

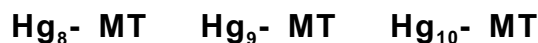
4. Comportament de Zn_3^- MT recombinant de ratolí enfront de diferents espècies de Hg(II)

En aquest capítol es presenta i discuteix el comportament de Zn_3^- MT 1 recombinant de ratolí quan és valorada amb diferents sals de Hg(II) ($HgCl_2$ i $Hg(ClO_4)_2$), a diferents pH (7 i 3) i permetent diferents temps d'estabilització per a cada equivalent de Hg(II) afegit ($t=24h$ i $t=0h$).

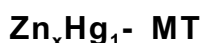
4.1. Valoració de Zn_3^- MT recombinant de ratolí a pH 7

4.1.1. Valoració de Zn_3^- MT amb $HgCl_2$ a pH 7 a $t=24h$ (LÀMINA 8)

L'anàlisi detallada dels espectres de DC, absorció UV-Visible i diferència d'aquests darrers permet postular que l'evolució de l'espècie Zn_3^- MT quan és valorada amb $HgCl_2$ a pH 7 i a $t=24h$ segueix l'esquema de reacció següent:



Les dades i les evolucions espectrals més rellevants que permeten postular l'existència d'aquestes espècies es comenten breument a continuació.



DC: El primer eq de Hg(II) afegit provoca una disminució de la intensitat de la banda centrada a 244(+) nm, la qual indica la possible pèrdua d'algun ió de Zn(II) del cluster inicial, i s'observa la formació d'altres bandes a 265(+) i 300(-) nm.

UV: Hi ha un increment de l'absorció en tot el rang de (Figura 4.1.).

ED: La descomposició en gaussianes d'aquest espectre indica la contribució de corbes a properes a 240, 260, 280, 300 i 320 nm. Això indica que en l'espècie proposada el Hg(II) presenta entorns de coordinació mixtes trigonals i/o tetraèdrics i que possiblement part dels S_{Cys} que inicialment eren terminals han esdevingut lligands pontals.

Zn_xHg₄- MT

DC: L'addició de Hg(II) fins al 4t eq provoca un lleuger desplaçament fins a 243 nm i una petita pèrdua d'intensitat de la primera banda de l'espectre de l'espècie anterior. Això indica que probablement es perd algun altre ió de Zn(II) inicialment enllaçat a la proteïna. S'observa també un desplaçament fins a 278 i 306 nm

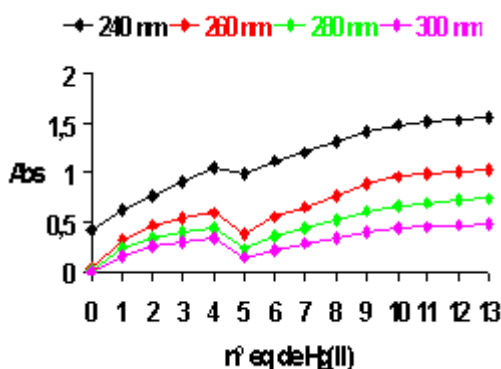


Figura 4.1. Representació gràfica de la variació de l'absorció a una determinada en funció del nombre d'equivalents de Hg(II) afegits al llarg de la valoració de Zn₃- MT amb HgCl₂ a pH 7 a t=24h.

de les altres dues bandes de l'espectre així com una disminució i un augment respectiu de la seva intensitat.

UV: Hi ha un increment de l'absorció en tot el rang de si bé s'observa un canvi de pendent amb l'addició de cada eq de Hg(II) (Figura 4.1.).

ED: Amb l'addició del 2n eq de Hg(II) s'observa la contribució addicional d'una corba centrada a 230 nm, la qual augmenta a mesura que disminueix el grau de participació de la resta de gaussianes. Es proposa

que en aquesta espècie el Hg(II) presenta entorns de coordinació mixtes trigonals i/o tetraèdrics i digonals i que probablement el nombre de S_{Cys} terminals que esdevenen pontals és superior al de l'agregat Zn_xHg₁- MT.

Hg₅- MT

DC: L'addició del 5è eq de Hg(II) provoca un fort augment d'intensitat i un lleuger desplaçament fins a 238 nm de la banda més intensa de l'espectre anterior. S'interpreta aquest corriment com al desenvolupament d'aquesta nova absorció juntament amb la desaparició de la banda causada per l'enllaç del Zn(II) als S_{Cys} de la proteïna.

UV: S'observa una disminució global de l'absorció en tot el rang de sobre de 230 nm (Figura 4.1.).

ED: Aquest espectre mostra contribucions negatives per a totes les absorcions aparegudes anteriorment excepte al voltant de 230 nm i això indica que en aquesta espècie el Hg(II) està enllaçat únicament de forma digonal.

Hg₆- MT

DC: El 6è eq de Hg(II) causa un petit desplaçament fins a 241 nm i una lleugera disminució de la intensitat de la banda més intensa constituïda en l'espècie anterior. Així mateix s'observa l'inici del desenvolupament de bandes centrades a 270(+), 300(-) i 320(-) nm.

UV: L'absorció augmenta linealment en tot el rang de des de 6 fins a 10 eq de Hg(II) afegits.

ED: A partir d'aquest 6è eq de Hg(II), tots els equivalents afegits fins arribar al 9è presenten un ED similar, el qual indica que el Hg(II) adopta una geometria de coordinació trigonal de tipus MerR.

Hg₈- MT

DC: La formació d'aquesta espècie procedeix cooperativament des de Hg₆- MT, mitjançant un punt isodicroic situat a 279 nm, i s'assoleix una estructura altament quiral que no varia gaire malgrat la coordinació de més Hg(II).

Hg₉- MT

DC: L'espectre d'aquesta espècie és essencialment el mateix que el de l'espècie anterior. S'observa però una petita disminució de la intensitat de les bandes situades a 241(+) nm i 320 (-) nm, i un lleuger corriment de la situada a 300(-) nm fins a 298 nm.

Hg₁₀- MT

DC: Aquest 10è eq de Hg(II) afegit provoca una disminució general de la intensitat de totes les bandes i alhora un petit desplaçament cap a inferiors, excepte en la situada entorn de 240 nm.

Els espectres de DC corresponents a les addicions següents marquen l'inici de la desestructuració de l'agregat metàl·lic format, la qual transcorre amb una disminució de la intensitat de totes les bandes de l'espectre a través d'un punt isodicroic situat a 279 nm.

UV: A partir d'aquest punt l'absorció augmenta molt poc (Figura 4.1.).

ED: S'observa que l'addició d'aquest eq de Hg(II) provoca l'aparició de contribucions gaussianes assignades a la presència de Hg(II) digonal a més a més de les descrites per a Hg(II) trigonal.

4.1.2. Valoració de Zn₃- MT amb HgCl₂ a pH 7 a t=0h (LÀMINA 9)

la valoració arriba fins a la formació de l'espècie $Zn_yHg_3^-$ MT la qual mostra un espectre de DC similar al de l'agregat $Zn_yHg_4^-$ MT obtingut en la valoració a $t=24h$ i, per tant, es proposa que ambdues espècies adopten estructures similars (Figura 4.3.). Els ED corresponents indiquen que també l'entorn de coordinació del Hg(II) és el mateix, tetraèdric-digonal, en ambdós agregats. La següent espècie proposada a $t=0h$, $Zn_2Hg_4^-$ MT, mostra un espectre de DC diferent del de qualsevol de les espècies d'estequiometria similar formades a $t=24h$ (Figura 4.4.) i presenta Hg(II) digonal. A partir d'aquest punt l'evolució de les espècies en coordinar Hg(II) a $t=0h$ segueix un mecanisme de reacció ben diferent del seguit a $t=24h$ i, per tant, dóna lloc a agregats metàl·lics d'estructures diferents les quals presenten un grau de quiralitat molt inferior a l'assolit per les formades a $t=24h$ (Figura 4.5.). Pel que fa als entorns de coordinació del Hg(II) s'observa que l'espècie Hg_5^- MT conté Hg(II) trigonal i a partir de Hg_7^- MT la coordinació dels metalls és mixta

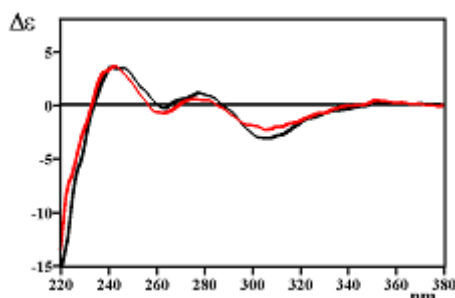


Figura 4.3. Espectres de DC de les espècies $Zn_yHg_4^-$ MT i $Zn_yHg_3^-$ MT obtingudes afegint $HgCl_2$ a Zn_3^- MT a pH 7 a $t=24h$ i $t=0h$

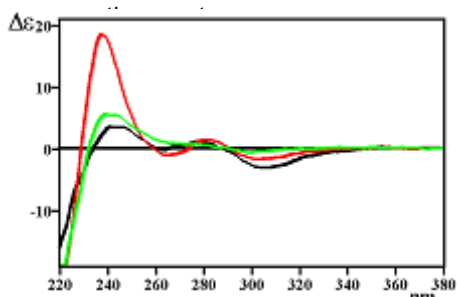


Figura 4.4. Espectres de DC de les espècies $Zn_yHg_4^-$ MT i Hg_5^- MT, obtingudes afegint $HgCl_2$ a Zn_3^- MT a pH 7 a $t=24h$, i $Zn_2Hg_4^-$ MT, obtinguda afegint-li a $t=0h$

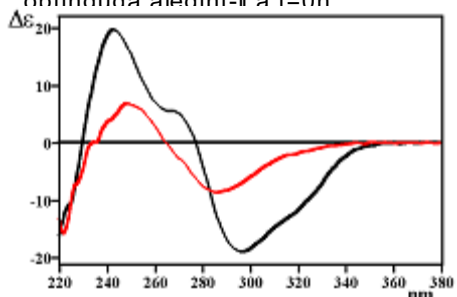


Figura 4.5. Espectres de DC de l'espècie Hg_{10}^- MT obtinguda afegint $HgCl_2$ a Zn_3^- MT a pH 7 a $t=24h$ i $t=0h$.

trigonal-digonal tendint cap a la digonal per a la darrera espècie proposada.

La comparació dels entorns de coordinació del Hg(II) en les espècies detectades en aquesta valoració amb els dels agregats metàl·lics proposats a $t=24h$ sembla indicar un lleuger "avançament" de la valoració efectuada a $t=0h$ respecte a la de $t=24h$ ja que en el primer cas el Hg(II) adopta geometries de coordinació que es detecten a $t=24h$ per a espècies amb un nombre d'equivalents de Hg(II) superior.

