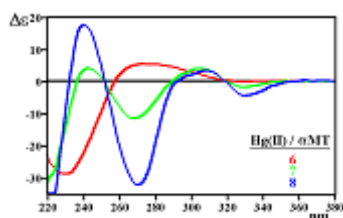


Figura 2.10. Espectres de DC corresponents a l'addició de $Hg(II)$ a Zn_4 -MT 1 recombinant de ratolí a pH 8 a $t=24h$.

Un altre exemple en què es pot proposar l'existència d'una espècie determinada es

representa a la Figura 2.10., la qual mostra els espectres de DC de Zn_4 -MT quan és valorada amb $HgCl_2$ a pH 3 a $t=24h$. S'observa clarament que l'espectre corresponent a l'addició del 6è eq de $Hg(II)$ (espectre vermell) és independent de les tendències espectrals seguides tant pels equivalents anteriors, 4 i 5, com pels posteriors, 7 i 8. S'entén que l'addició d'aquest 6è eq de $Hg(II)$ conforma una espècie que mostra un comportament individual, característic i diferent del de les espècies formades anteriorment i posterior.

En alguns casos, l'evolució d'una espècie a una altra té lloc d'una manera **cooperativa**, és a dir, que s'arriba a l'espècie final des de l'inicial sense la formació d'espècies intermitges. Aquest fenomen s'esdevé a través del que s'anomenen **punts isodicroics**. Així, es defineix com a punt isodicroic d'un procés

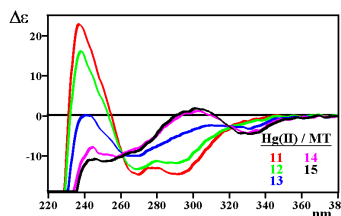


Figura 2.11. Espectres de DC corresponents a l'addició de $Hg(II)$ a Zn_7 -MT 1 recombinant de ratolí a pH 7 a $t=0h$.

cooperatiu determinat, aquella de l'espectre de DC en la qual coincideixen tots els espectres corresponents a les addicions successives de $M(II)$. Tot i així una evolució isodicroica només correspon a un procés cooperatiu si els espectres de diferència dels d'absorció ho confirmen essent tots iguals. En els esquemes de reacció de les valoracions que es mostren en el llibret adjunt s'indica que un procés és cooperatiu amb l'abreviatura **coop**. La Figura 2.11. mostra que l'espècie amb 11 eq de $Hg(II)$ afegits (espectre vermell) evoluciona cooperativament a l'espècie que conté 15 eq de $Hg(II)$ (espectre negre) a través de dos punts isodicroics situats a 260 i 320 nm.

Així, al llarg d'una valoració poden tenir lloc processos cooperatius i no cooperatius. Cal tenir present, doncs, que en els processos no

cooperatiu existeixen espècies intermitges encara que aquestes no siguin proposades en l'esquema de reacció corresponent, en el qual només es proposen les espècies corresponents al final de cadascuna de les etapes en què es divideix la valoració.

2.2.2. Absorció UV-Visible

Les absorcions electròniques característiques de les MT es manifesten de manera molt diferent en els espectres de DC i en els d'absorció UV-Visible. Amb independència de les absorcions pròpies de la proteïna, les corresponents als centres metàl·lics, que no presenten bandes d-d ja que es tracta d'ions d^{10} , es redueixen a les bandes de transferència de càrrega, les quals són molt poc resoltes en els espectres d'absorció UV-Visible. Per tant, aquests espectres proporcionen poca informació en comparació amb els de DC.

Així, els espectres d'absorció UV-Visible són la segona variable que cal analitzar per tal de postular l'existència d'una espècie. L'anàlisi d'aquests espectres és anàloga a la descrita pels espectres de DC. A causa de que les variacions d'aquests espectres són, normalment, molt menys marcades que les de DC, sovint, la informació que se'n pot extreure no és prou significativa i per això es procedeix a l'anàlisi de les dades dels seus espectres de diferència. Tot i així, en la major part dels casos també es poden deduir certes dades fent un estudi acurat d'aquests espectres. Llavors, l'anàlisi que es porta a terme és del tipus que es detalla en l'exemple següent.

A la Figura 2.12. s'observen els espectres d'absorció UV-Visible corresponents a l'addició de HgCl_2 a $\text{Zn}_3\text{-MT}$ a pH 7 a $t=0\text{h}$. En el primer requadre s'observa un augment progressiu de l'absorció en tot el rang de des de l'espècie inicial, $\text{Zn}_3\text{-MT}$ (espectre negre), fins a arribar al 3r eq de Hg(II) afegit (espectre blau). L'addició del 4t eq (espectre rosa del segon requadre) provoca una disminució generalitzada de l'absorció. En el mateix requadre, el 5è eq afegit (espectre negre del segon requadre) causa un canvi invers al 4t eq, és a dir, provoca un augment de l'absorció. A partir d'aquest punt, en el tercer requadre, s'observa de nou un augment progressiu de l'absorció però amb un pendent superior al corresponent als espectres de la primera fase de la valoració. Així doncs, es conclou que el 3r eq de Hg(II) afegit dóna lloc a l'espècie final de la primera etapa d'aquesta valoració; que l'espècie amb 4 eq de Hg(II) existeix com a una espècie individual i que el 5è eq de Hg(II) afegit dóna lloc a una espècie que és el punt de partida per a la formació de l'espècie final de la valoració.

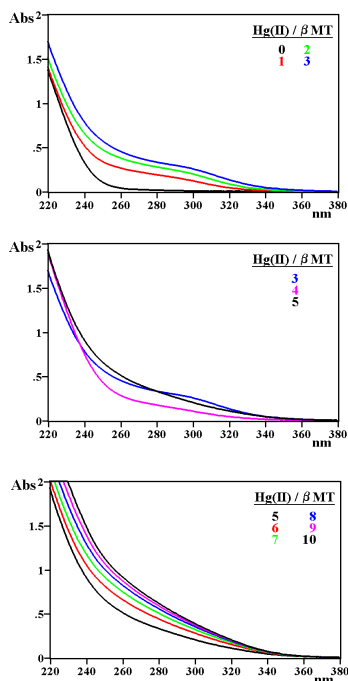


Figura 2.12. Espectres d'absorció UV-Visible corresponents a la valoració de $\text{Zn}_3\text{-MT}$ 1 recombinant de ratolí amb HgCl_2 a pH 7 a $t=0\text{h}$.

La representació gràfica que mostra la variació de l'absorció a una determinada enfront del nombre d'equivalents d'ió metàl·lic afegits permet obtenir dades complementàries dels espectres d'absorció UV-Visible i sovint indica amb claredat en quin punt de la valoració l'absorció causada pels nous cromòfors formats pateix un canvi de comportament,

cosa que s'observa en una variació en el pendent de les rectes d'aquesta gràfica. De tota manera, igual que els espectres d'absorció UV-Visible, aquestes dades difícilment permeten afirmar per elles mateixes l'existència irrevocable d'una espècie. Les escollides per a aquesta representació solen ser aquelles per a les quals s'observen les diferents bandes dels espectres de DC. Un exemple de l'anàlisi d'aquestes dades és el següent.

La gràfica que es mostra a la Figura 2.13. representa, a diferents , la variació de l'absorbància en funció del nombre d'equivalents de Hg(II) afegits durant la valoració de Zn₄-

MT amb HgCl₂ a pH 7 a t=24h. L'anàlisi dels canvis de pendent de la gràfica mostra un augment lineal de l'absorbància fins al 3r eq afegit, un màxim per al 4t eq, una disminució fins al 6è i un augment fins al final de la valoració però amb una petita disminució del pendent a partir del 8è eq. Es pot concloure

doncs, que les espècies a destacar d'aquest procés seran les que contenen 3, 4, 6 i 8 eq de Hg(II) afegits.