4.1.3. Valoració de Zn_3^- MT amb $Hg(ClO_4)_2$ a pH 7 a $t=24h$ (LÀMINA 10)

L'estequiometria de les espècies que es formen quan Zn_3^- MT és valorada amb $Hg(ClO_4)_2$ a pH 7 i a $t=24h$ i la geometria de coordinació que el Hg(II) presenta en la majoria d'elles són anàlogues a les observades quan a la mateixa proteïna se li addiciona $HgCl_2$ en les mateixes condicions. Tot i així, cal destacar que ambdues valoracions evolucionen per camins de reacció diferents a partir de la formació de $Zn_yHg_4^-$ MT.

La comparació de les dades de DC d'ambdues valoracions permet detectar que la disminució de la intensitat de la banda assignada al Zn(II) coordinat a la proteïna és similar si es comparen les espècies $Zn_xHg_1^-$ MT obtingudes addicionant $HgCl_2$ o $Hg(ClO_4)_2$ (Figura

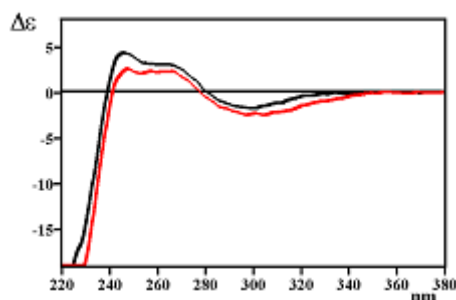


Figura 4.6. Espectres de DC de l'espècie $Zn_xHg_1^-$ MT obtinguda afegint $HgCl_2$ a Zn_3^- MT a pH 7 a $t=24h$ o afegint-hi $Hg(ClO_4)_2$.

4.6.). En canvi, per a l'espècie $Zn_yHg_4^-$ MT s'observa una disminució molt més acusada de la intensitat d'aquesta banda en el cas de la valoració efectuada amb $Hg(ClO_4)_2$ (Figura 4.7.). Tot això indica que si bé s'ha proposat la mateixa estequiometria $Zn_xHg_1^-$ MT i $Zn_yHg_4^-$ MT per a les espècies obtingudes en ambdues valoracions, molt probablement el valor de x sigui el mateix en els dos casos però el de y sigui inferior en l'agregat assolit amb l'addició de $Hg(ClO_4)_2$. Així mateix, s'observa que, independentment de la seva estructura, les espècies amb una relació estequiomètrica Hg(II): MT superior a 4 presenten uns espectres de DC quatre vegades menys intensos en el cas de la valoració amb $Hg(ClO_4)_2$ (Figura 4.8.).

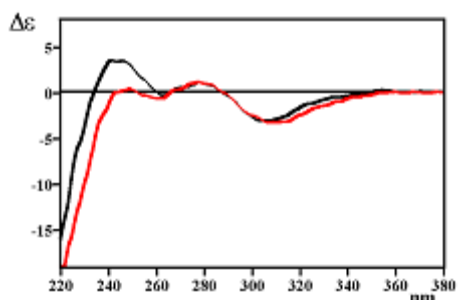


Figura 4.7. Espectres de DC de l'espècie $Zn_yHg_4^-$ MT obtinguda afegint $HgCl_2$ o $Hg(ClO_4)_2$ a Zn_3^- MT a pH 7 a t=24h.

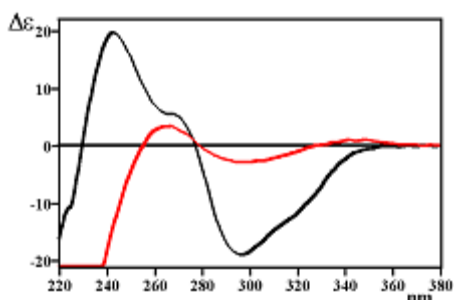
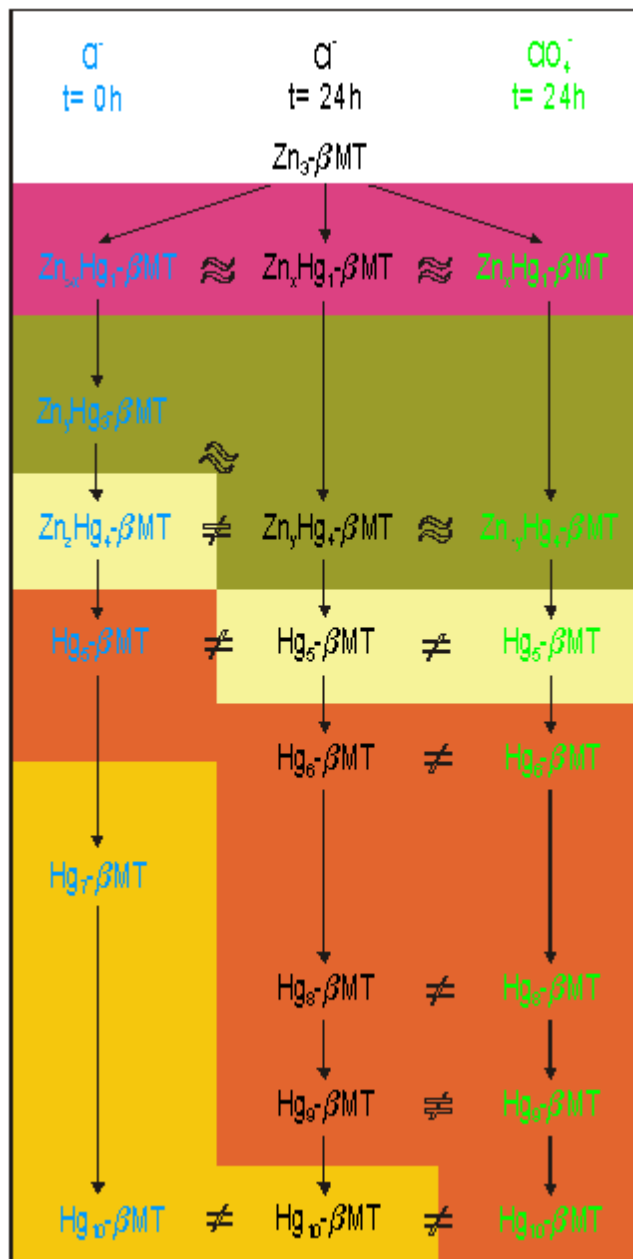
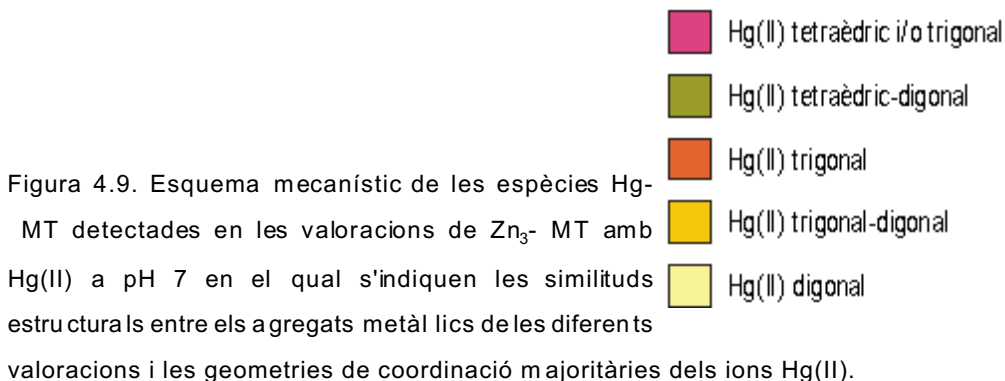


Figura 4.8. Espectres de DC de l'espècie Hg_{10}^- MT obtinguda afegint $HgCl_2$ o $Hg(ClO_4)_2$ a Zn_3^- MT a pH 7 a t=24h.



4.1.4. Conclusions per a la valoració de Zn_3^- MT recombinant de ratolí a pH 7

Les discussions i comparacions realitzades per a les valoracions de Zn_3^- MT amb Hg(II) a pH 7 permeten proposar l'esquema de reacció següent i arribar a les conclusions generals que es detallen tot seguit.



Els mecanismes de reacció de les tres valoracions són anàlegs fins a la formació de les espècies $Zn_xHg_1^-$ MT i $Zn_yHg_{3,4}^-$ MT. A partir d'aquest punt cada valoració evoluciona per un camí de reacció diferent donant lloc a espècies diferents.

En contra del que s'ha observat pel fragment , en aquest cas la substitució de Zn(II) per Hg(II) és més ràpida en absència de Cl⁻ en el medi.

El fet que l'espècie $Zn_yHg_3^-$ MT obtinguda a t=0h presenti una estructura semblant a la de $Zn_yHg_4^-$ MT assolida a t=24h indica que en la primera valoració es constitueixen amb menys equivalents de Hg(II) espècies que, termodinàmicament, requereixen un nombre superior de Hg(II) per a la seva formació. Aquest "avançament" de la valoració realitzada a t=0h també es detecta en l'evolució de les geometries de

coordinació que prèn el Hg(II) en les diferents espècies detectades. Així, en la valoració efectuada a $t=0h$ s'observa que espècies amb la mateixa relació molar Hg(II): MT que les obtingudes a $t=24h$ presenten Hg(II) amb entorns de coordinació característics d'espècies assolides a $t=24h$ amb una relació estequiomètrica major.

A partir de $Zn_{y,z}Hg_4$ - MT, les espècies obtingudes en la valoració amb $HgCl_2$ i a $t=24h$ presenten un grau d'estructuració major que les assolides a $t=0h$ i amb $Hg(ClO_4)_2$. Això indica que, a pH 7, per tal d'assolir els agregats Hg(II)- MT de major estructuració cal realitzar les valoracions sota control termodinàmic i en presència de Cl^- al medi.

La geometria de coordinació majoritària del Hg(II) en les espècies proposades, la qual es mostra amb zones ombrejades a l'esquema, apareix segons l'ordre: tetraèdric, digonal i trigonal, si bé es detecten espècies amb Hg(II) mixtes tetraèdrics-digonal i trigonals-digonal.

Que a $t=24h$ la geometria de coordinació del Hg(II) no varii entre les espècies obtingudes en les valoracions efectuades addicionant $HgCl_2$ o $Hg(ClO_4)_2$ indica que probablement el Cl^- no participa en els enllaços primaris del Hg(II) dels agregats Hg(II)- MT.

El fet que la presència de Cl^- o ClO_4^- al medi determini el grau d'estructuració de les espècies assolides porta a concloure que en els agregats Hg(II)- MT el Hg(II) interacciona amb el Cl^- donant lloc a enllaços secundaris que permeten una estructuració addicional del cluster metàl·lic format.

*BLOC II. Descripció i discussió dels resultats
experimentals:*

*Estudi de la capacitat coordinant de MT
recombinant de ratolí i dels seus fragments
i enfront de Hg(II), MeHg⁺ i Pb(II)*

eq de Hg(II) adopten una geometria de coordinació tetraèdrica mentre que el 3r presenta contribucions inferiors de les bandes assignades a aquesta coordinació i un augment de l'atribuïda a la geometria digonal. Així doncs, en aquesta espècie el Hg(II) mostra un entorn de coordinació mixte tetraèdric-digonal.

Hg₄⁻ MT

DC: L'addició d'aquest 4t eq de Hg(II) causa la formació de bandes poc intenses i amples: positiva entre 235 i 255 nm i negativa entre 280 i 350 nm. Aquest espectre mostra que l'espècie Hg₄⁻ MT és un intermedi detectable des de Hg₃⁻ MT cap a Hg₅⁻ MT perquè presenta unes bandes que es desenvolupen del tot per a l'agregat metàl·lic següent.

UV: S'observa un augment de l'absorció força brusc en tot el rang de (Figura 4.10.).

ED: Mostra la presència d'absorpcions a 230 nm, assignades a Hg(II) digonal, però també a 240, 260 i 280 nm les quals s'assignen a Hg(II) tetraèdric i/o trigonal. El fet que la següent addició de Hg(II) presenti un ED característic de Hg(II) trigonal de tipus MerR determina que es proposi que Hg₄⁻ MT presenta Hg(II) amb entorns de coordinació mixtes digonals-trigonals.

Hg₅⁻ MT

DC: Des del 3r fins al 5è eq de Hg(II) afegits s'observa la formació d'un cluster molt similar al que s'ha descrit per a les darreres espècies de la valoració duta a terme a pH 7 a t=24h, Hg₆⁻ MT, Hg₈⁻ MT, Hg₉⁻ MT i Hg₁₀⁻

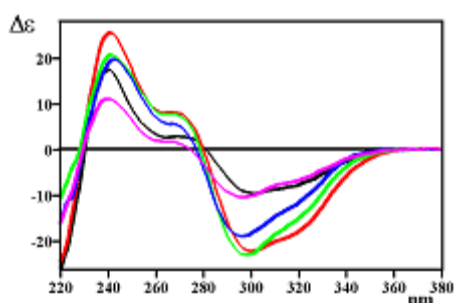


Figura 4.11. Espectres de DC de les espècies: Hg₆⁻ MT, Hg₈⁻ MT, Hg₉⁻ MT i Hg₁₀⁻ MT obtingudes afegint HgCl₂ a Zn₃⁻ MT a pH 7 a t=24h i Hg₅⁻ MT obtinguda afegint-li a pH 3 a t=24h.

MT (Figura 4.11.).

UV: Tots els eq de Hg(II) afegits provoquen canvis de pendent en l'absorció fins a arribar a aquest 5è eq. A partir d'aquest punt l'absorció augmenta en tot el rang de si bé hi ha una disminució del pendent a partir del 6è i 7è eq de Hg(II) afegits (Figura 4.10.).

ED: S'observa un canvi en la contribució gaussiana que genera els espectres la qual indica que el 5è eq de Hg(II) afegit presenta únicament Hg(II) trigonal de tipus MerR.

Hg₇⁻ MT

DC: S'observa un desplaçament general cap a inferiors de totes les bandes formades en l'espècie anterior. Així mateix, les bandes situades a 240(+), 268(+), i 320(-) nm disminueixen la seva intensitat, o potser fins i tot desapareixen les dues darreres, i la primera es descomposa en dues més centrades a 236(+) i 252(+) nm.

ED: Tot i que continua havent-hi la participació gaussiana assignada a Hg(II) trigonal de tipus MerR, aquesta espècie presenta també Hg(II) digonal. La disminució global i la desaparició final de les contribucions atribuïdes a Hg(II) trigonal indica que les espècies següents només presenten Hg(II) digonal.

Hg₉⁻ MT

DC: L'addició d'aquests dos nous eq de Hg(II) causa una disminució de la intensitat de les bandes menys energètiques i també un desplaçament de la centrada a 287(-) nm fins a 279 nm. S'observa, però, que l'embolcall espectral continua essent similar al de les espècies anteriors però desplaçat cap a inferiors (Figura 4.12.).

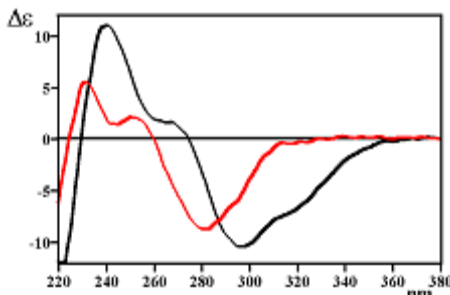


Figura 4.12. Espectres de DC de les espècies **Hg₅⁻ MT** i **Hg₉⁻ MT** obtingudes afegint HgCl₂ a Zn₃⁻ MT a pH 3 a t=24h.

Hg₁₂⁻ MT

DC: S'observen el mateix tipus de canvis espectrals que els descrits en l'etapa anterior fins a assolir la saturació de la proteïna per a 12 eq de Hg(II) afegits a partir dels quals l'espectre de DC que mostra l'addició següent no modifica aquest sinó que s'hi sobreposa.

4.2.2. Valoració de Zn₃⁻ MT amb HgCl₂ a pH 3 a t=0h (LÀMINA 12)

La comparació de les dades espectroscòpiques enregistrades al llarg de la valoració de Zn₃⁻ MT (apo- MT) recombinant de ratolí amb HgCl₂ a pH 3 a t=0h amb les de l'efectuada a t=24h, permet afirmar que l'evolució de

l'apo- MT en presència de $HgCl_2$ procedeix per un mecanisme de reacció totalment diferent en ambdós casos tot i que l'estequiometria de les espècies formades és la mateixa excepte en que, en aquest cas, no s'arriba a la formació de Hg_{12}^- MT sinó que la saturació de la proteïna s'assoleix per a 9 eq de $Hg(II)$.

L'anàlisi dels espectres de DC d'aquestes espècies indica que Hg_3^- MT presenta una estructura probablement similar a la corresponent a $t=24h$ (Figura 4.13.) però, a diferència d'aquesta, els ED indiquen que tots els ions $Hg(II)$ presenten una geometria de coordinació tetraèdrica. Hg_5^- MT presenta una estructura diferent de la de l'agregat format a $t=24h$ (Figura 4.14.) i, tot i que el $Hg(II)$ presenta el mateix entorn de coordinació, no prové d'un intermedi amb geometria de coordinació mixta sinó únicament digonal. L'addició del 6è eq de $Hg(II)$ provoca un canvi estructural dramàtic, ben diferent del que té lloc en la valoració a $t=24h$, el qual porta, en addicionar el 7è eq, a la formació d'una estructura força quiral que pràcticament no varia en afegir més ions de $Hg(II)$ tot i que la saturació de la proteïna no s'assoleix fins a l'addició del 9è eq.

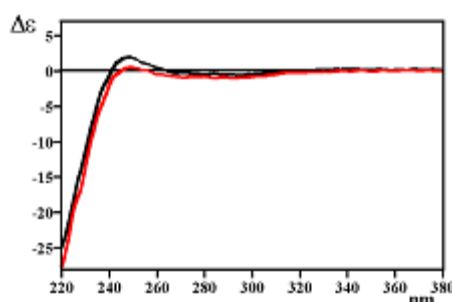


Figura 4.13. Espectre de DC de l'espècie Hg_3^- MT obtinguda afegint $HgCl_2$ a Zn_3^- MT a pH 3 a $t=24h$ i $t=0h$.

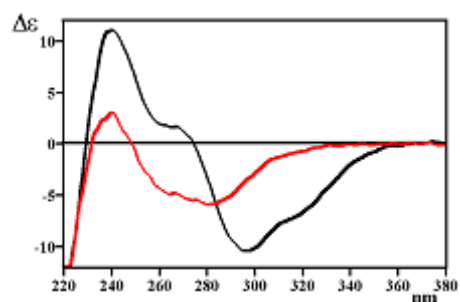


Figura 4.14. Espectre de DC de l'espècie Hg_5^- MT obtinguda afegint $HgCl_2$ a Zn_3^- MT a pH 3 a $t=24h$ i $t=0h$.

4.2.3. Valoració de Zn_3^- MT amb $Hg(ClO_4)_2$ a pH 3 a t=24h (LÀMINA 13)

La seqüència de les espècies que es formen quan Zn_3^- MT (apo- MT) es valora amb $Hg(ClO_4)_2$ a pH 3 i a t=24h és gairebé la mateixa que la de les valoracions efectuades amb $HgCl_2$ excepte en que en aquesta valoració es forma Hg_{10}^- MT i no Hg_9^- MT. Tot i així, l'anàlisi de les dades de DC mostra que les espècies assolides al llarg d'ambdues valoracions, malgrat la seva coincidència estequiomètrica, són estructuralment ben diferents (Figures 4.15., 4.16., 4.17. i 4.18.), amb l'excepció de Hg_3^- MT, d'estructura molt poc quiral (Figura 4.15.). Les dades dels ED indiquen que, excepte la primera espècie, Hg_3^- MT, la qual presenta en aquest cas tots els ions $Hg(II)$ amb una geometria de coordinació tetraèdrica, l'entorn de coordinació del $Hg(II)$ en tots els agregats $Hg(II)^-$ MT formats coincideix en ambdues valoracions.

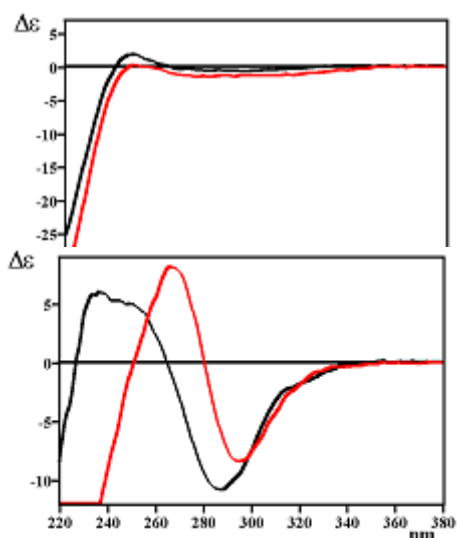


Figura 4.17. Espectres de DC de l'espècie Hg_7^- MT obtinguda afegint $HgCl_2$ o $Hg(ClO_4)_2$ a Zn_3^- MT pH 3 a t=24h.

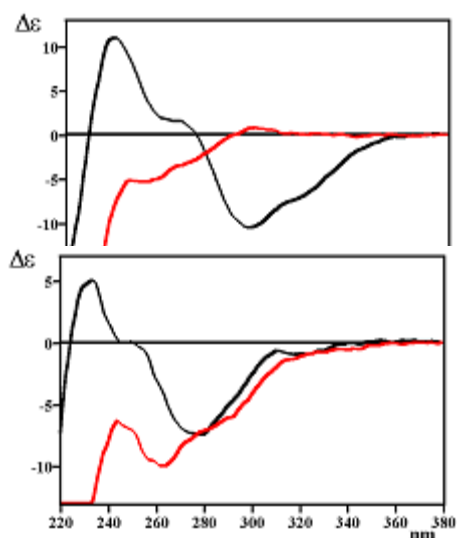


Figura 4.18. Espectres de DC de l'espècie Hg_{12}^- MT obtinguda afegint $HgCl_2$ o $Hg(ClO_4)_2$ a Zn_3^- MT a pH 3 a t=24h.