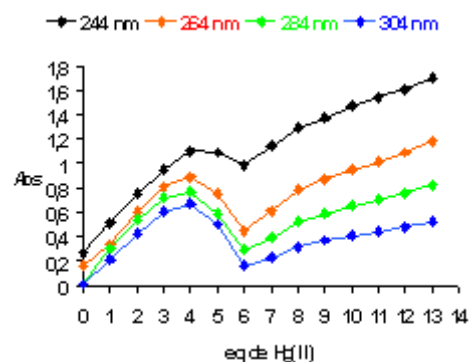


Figura 2.13. Representació gràfica de la variació de l'absorció a una determinada en funció del nombre d'equivalents de Hg(II) afegits al llarg de la valoració de Zn₄- MT amb HgCl₂ a pH 7 a t=24h.

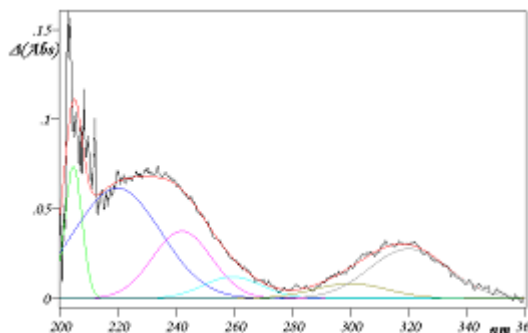
2.2.3. Diferència d'absorció UV-Visible

A més de les dades de DC i d'absorció UV-Visible és força útil tenir en

compte els espectres de diferència d'absorció UV-Visible (ED), els quals s'obtenen a partir dels espectres UV-Visible corresponents. Així, un espectre genèric $m-n$, representa la diferència entre l'espectre d'absorció UV-Visible corresponent a l'addició de m eq de $M(II)$ a la solució de proteïna menys l'espectre que correspon a l'addició de n eq de $M(II)$, essent sempre $m > n$. Aquests espectres proporcionen informació sobre la contribució de l'últim equivalent de $M(II)$ afegit a l'espectre global. S'ha de tenir en compte, doncs, que petites variacions de les dades d'absorció UV-Visible poden ser molt significatives i que mitjançant els ED és possible apreciar-les molt clarament i obtenir, d'aquesta manera, informació relacionada directament amb els canvis estructurals de les espècies formades al llarg de les valoracions.

Sovint, els espectres electrònics presenten embolcalls complexos a causa de la presència de diverses absorcions que es solapen. La seva descomposició en corbes gaussianes és una eina matemàtica que permet determinar els màxims d'absorció de les bandes que es solapen i que resulta ser molt útil per a la lectura dels canvis de participació o contribució de les absorcions que es succeeixen al llarg d'una valoració.

En aquest treball s'ha utilitzat amb la finalitat d'assignar les absorcions causades per la incorporació dels successius equivalents de $M(II)$ a la MT i als seus fragments. Aquesta descomposició s'ha pogut dur a



terme amb una precisió superior al que sovint és possible gràcies a que els espectres de DC donen informació sobre els màxims d'absorció dels espectres electrònics. En molts casos, l'anàlisi dels ED és clau per tal de predir les estequiometries de les espècies que es formen, l'estereoquímica de coordinació d'aquestes i la seva variació al llarg de la valoració. En el cas de les espècies Hg-MT sovint resulta difícil fer una proposta de les diferents geometries de coordinació perquè: a) manquen dades bibliogràfiques en les quals s'assigni cada absorció a una geometria de coordinació concreta, i b) coexisteixen centres metàl·lics amb diferents geometries de coordinació en una mateixa espècie. Un exemple detallat d'aquestes anàlisis és el següent.