4.2.3. Conclusions per a la valoració de Zn₃- MT recombinant de ratolí a pH 3

La comparació de totes les dades i les discussions realitzades respecte al comportament de Zn₃- MT (apo- MT) en ser valorada amb Hg(II) a pH

3 porten a proposar l'esquema global i les conclusions generals següents.

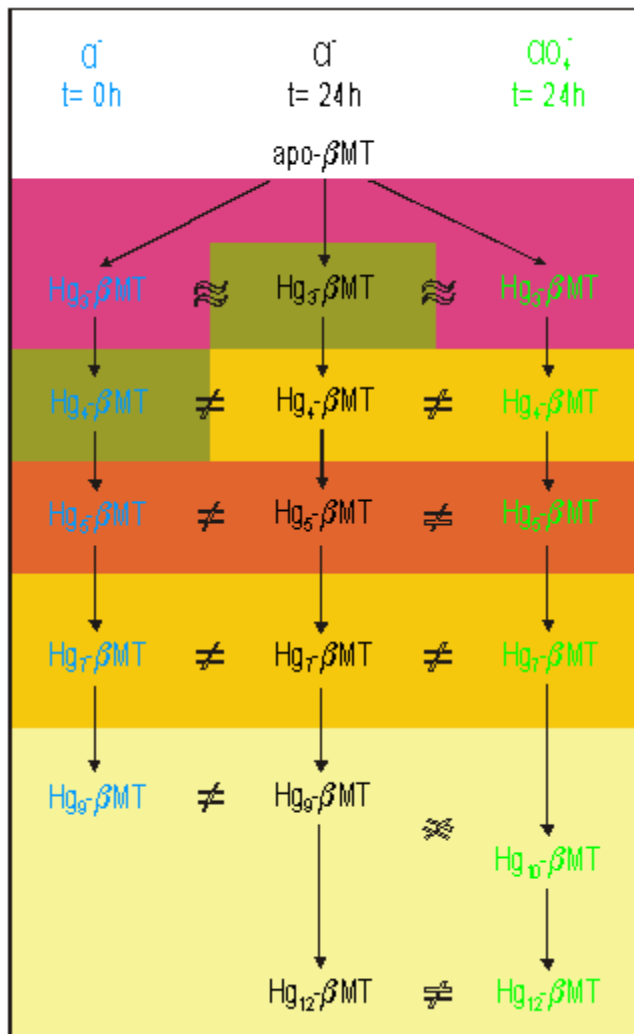


Figura 4.19. Esquema mecanístic de les espècies Hg-MT detectades en les valoracions de Zn₃- MT amb Hg(II) a pH 3 (apo- MT) en el qual s'indiquen les similituds

estructurals entre els agregats metàl·lics de les diferents valoracions i les geometries de coordinació majoritàries dels ions Hg(II).

Els mecanismes de reacció de les tres valoracions són anàlegs fins a la formació de la primera espècie, Hg₃- MT. A partir d'aquest agregat, els camins de reacció que suposa la incorporació de més equivalents de Hg(II) a la proteïna són diferents en les tres valoracions. Així, es pot afirmar que el temps d'estabilització permès a cada equivalent afegit i la presència o absència de Cl⁻ determina el mecanisme de reacció que segueix l'espècie Hg₃- MT en afegir més ions Hg(II).

Les espècies Hg(II)- MT que es formen en les tres valoracions presenten les mateixes estequiometries Hg(II): MT fins a la formació de Hg₇- MT.

En la valoració efectuada amb HgCl₂ a t=0h s'arriba a la saturació de la proteïna per a 9 eq de Hg(II) afegits, i no per a 12 com les altres dues valoracions.

En la valoració efectuada afegint Hg(ClO₄)₂ es forma Hg₁₀- MT en comptes de Hg₉- MT.

Pel que fa al grau d'estructuració de les espècies obtingudes en les tres

valoracions cal destacar diferents situacions:

La coordinació dels primers equivalents de Hg(II) a l'apo- MT dóna lloc, en les tres valoracions, a unes espècies Hg_3^- MT i Hg_4^- MT molt poc quirals, i per tant, amb uns graus d'estructuració molt baixos. Tot i així, cal destacar que la quiralitat de l'espècie Hg_4^- MT obtinguda afegint $Hg(ClO_4)_2$ és inferior que la de la mateixa espècie obtinguda amb $HgCl_2$.

Hg_5^- MT presenta una estructura molt més quiral en la valoració efectuada amb $HgCl_2$ a $t=24h$.

Les espècies Hg_7^- MT presenten estructures diferents però de quiralitat comparable (Figura 4.20.).

L'estructura de les darreres espècies obtingudes afegint $Hg(ClO_4)_2$ mostra un descens molt fort de la quiralitat mentre que en

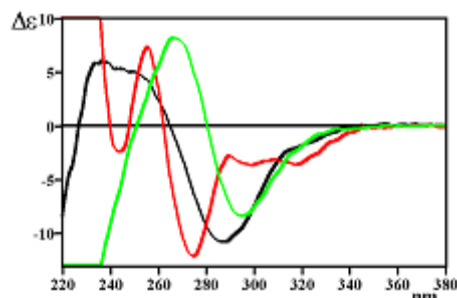


Figura 4.20. Espectres de DC de l'espècie Hg_7^- MT obtinguda afegint $HgCl_2$ a Zn_3^- MT a pH 3 a $t=24h$ i $t=0h$ i afegint-hi $Hg(ClO_4)_2$.

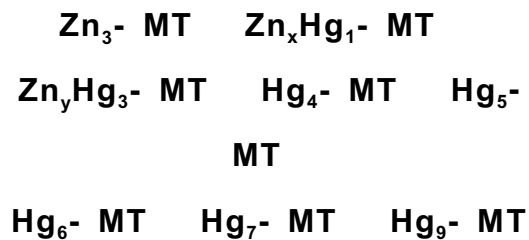
presència de Cl^- mantenen el grau d'estructuració propi de Hg_7^- MT.

Així doncs, tot això porta a concloure, d'una banda, que la presència de Cl^- o ClO_4^- repercuteix més significativament en el grau d'estructuració dels agregats Hg(II)- MT formats al final de les valoracions. La segona conclusió que cal destacar és que a $t=0h$ no sembla que hi hagi una manca d'estructuració causada per un temps d'estabilització insuficient sinó que es formen espècies amb estructures diferents. A més a més, el fet que la saturació de la proteïna s'assoleixi per a un nombre d'eq de Hg(II) inferior al de la valoració realitzada a $t=24h$, 9 eq de Hg(II) respecte a 12, indica que la valoració efectuada a $t=0h$ s'avança a la que procedeix a $t=24h$.

La geometria de coordinació majoritària del Hg(II) s'indica amb zones ombrejades a l'esquema. S'observa que, malgrat les diferències estructurals, les espècies formades a partir de Hg_4^- - MT mostren el mateix entorn de coordinació per a una mateixa relació molar Hg(II): MT. Tot això indica que la presència de Cl^- fa que augmenti el grau d'estructuració de les espècies, però el fet que la geometria de coordinació del Hg(II) en totes elles sigui independent de la seva presència fa proposar que l'augment estructural és causat per interaccions Cl^- - Hg(II) en la segona esfera de coordinació del Hg(II).

4.3. Valoració de Zn_3^- MT recombinant de ratolí amb $HgCl_2$ a pH variable (LÀMINA 14)

L'esquema de reacció que segueix Zn_3^- MT quan és valorada amb $HgCl_2$ a pH variable és el següent:



Una anàlisi exhaustiva de les dades espectroscòpiques de DC, absorció UV-Visible i diferència d'aquestes darreres enregistrades al llarg d'aquesta valoració i una comparació d'aquestes amb les de les valoracions efectuades a pH 7 i a pH 3 posa de manifest que aquest procés evoluciona a pH 7 fins a l'addició del 6è eq de $Hg(II)$ i que a partir d'aquest punt transcorre a pH 3.

Així, la superposició dels espectres de DC de les espècies $Zn_xHg_1^-$ MT, $Zn_yHg_3^-$ MT, Hg_4^- MT, Hg_5^- MT i Hg_6^- MT assolides a pH variable amb els corresponents als agregats de la

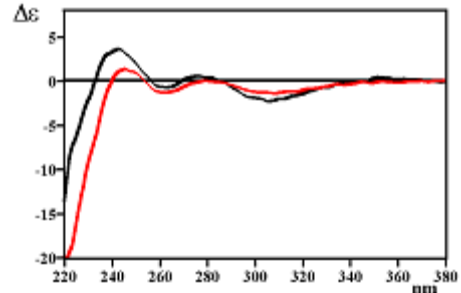


Figura 4.21. Espectres de DC de les espècies: $Zn_yHg_3^-$ MT, obtinguda afegint $HgCl_2$ a Zn_3^- MT a pH 7 a $t=0h$, i $Zn_yHg_3^-$ MT, obtinguda afegint-li a pH variable.

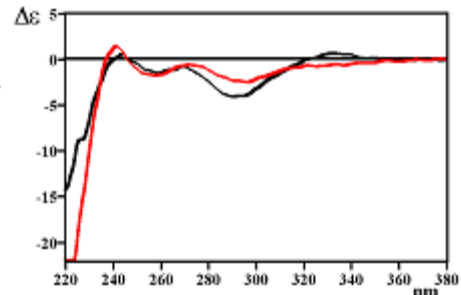


Figura 4.22. Espectres de DC de l'espècie Hg_5^- MT obtinguda afegint $HgCl_2$ a Zn_3^- MT a pH 7 a $t=0h$ i a pH variable.

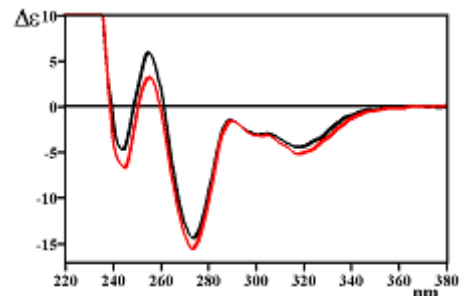


Figura 4.23. Espectres de DC de l'espècie Hg_9^- MT obtinguda afegint $HgCl_2$ a Zn_3^- MT a pH 3 a $t=0h$ i a pH variable.

mateixa estequiometria obtinguts a pH 7 indica que aquestes espècies presenten estructures similars (Figures 4.21. i 4.22.). De la mateixa manera es pot afirmar que l'espècie Hg_9^- MT d'aquesta valoració i la de la mateixa estequiometria detectada a pH 3 també presenten una estructura molt propera (Figura 4.23.). Els ED indiquen que en tots els casos la geometria de coordinació del Hg(II) en totes les espècies coincideix amb la de les equivalents a pH 7 i 3.

4.4. Conclusions del comportament de Zn_3^- MT recombinant de ratolí a diferents pH

L'anàlisi i discussió de les dades corresponents a la valoració de Zn_3^- MT amb Hg(II), addicionat en forma de $HgCl_2$ o $Hg(ClO_4)_2$, a diferents pH, 7, 3 i variable, i amb diferents temps d'estabilització, $t=0h$ i $t=24h$, permeten establir el comportament coordinatiu del fragment enfront Hg(II) i proposar l'esquema de reacció i les conclusions següents.

Els resultats obtinguts en la valoració de Zn_3^- MT amb Hg(II) destaquen per la seva diversitat en funció de les variables pH, Cl^- o ClO_4^- i temps d'estabilització.

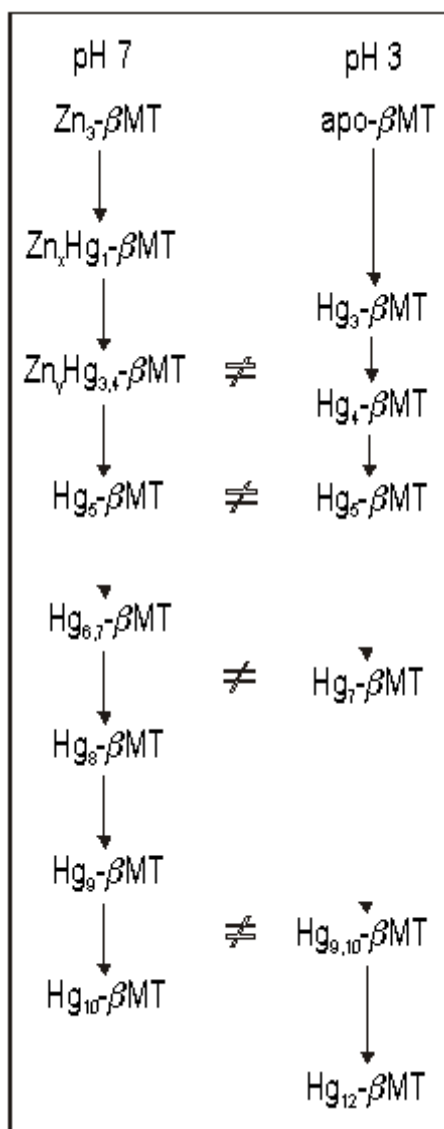


Figura 4.24. Esquema general de les espècies detectades al llarg de la valoració de Zn_3^- MT amb Hg(II).

Aquestat diversitat és molt superior a la que s'observa en el fragment de la MT.

Independentment del pH, del temps d'estabilització i de la sal de Hg(II) addicionada, la coordinació de Hg(II) a Zn_3^- MT dóna lloc a un elevat nombre d'espècies Hg(II)- MT. La quantitat d'agregats detectada és superior a pH 7 que a pH 3 i es pot afirmar que a pH neutre s'obté gairebé un continu d'estequiometries Hg(II): MT.

Els mecanismes de reacció que porten a la formació de les espècies $Zn_yHg_{3,4}^-$ MT i Hg_3^- MT obtingudes respectivament a pH 7 i 3, així com les seves estructures, són independents del temps d'estabilització i de l'addició de $HgCl_2$ o $Hg(ClO_4)_2$, però l'estructura d'aquestes espècies difereix en ambdós pH a causa de que a pH 7 l'agregat metàl·lic conté Zn(II) coordinat. El Hg(II) d'aquestes espècies presenta una geometria de coordinació tetraèdrica o mixta tetraèdrica-digonal on els lligands són els S_{Cys} de la proteïna. En $Zn_yHg_{3,4}^-$ MT probablement part dels S_{Cys} terminals inicials esdevenen pontals.

L'espècie Hg_5^- MT es forma en les sis valoracions independentment del pH, del temps d'estabilització i de la sal de Hg(II) addicionada tot i que cada combinació d'aquests paràmetres determina una estructura diferent per a aquesta espècie (Figures 4.25. i 4.26.).

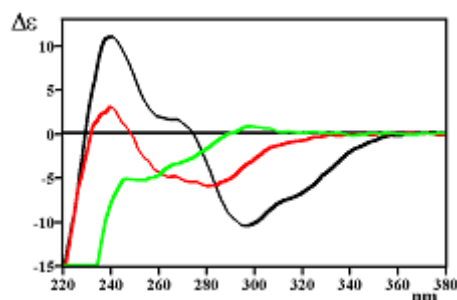


Figura 4.26. Espectres de DC de l'espècie Hg_5^- MT obtinguda afegint $HgCl_2$ a Zn_3^- MT a pH 3 a $t=24h$ i $t=0h$ i afegint-hi $Hg(ClO_4)_2$.

La geometria de coordinació del Hg(II) en aquestes espècies és trigonal a pH 3 i digonal a pH 7, excepte en la valoració amb HgCl₂ a t=0h on es detecta Hg(II) trigonal.

Les espècies amb una relació molar Hg(II): MT superior a 5 són estequiomètricament i estructuralment diferents a pH 7 o 3 i, a cada pH, aquestes difereixen també en funció del temps d'estabilització i de la sal de Hg(II) addicionada.

En el conjunt de les valoracions realitzades a pH 3 les espècies més estables són les que es formen més ràpidament (coincidència dels controls cinètic i termodinàmic). La similitud en el nombre, l'estequiometria i la geometria de coordinació del Hg(II) de les espècies detectades en la valoració de Zn₃- MT amb HgCl₂ a pH 7 a t=0h amb les anteriors és també indicativa de la coincidència de major estabilitat amb major velocitat de formació. En canvi, les restants valoracions a pH 7 segueixen criteris més termodinàmics que no pas cinètics.

Les geometries de coordinació que adopta el Hg(II) en les espècies formades al llarg de les valoracions segueix, independentment del pH, del temps d'estabilització i de la presència de Cl⁻ o ClO₄⁻ en el medi, l'ordre següent: tetraèdric, digonal, trigonal i quan el nombre d'equivalents de Hg(II) addicionat s'acosta al nombre de S_{Cys} de la proteïna, és a dir 9, les espècies tendeixen a tornar a presentar Hg(II) amb un entorn de coordinació digonal. Els espectres de diferència d'absorció UV-Visible de les espècies amb Hg(II) digonal formades en les etapes intermitja i final de les valoracions indiquen que probablement els lligands de l'entorn de coordinació del metall són diferents en aquests dos tipus d'espècies.

La utilització de $HgCl_2$ o $Hg(ClO_4)_2$ com a agent valorant de Zn_3^- MT a qualsevol dels pH estudiats posa de manifest que:

A pH 7, en la primera etapa de les valoracions, la presència de Cl^- en el medi provoca la retenció del Zn(II) coordinat a la proteïna durant més equivalents de Hg(II) afegits, i per tant, el nombre de Zn(II) que conté l'espècie $Zn_yHg_4^-$ MT és superior en el cas de la valoració efectuada afegint $HgCl_2$ que en la que s'utilitza $Hg(ClO_4)_2$.

El Cl^- no participa en la coordinació del Hg(II) de les espècies formades al principi de les valoracions ja que l'utilització de $HgCl_2$ o $Hg(ClO_4)_2$ com a agents valorants no comporta diferències significatives ni en la geometria de coordinació del Hg(II) ni en el grau d'estructuració dels clusters metàl·lics formats.

L'addició de $HgCl_2$ o $Hg(ClO_4)_2$ a $Zn_yHg_4^-$ MT a pH 7, o a Hg_3^- MT a pH 3, dóna lloc a mecanismes de reacció diferents i determina l'estructura de l'espècie Hg_5^- MT, la qual és molt menys quiral quan s'afegeix $Hg(ClO_4)_2$. Això permet concloure que probablement la presència de Cl^- al medi permet un conjunt d'interaccions en la segona esfera de coordinació del Hg(II) que determina l'increment d'estructuració d'aquesta espècie.

Quan a pH 7, s'afegeix $HgCl_2$ a Hg_5^- MT les espècies que es formen presenten quiralitats comparables a la de l'agregat Hg_5^- MT i superiors a les observades quan s'afegeix $Hg(ClO_4)_2$. En canvi, a pH 3 l'addició de $Hg(ClO_4)_2$ a Hg_5^- MT dóna lloc, primer a una espècie Hg_7^- MT de quiralitat comparable a la de l'assolida amb $HgCl_2$ però en afegir més equivalents de Hg(II) s'assoleixen agregats molt menys estructurats que en el cas d'afegir $HgCl_2$. Tot això permet afirmar que a partir de la

formació de Hg_5^- MT, el Cl^- continua participant activament en les interaccions secundàries del Hg(II) fins al final de la valoració, si bé a pH 3 és possible que no contribueixi en l'estructuració de l'espècie Hg_7^- MT.

Respecte al temps d'estabilització, ja s'ha esmentat que aquest paràmetre no determina, ni a pH 7 ni a pH 3, el mecanisme de reacció de la primera fase de les valoracions. Tot i així, en ambdós pH, les variacions en el temps d'estabilització permès causen efectes que cal comentar.

A pH 7, la primera espècie detectada, Zn_xHg_1^- MT, probablement conté més Zn(II) coordinat en l'agregat obtingut a $t=0\text{h}$ que l'assolit a $t=24\text{h}$. Així doncs, es pot afirmar que la retenció del Zn(II) coordinat a la proteïna és més efectiva en la valoració realitzada sota control cinètic.

La següent espècie proposada conté un equivalent de Hg(II) menys quan la valoració té lloc sota control cinètic, és a dir, es proposa Zn_yHg_3^- MT a $t=0\text{h}$ i Zn_yHg_4^- MT a $t=24\text{h}$, si bé la gran semblança entre els seus espectres de DC indica que molt probablement l'estructura d'aquests agregats és propera. Aquesta observació permet afirmar que hi ha un cert "avançament" de la primera valoració respecte a la segona, i per això sota control cinètic s'arriba a la detecció d'una espècie que en la valoració efectuada sota control termodinàmic conté un nombre de Hg(II) superior.

A partir de $\text{Zn}_y\text{Hg}_{3,4}^-$ MT, ambdues valoracions evolucionen per camins de reacció diferents si bé és destacable que en la realitzada a $t=0\text{h}$ s'assoleixen espècies amb un grau d'estructuració molt inferior al que presenten els agregats formats a $t=24\text{h}$. Per tant, es conclou que a partir del 3r o 4t equivalent de Hg(II) afegit el grau d'estructuració de les

espècies Hg(II)- MT formades depèn del temps d'estabilització donat a cada equivalent de Hg(II) i determina que els agregats constituïts a $t=0h$ presentin una quiralitat inferior als formats a $t=24h$.

A pH 3 l'addició del 4t equivalent de Hg(II) provoca la constitució d'espècies amb les mateixes estequiometries però estructures diferents a $t=0h$ i $t=24h$ les quals evolucionen per camins de reacció diferents en coordinar més equivalents de Hg(II). Cal destacar que les espècies assolides en ambdues valoracions presenten quiralitats i, per tant, graus d'estructuració, comparables i això porta a concloure que a pH 3 el temps d'estabilització no impedeix que els agregats Hg(II)- MT adquireixin el nivell d'estructuració que els és característic.