En la Figura 2.14. es mostren els espectres de diferència d'absorció UV-Visible de 7-6 eq i 8-7 eq de Hg(II) afegits corresponents a la valoració de Zn₇-MT amb HgCl₂ a pH 7 a t=24h. La comparació d'ambdós requadres permet observar que, respecte al primer, el segon mostra una disminució de la banda gaussiana centrada a 260 nm i una inversió de les situades a 280 i 300 nm. Aquestes variacions indiquen que l'addició del 8è eq de Hg(II) provoca una

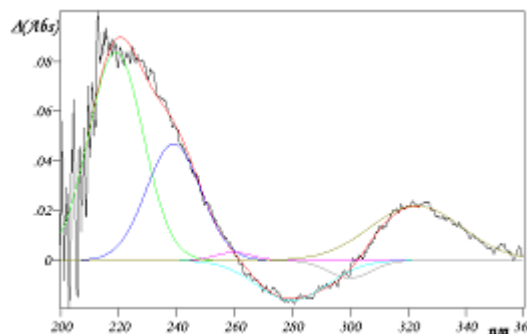


Figura 2.14. Espectres de diferència d'absorció UV-Visible corresponents a 7-6 eq de Hg(II) i 8-7 eq de Hg(II) afegits a Zn₇-MT 1 recombinant de ratolí a pH 7.

pèrdua dels cromòfors que absorbeixen a 280 i 300 nm i un increment menor del nombre de cromòfors que absorbeixen a 260 nm. Tenint en compte les dades bibliogràfiques esmentades en el capítol anterior pot postular-se que l'addició del 8è eq causa una pèrdua de Hg(II) enllaçat

tetraèdricament.

2.2.4. Espectrometria de masses

Les tècniques d'espectrometria de masses permeten determinar les masses moleculars de les espècies presents en una mostra. Més concretament, l'espectrometria de masses amb ionització per electrospai (ESI-MS) és una de les tècniques més emprades per a la caracterització dels agregats metàl·lics de metal·loproteïnes. L'aplicació d'aquesta tècnica d'ionització suau ofereix molts avantatges respecte a altres tipus d'espectrometria de masses d'entre els quals destaca l'elevat grau de sensibilitat. No obstant això, la seva baixa selectivitat, l'inconvenient principal, sovint dificulta la seva aplicació en alguns sistemes.

Així, la interferència de l'agent tamponant en el rang de masses on apareixen els ions corresponents a la mostra, la coexistència de diferents espècies amb una massa molt propera i l'extraordinària labilitat dels ions metàl·lics que s'estudien en aquest treball, Hg(II) i Pb(II), entre d'altres factors, dificulten l'aplicació d'aquesta tècnica. Els espectres d'ESI-MS que es mostren a les Figures 2.15. i 2.16. són exemples dels enregistrats en analitzar unes mostres de Hg(II)-MT i Pb(II)-MT que, d'acord amb les dades d'espectroscòpia òptica, contenien una única espècie. D'acord amb aquests espectres, les mostres analitzades contenen una barreja d'agregats d'estequiometries diferents. La detecció simultània del tampó Tris de la mostra impedeix, tanmateix, caracteritzar correctament les espècies metàl·liques. D'altra banda també s'ha comprovat que acoblant l'aparell d'ESI-MS a un d'electroforesi capil·lar amb la intenció de separar les espècies presents en solució, no s'obtenen bons resultats.

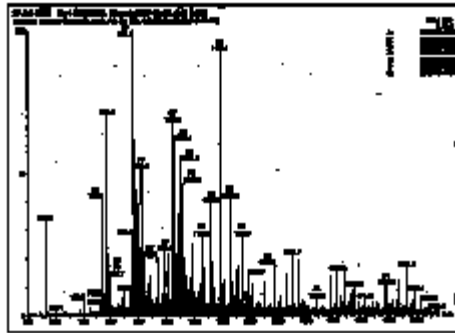


Figura 2.15. Espectre d'ESI-MS d'una solució d'apo-MT que conté 4 eq de Hg(II). Es detecta l'existència en solució de les espècies: apo-MT, Hg₁-MT, Hg₂-MT, Hg₃-MT, Hg₄-MT, Hg₅-MT i Hg₆-MT.