Malauradament, no ha estat possible establir comparacions entre els resultats obtinguts en aquesta part del treball i els de la bibliografia ja que no s'han trobat dades d'altres autors respecte al comportament del fragment de MT de mamífer enfront de Hg(II).

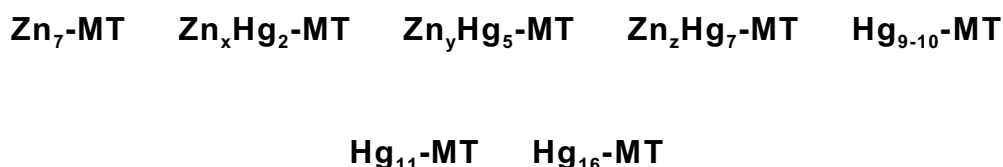
5. Comportament de Zn₇-MT recombinant de ratolí enfront de diferents sals de Hg(II)

En aquest capítol es presenta i discuteix el comportament de Zn₇-MT 1 recombinant de ratolí quan és valorada amb diferents sals de Hg(II) (HgCl₂ i Hg(ClO₄)₂), a diferents pH (7 i 3) i permetent diferents temps d'estabilització per a cada equivalent de Hg(II) afegit (t=24h i t=0h).

5.1. Valoració de Zn₇-MT recombinant de ratolí a pH 7

5.1.1. Valoració de Zn₇-MT amb HgCl₂ a pH 7 a t=24h (Làmina 15)

L'anàlisi detallada dels espectres de DC, absorció UV-Visible i diferència d'aquests darrers enregistrats durant la valoració de Zn₇-MT amb HgCl₂ a pH 7 i a t=24h permet postular que l'espècie inicial evoluciona, amb l'addició de Hg(II), segons l'esquema de reacció següent:



Les dades espectrals que permeten postular l'existència d'aquestes espècies es discuteixen resumidament a continuació.

Zn_xHg₂-MT

DC: Els dos primers equivalents de Hg(II) afegits provoquen la disminució isodicroica, a 254 nm, de la banda situada a 244(+) nm, assignada a la presència de cromòfors Zn(II)-S_{Cys}, i la formació de noves bandes a

superiors. Es postula que aquests dos primers equivalents de Hg(II) s'enllacen al cluster de partida desplaçant probablement algun ió de Zn(II) i causant així una reestructuració de l'agregat metàl·lic inicial.

UV: S'observa un increment lineal de l'absorció en tot el rang de (Figura 5.1.).

ED: Els dos primers eq de Hg(II) afegits causen el mateix efecte en la proteïna pel que fa al tipus d'absorpcions provocades i a la seva intensitat. Això confirma la cooperativitat del procés d'addició d'aquests 2 primers eq de Hg(II).

La descomposició dels ED en corbes gaussianes indica la necessitat de corbes a properes a 240, 260, 280 i 300 nm per tal

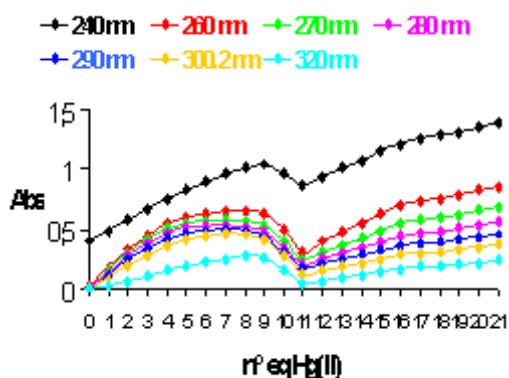


Figura 5.1. Representació gràfica de la variació de l'absorció a una determinada en funció del nombre d'equivalents de Hg(II) afegits al llarg de la valoració de Zn₇-MT amb HgCl₂ a pH 7 a t=24h.

de poder reproduir-los, la qual cosa indica que els ions de Hg(II) prenen una geometria de coordinació trigonal i/o tetraèdrica amb més S_{Cys} pontals dels que hi havia inicialment.

Zn_yHg₅-MT

DC: Per a 5 eq de Hg(II) afegits s'observa un espectre que indica clarament el final de la primera fase de la valoració. L'evolució des d'1 fins a 4 eq de Hg(II) afegits transcorre mitjançant un punt isodicroic a 270 nm si bé el procés no és cooperatiu. L'elevada intensitat de les bandes de l'espectre d'aquesta espècie indica que es tracta d'un agregat amb una estructura altament quiral.

UV: Des de l'inici de la valoració es segueix un procés d'increment de l'absorció fins a arribar a un màxim de les absorcions situades entorn de 280 nm per a 5 eq de Hg(II) afegits (Figura 5.2.).

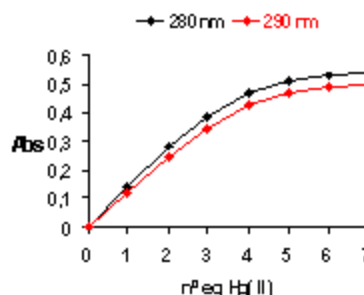


Figura 5.2. Representació gràfica de la variació de l'absorció a unes determinades en funció del nombre d'equivalents de Hg(II) afegits al llarg de l'addició d'1 a 7 eq de Hg(II) a Zn₇-MT a pH 7 a t=24h.

ED: Els espectres continuen mostrant la contribució de les mateixes bandes gaussianes que les corresponents als equivalents anteriors però menys intenses. També comencen a caler contribucions a superiors, a 320 nm, i inferiors, a 230

nm. Això indica que en aquesta espècie el Hg(II) adopta entorns de coordinació mixtes tetraèdrics i/o trigonals i digonals i que hi ha un augment en el nombre de S_{Cys} terminals que esdevenen pontals.

Zn₇Hg₇-MT

DC: Des de 5 fins a 7 eq de Hg(II) afegits té lloc un procés isodicroic a 253 nm, en el qual la intensitat de les bandes situades a 244(+), 281(-) i 300(+) nm decreix una mica i augmenta molt poc la de la banda centrada a 261(+) nm. Comença a adquirir més intensitat una nova banda centrada a 320(+) nm. Aquest espectre no mostra que aquesta sigui una espècie amb molta rellevància pròpia sinó que es pot considerar com una espècie intermèdia detectable en el pas cap a l'espècie següent.

UV: En aquesta fase de la valoració l'absorció centrada a 280 nm es manté gairebé constant i en la resta de l'espectre augmenta molt poc.

ED: Per a 7 eq de Hg(II) afegits la contribució de la banda a 280 nm ha desaparegut del tot. Per a aquesta espècie també es postula que el Hg(II) presenta un entorn de coordinació mixte tetraèdric i digonal on

probablement la major part dels S_{Cys} actuen com a lligands pontals.

Hg₉-MT

DC: Per a 9 eq de Hg(II) afegits han desaparegut les bandes situades a 244(+) i 281(+) nm, la banda centrada a 261(+) nm s'ha corregut fins a 269 nm i s'ha conformat totalment la banda centrada a 321(+) nm. La desaparició de la primera banda indica que tots els ions de Zn(II) es troben lliures en el medi.

UV: Des del 7è fins al 9è eq de Hg(II) afegits s'observa una lleugera disminució de l'absorció entre 260 i 320 nm.

ED: La descomposició d'aquest espectre com a sumatori de bandes gaussianes requereix una contribució positiva centrada entorn de 230 nm i negatives en la resta de l'espectre. Considerant que el màxim en la pèrdua d'aquestes darreres absorcions s'assoleix per a 11 eq de Hg(II) afegits es proposa que probablement en l'agregat Hg₉-MT existeixen Hg(II) amb entorns de coordinació mixtes tetraèdric i digonal.

Hg₁₁-MT

DC: L'espectre que s'obté per a 11 eq de Hg(II) afegits no suposa una continuació dels anteriors i és ben característic. Mostra bandes molt intenses, indicatives d'un grau d'estructuració molt elevat.

UV: Per a 11 eq de Hg(II) afegits s'observa el final d'una pèrdua d'absorció isobèstica des del 9è eq de Hg(II) afegit i l'inici d'un augment progressiu de l'absorció per a addicions de Hg(II) posteriors.

ED: S'observa el final de la tendència de les anteriors addicions de Hg(II) que comporten la pèrdua d'absorcions de baixa energia i només presenten contribucions positives en les absorcions al voltant de 230 nm. Hg₁₁-MT és probablement l'espècie on el Hg(II) presenta el nombre de coordinació més baix, digonal. Per analogia amb els espectres de DC de

proteïnes amb estructura d'hèlix (Figura 1.3.)¹⁴⁰ es postula que l'espècie Hg₁₁-MT podria presentar una estructura d'aquest tipus on els ions Hg(II) estarien enllaçats digonalment als S_{Cys} de la MT. Estudis de RMN previstos per a un futur no massa llunyà tenen com a objectiu corroborar aquesta hipòtesi.

Hg₁₆-MT

DC: Des d'11 fins a 16 eq de Hg(II) afegits s'observa una evolució isodicroica, a 258 i 324 nm, en la que es detecta la desaparició progressiva de totes les bandes descrites per a l'espècie amb 11 eq i la formació de bandes relativament poc intenses les quals indiquen que l'espècie Hg₁₆-MT presenta un grau d'estructuració baix. L'agregat format enllaça, però, més ions Hg(II) sense modificar massa la seva estructura.

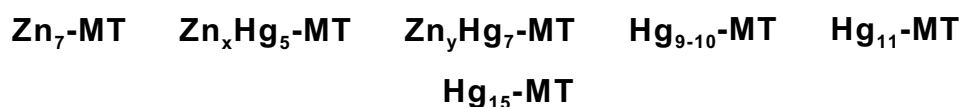
UV: S'observa un increment lineal de l'absorció des de d'11 fins a 16 eq de Hg(II) afegits. A partir del 16è eq de Hg(II) afegit l'augment d'absorció es redueix força tot i que es continua observant un pendent positiu en la representació gràfica de la variació d'aquesta amb l'addició de Hg(II) (Figura 5.1.).

ED: Des del 12è fins al 16è eq de Hg(II) afegits s'observen les mateixes contribucions en l'absorció les quals s'assignen bibliogràficament a Hg(II) trigonal en proteïnes de tipus MerR.¹⁶³ Es proposa, doncs, que l'espècie Hg₁₆-MT, formada cooperativament des de l'addició del 12è eq de Hg(II), presenta Hg(II) amb una geometria de coordinació essencialment trigonal de tipus MerR. La coordinació dels equivalents de Hg(II) posteriors té lloc amb la participació progressivament major de Hg(II) digonal.

5.1.2. Valoració de Zn₇-MT amb HgCl₂ a pH 7 a t=0h (Làmina

16)

Una comparació a grans trets de les dades espectroscòpiques enregistrades durant la valoració de Zn_7 -MT amb $HgCl_2$ a pH 7 i a $t=0h$ amb les de la mateixa valoració efectuada a $t=24h$ porta a afirmar que no hi ha grans divergències quant al mecanisme de reacció general de Zn_7 -MT i a l'estructura de les espècies de la mateixa estequiometria detectades en ambdues valoracions. No obstant això, una anàlisi exhaustiva de totes les fases de la valoració efectuada a $t=0h$ i dels agregats metàl·lics formats permet proposar l'esquema de reacció següent i detallar un seguit de diferències significatives respecte a la valoració realitzada a $t=24h$.



En l'esquema de reacció s'observa que no es forma l'espècie Zn_xHg_2 -MT, detectada a $t=24h$, sinó que l'agregat inicial evoluciona directament, però no de forma cooperativa, fins a l'espècie Zn_xHg_5 -MT. La comparació dels espectres de DC corresponents als primers eq de Hg(II) afegits de la valoració efectuada a $t=0h$ amb els de la realitzada a $t=24h$ permet observar que la intensitat la banda centrada a 244(+) nm, assignada al Zn(II) coordinat a la proteïna, es manté fins al segon eq de Hg(II) afegit quan es valora a $t=0h$ mentre que decreix quan la valoració s'efectua a $t=24h$, essent més intensa en el primer cas que en el segon. Aquest fet porta a postular que a $t=0h$ probablement el Zn(II) es manté enllaçat a la proteïna durant més addicions de Hg(II) que a $t=24h$.

Les espècies Zn_yHg_5 -MT i Zn_xHg_5 -MT detectades a $t=24h$ i $t=0h$ respectivament, mostren estructures anàlogues si bé s'observa que l'agregat format a $t=0h$ és menys quiral que l'obtingut a $t=24h$ (Figura 5.4.).

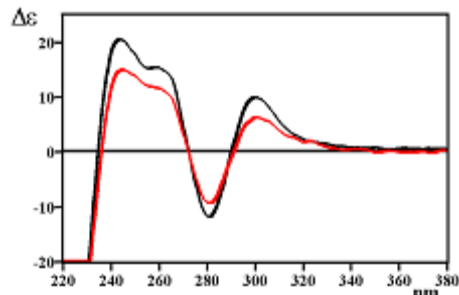


Figura 5.4. Espectres de DC de les espècies Zn_yHg_5 -MT i Zn_xHg_5 -MT obtingudes afegint $HgCl_2$ a Zn_7 -MT a pH 7 a $t=24h$ i $t=0h$ respectivament.

Les espècies Zn_zHg_7 -MT i Zn_yHg_7 -MT, obtingudes a $t=24h$ i $t=0h$ respectivament, presenten estructures similars i el Hg(II) amb el mateix tipus de geometria de coordinació en ambdós agregats. Tot i així, la major intensitat relativa de la banda de DC situada a $244(+)$ nm que mostra l'espècie Zn_zHg_7 -MT respecte a l'observada en l'espectre corresponent a Zn_yHg_7 -MT, indica que probablement el nombre de Zn(II) coordinats en la primera espècie és superior al de la darrera (Figura 5.5.).

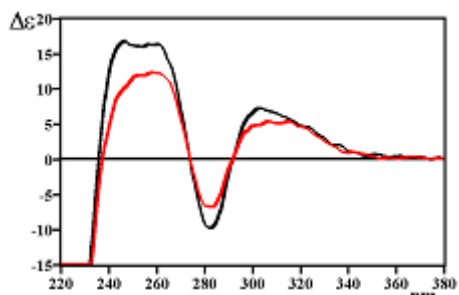


Figura 5.5. Espectres de DC de les espècies Zn_zHg_7 -MT i Zn_yHg_7 -MT obtingudes afegint $HgCl_2$ a Zn_7 -MT a pH 7 a $t=24h$ i $t=0h$ respectivament.

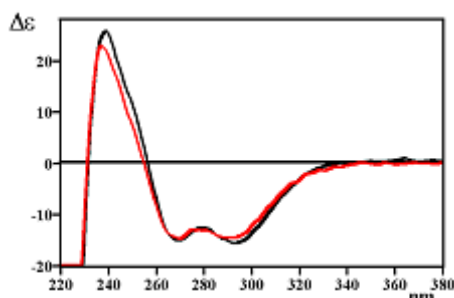


Figura 5.6. Espectres de DC de l'espècie Hg_{11} -MT obtinguda afegint $HgCl_2$ a Zn_7 -MT a pH 7 a $t=24h$ i $t=0h$.

A $t=0h$, la segona fase de la valoració condueix a una espècie amb 9 eq de Hg(II) segons els espectres de DC, però amb 10 eq segons els espectres d'absorció UV-Visible i de diferència. Aquesta discrepància entre les dades fa proposar una estequiometria Hg_{9-10} -

MT per a aquesta espècie. En base a l'evolució dels ED, a $t=0h$, l'11è eq de Hg(II) afegit és el que provoca l'adopció d'una coordinació plano-trigonal de tipus MerR del Hg(II). Així es proposa que és l'addició del 10è eq la que causa que el Hg(II) adopti el nombre de coordinació més baix, és a dir, digonal. Cal destacar que en l'espècie Hg_{11} -MT assolida a $t=0h$ el Hg(II) presenta un entorn de coordinació trigonal de tipus MerR mentre que en l'agregat obtingut a $t=24h$ el Hg(II) és digonal, però malgrat això l'estructura d'ambdós agregats és la mateixa (Figura 5.6.).

L'evolució des de Hg_{11} -MT fins a l'espècie final, en aquest cas amb 15 eq de Hg(II), té lloc isodicroicament, com en la valoració a $t=24h$, però transcorre a través d'uns punts isodicroics diferents, 262 i 321 nm, la qual cosa fa que l'espectre final i, per tant, l'estructura de la darrera espècie, sigui diferent de l'assolida en la valoració a $t=24h$ (Figura 5.7.).

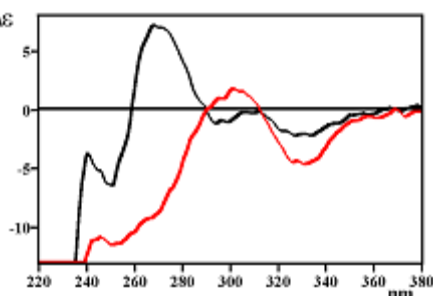


Figura 5.7. Espectres de DC de les espècies **Hg₁₆-MT** i **Hg₁₅-MT** obtingudes afegint HgCl₂ a Zn₇-MT a pH 7 a **t=24h** i **t=0h** respectivament.

En general, malgrat que els agregats amb la mateixa relació estequiomètrica Hg(II):MT a $t=24h$ i $t=0h$ presenten estructures similars, s'observa que aquestes són menys quirals per a les espècies formades a $t=0h$ que en les assolides a $t=24h$.

5.1.3. Valoració de Zn₇-MT amb Hg(ClO₄)₂ a pH 7 a $t=24h$ (Làmina 17)

De la mateixa manera que en la valoració anterior, en aquest apartat es comparen les dades espectrals obtingudes al llarg de la valoració de Zn₇-MT amb HgCl₂ a pH 7 a t=24h amb les corresponents a la mateixa valoració però afegint Hg(ClO₄)₂ com a agent valorant. En aquest cas, una primera anàlisi ja permet veure que el mecanisme de reacció d'ambdues valoracions és anàleg fins a la meitat d'aquestes i difereix en els darrers estadis. L'estequiometria Hg(II):MT de les espècies formades en aquesta valoració és la mateixa que la dels agregats detectats quan s'afegeix HgCl₂. Si bé s'observa que l'estructura i la geometria de coordinació dels Hg(II) de les espècies proposades són similars o iguals a les dels agregats obtinguts quan s'afegeix HgCl₂, també es detecten algunes diferències que cal comentar.

La comparació general dels espectres de DC de les espècies assolides en la primera meitat d'ambdues valoracions permet observar que la intensitat de les bandes, i per tant, el grau d'estructuració de les espècies, és molt superior en els agregats metàl·lics obtinguts amb HgCl₂ que en els detectats afegint Hg(ClO₄)₂. A més a més, la superposició dels espectres de DC de les espècies Zn₂Hg₇-MT d'ambdues valoracions permet observar que la intensitat relativa de la banda assignada al Zn(II) coordinat és superior en el cas d'afegir HgCl₂ que quan es valora amb Hg(ClO₄)₂ (Figura 5.8.). Això indica que probablement

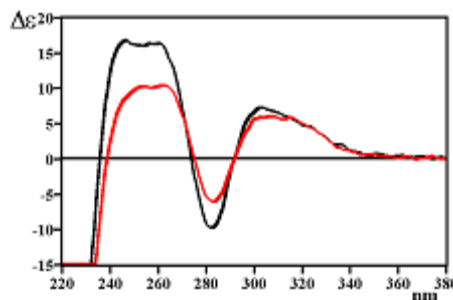


Figura 5.8. Espectres de DC de l'espècie Zn₂Hg₇-MT obtinguda afegint HgCl₂ o Hg(ClO₄)₂ a Zn₇-MT a pH 7 a t=24h.

l'espècie que s'obté en el primer cas conté un nombre de Zn(II) superior al de la segona.

$\text{Hg}_9\text{-MT}$ no mostra un espectre de DC perfectament superposable al de l'espècie equivalent obtinguda afegint HgCl_2 ni tampoc dóna lloc a un agregat $\text{Hg}_{11}\text{-MT}$ igual. Aquesta darrera espècie presenta una estructura

molt menys quiral en el cas d'obtenir-se addicionant $\text{Hg}(\text{ClO}_4)_2$ que HgCl_2 i fins i tot es pot interpretar que el seu espectre de DC mostra l'absència d'una banda positiva centrada al voltant de 240 nm (Figura 5.9.). La comparació dels ED corresponents a l'addició de

l'11è eq de $\text{Hg}(\text{II})$ d'ambdues valoracions permet observar que

mentre que en el cas d'afegir HgCl_2 s'obté un agregat amb $\text{Hg}(\text{II})$ digonal, quan es valora amb $\text{Hg}(\text{ClO}_4)_2$ aquesta espècie presenta $\text{Hg}(\text{II})$ amb entorns de coordinació mixtes digonal i trigonal.

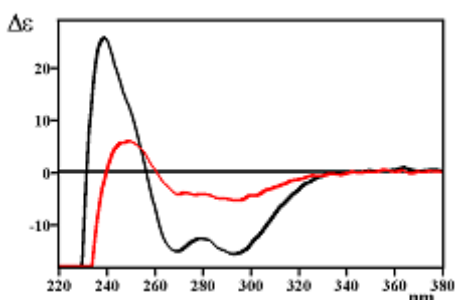


Figura 5.9. Espectres de DC de l'espècie $\text{Hg}_{11}\text{-MT}$ obtinguda afegint HgCl_2 o $\text{Hg}(\text{ClO}_4)_2$ a $\text{Zn}_7\text{-MT}$ a pH 7 a $t=24\text{h}$.