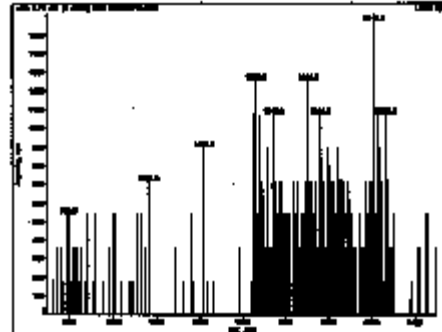


Figura 2.16. Espectre d'ESI-MS/CZE d'una solució de Zn₇-MT que conté 3 eq de Pb(II). No es detecta l'existència clara de cap espècie.

Així doncs, malgrat que l'espectrometria de masses és una tècnica potencialment molt útil per a l'estudi del contingut metàl·lic de les MT, tot i que complementària als estudis de DC i d'absorció UV-Visible, no ha estat possible aplicar-la als sistemes estudiats en aquest treball.

2.2.5. Utilització de la resina quelatant Chelex-100

Molt sovint les tècniques espectroscòpiques utilitzades en aquest treball no permeten esbrinar amb certesa si tots els ions Zn(II) inicialment coordinats a MT són desplaçats pels ions metàl·lics afegits al llarg de les valoracions. Així, resulta molt útil emprar la resina quelatant Chelex-100, àmpliament utilitzada en manipulació i experiments amb biomolècules, per a la determinació del contingut metàl·lic de les espècies heterometàliques Zn_xM_y-MT (on M pot ser Cd(II), Cu(I), Ag(I), Hg(II), ...).

L'estrategia seguida consisteix a determinar els ions Zn(II) que han estat

desplaçats pels ions adicionats al llarg de les valoracions. Aquest pas requereix la coordinació dels ions Zn(II) lliures en solució a la resina Chelex-100. A continuació aquesta es tracta amb àcid per tal d'alliberar els ions retinguts i procedir a l'anàlisi de la seva concentració. La determinació del contingut metàl·lic de les mostres s'efectua mitjançant les tècniques d'espectroscòpia d'emissió atòmica de plasma acoblat per inducció (ICP-AES) i d'espectrometria de masses de plasma acoblat per inducció (ICP-MS), les quals també han permès la caracterització inicial de les proteïnes obtingudes per Enginyeria Genètica (Apèndix II). Mentre que, pel seu rang de detecció, l'ICP-AES és adequada per a la determinació de S i Zn, l'ICP-MS s'aplica per a la detecció del contingut atòmic de Hg.

La utilització de la resina quelatant Chelex-100 juntament amb les tècniques d'ICP-AES i d'ICP-MS és una de les poques metodologies que poden ser aplicades per a la determinació del contingut metàl·lic d'alguna de les espècies que es proposen en aquest treball ja que, com s'ha comentat en l'apartat anterior, l'aplicació de l'ESI-MS no ha donat bons resultats. Tot i així, cal destacar que també pot donar lloc a resultats confusos i poc concloents a causa del compromís entre la baixa concentració metàl·lica de les mostres i el límit de detecció de la tècnica. A més a més, la realització d'aquests experiments resulta molt llarga i porta implícita un error experimental elevat pel que fa a la manipulació de les solucions de cada pas del tractament el qual es detalla en l'Apèndix II.

Considerant els avantatges i les limitacions de la metodologia descrita, únicament s'ha aplicat a l'estudi del contingut metàl·lic de les espècies que es formen al llarg de la valoració de Zn₄- MT amb HgCl₂ a pH 7. Les

dades obtingudes han permès establir l'estequiometria de les espècies Zn_xHg_y - MT i analitzar aquests resultats d'acord amb els d'espectroscòpia òptica, DC i absorció UV-Visible. Aquesta informació ha estat utilitzada posteriorment per a la interpretació dels resultats obtinguts en les valoracions de Zn_3 - MT i Zn_7 -MT.