La darrera espècie proposada, $\text{Hg}_{16}\text{-MT}$, presenta una estructura diferent

en el cas de valorar amb HgCl_2 o $\text{Hg}(\text{ClO}_4)_2$ essent molt menys quiral en el segon cas (Figura 5.10.). Els ED indiquen que el $\text{Hg}(\text{II})$ presenta un

entorn de coordinació trigonal en ambdós agregats però el fet que les absorpcions que generen els ED no es trobin a les mateixes demostra que

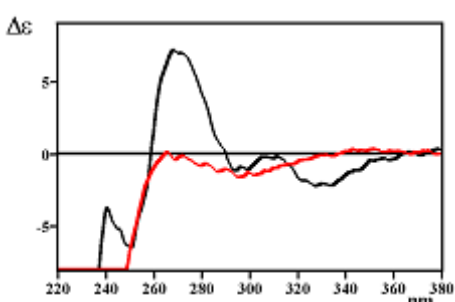


Figura 5.10. Espectres de DC de l'espècie $\text{Hg}_{16}\text{-MT}$ obtinguda afegint HgCl_2 i $\text{Hg}(\text{ClO}_4)_2$ a $\text{Zn}_7\text{-MT}$ a pH 7 a $t=24\text{h}$.

molt probablement els lligands als que el Hg(II) es coordina no són els mateixos en ambdues espècies.

5.1.4. Conclusions per a la valoració de Zn₇-MT recombinant de ratolí a pH 7

La comparació de les dades discutides per a les valoracions de Zn₇-MT amb Hg(II) a pH 7 permet proposar l'esquema global següent i les

conclusions que es detallen a continuació.

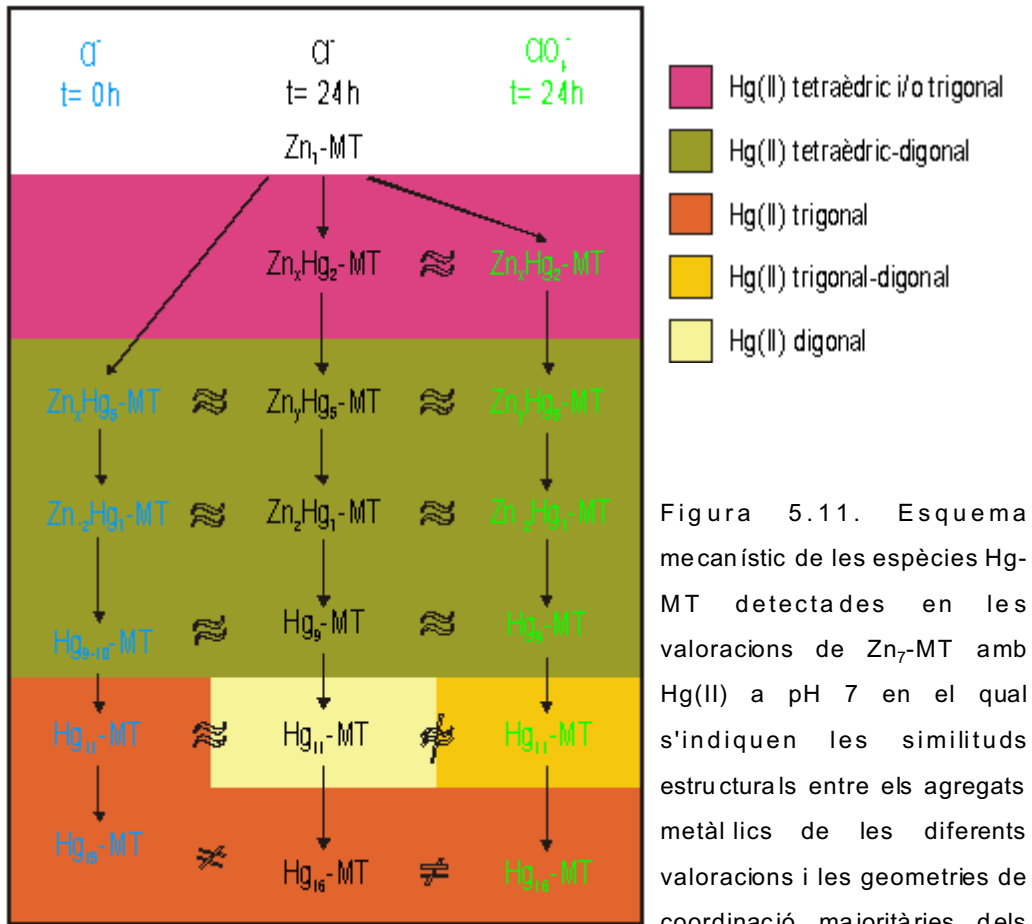


Figura 5.11. Esquema mecanístic de les espècies Hg-MT detectades en les valoracions de Zn₇-MT amb Hg(II) a pH 7 en el qual s'indiquen les similituds estructurals entre els agregats metàl·lics de les diferents valoracions i les geometries de coordinació majoritàries dels ions Hg(II).

ions Hg(II).

El mecanisme de reacció general que segueixen les tres valoracions és similar fins a arribar a la formació de l'espècie Hg₁₁-MT. A partir de Hg₁₁-MT el camí de reacció que segueix la incorporació de més Hg(II) és diferent en els tres casos.

A t=24h l'addició dels primers equivalents de Hg(II) desplaça un nombre de Zn(II) coordinats a la proteïna superior al que es desplaça en afegir el mateix nombre d'equivalents de Hg(II) a t=0h. Tot i així, el nombre de Zn(II) coordinats que es desplacen en el pas de Zn_xHg₅-MT a Zn_yHg₇-MT és superior en la valoració realitzada a t=0h que en l'efectuada a t=24h. Tot això indica que la substitució dels primers equivalents de Zn(II) per Hg(II) és un procés lent que pot transcórrer mitjançant control cinètic o termodinàmic. En canvi, un cop desplaçats aquests primers ions Zn(II), la resta són molt més ràpidament desplaçables, de manera que hi ha coincidència en els complexos obtinguts via control cinètic i termodinàmic.

La presència de Cl⁻ al medi provoca la retenció del Zn(II) coordinat a la proteïna. Així, la substitució total de Zn(II) per Hg(II) té lloc amb l'addició de menys equivalents de Hg(II) en el cas d'afegir Hg(ClO₄)₂ que HgCl₂ a t=24h.

L'estequiometria Hg(II):MT de les espècies detectades en les tres valoracions és la mateixa si bé en la valoració efectuada amb HgCl₂ a t=0h no es detecta la formació de Zn_xHg₂-MT. A més a més, en la valoració efectuada a t=0h s'obté l'espècie Hg₉₋₁₀-MT, l'estructura de la qual sembla correspondre a espècies d'estequiometria superior si es compara amb l'observat a t=24h.

Pel que fa al grau d'estructuració de les espècies detectades s'observa que els agregats Hg(II)-MT formats amb HgCl₂ sota control termodinàmic són, en general, més quirals que els obtinguts sota control cinètic i molt més que els que es formen quan s'addiciona Hg(ClO₄)₂.

A l'esquema que es presenta s'indica amb zones ombrejades l'entorn

de coordinació majoritari del Hg(II) en les diferents espècies proposades. S'observa que en les tres valoracions les primeres espècies detectades presenten Hg(II) tetraèdric i en addicionar més Hg(II) es formen agregats amb Hg(II) mixtes tetraèdrics i digonals, els quals incorporen més Hg(II) per donar lloc a espècies amb Hg(II) digonal. Finalment, es detecten espècies que contenen Hg(II) trigonal.

Pel que fa a la geometria de coordinació del Hg(II) de les espècies proposades cal remarcar que la diferència més rellevant entre les tres valoracions es detecta en l'agregat Hg₁₁-MT. Per un costat, comparant les valoracions en les que s'addiciona HgCl₂, s'observa que en la realitzada a t=0h aquesta espècie presenta Hg(II) amb la geometria de coordinació pròpia de les darreres espècies que es proposen en les valoracions, és a dir, trigonal, mentre que Hg₁₁-MT a t=24h presenta Hg(II) digonal. Això sembla indicar que hi ha un cert "avançament" de la valoració realitzada a t=0h respecte a l'efectuada a t=24h. D'altra banda, s'observen diferències en la geometria de coordinació del Hg(II) en l'agregat Hg₁₁-MT format en les valoracions realitzades a t=24h afegint HgCl₂ o Hg(ClO₄)₂. Això indica que probablement en aquesta espècie el Cl⁻ actua com a lligand completant l'entorn de coordinació del Hg(II) coordinat a la proteïna.

En l'espècie Hg₁₁-MT, el Cl⁻ pot participar com a lligand covalentment coordinat al Hg(II), i per això la seva presència determina la seva geometria de coordinació, però també és probable que intervingui activament en les interaccions secundàries amb el Hg(II) permetent així un increment en el grau d'estructuració del cluster format.

5.2. Valoració de Zn₇-MT recombinant de ratolí a pH 3

5.2.1. Valoració de Zn₇-MT amb HgCl₂ a pH 3 a t=24h (Làmina 18)

Les dades espectroscòpiques de DC, absorció UV-Visible i diferència d'aquestes darreres enregistrades al llarg de la valoració de Zn₇-MT (apo-MT a pH 3) amb HgCl₂ a pH 3 i a t=24h permeten proposar que l'evolució de l'espècie inicial en addicionar Hg(II) segueix l'esquema de reacció següent:



Seguidament es descriuen i discuteixen breument els espectres i les evolucions d'aquests les quals permeten postular l'existència d'aquestes espècies.

Hg₄-MT

DC: Els quatre primers eq de Hg(II) afegits es coordinen a l'apo-MT mitjançant un procés cooperatiu, amb un punt isodicroic a 273 nm, que transcorre amb la formació d'una banda ampla i força intensa centrada a 298(+) nm.

UV: L'absorció augmenta en tot el rang de fins a l'addició del 5è eq de Hg(II) (Figura 5.12.).

ED: L'addició dels 4 primers eq de Hg(II) causa aproximadament el mateix efecte en la proteïna. El desenvolupament d'aquests espectres en corbes gaussianes indica la necessitat de bandes a properes a 230, 260, 280 i 300 nm per tal de generar-los. La posició en què es troben aquestes absorpcions indica que el Hg(II) presenta entorns de coordinació trigonals i/o tetraèdrics. Malgrat que, com ja s'ha esmentat, no és possible

diferenciar entre la geometria de coordinació trigonal i tetraèdrica, només en base a les dades d'espectroscòpia electrònica en aquest cas sembla plausible proposar que el Hg(II) presenta un entorn tetraèdric ja que, per un costat, a pH 3 tots els S_{Cys} estan protonats, i, d'altra banda, és molt probable que, en aquestes condicions de disponibilitat de lligands i d'absència d'ions competidors, el Hg(II) prefereixi el major nombre de coordinació possible. D'altra banda, la presència de l'absorció centrada a 300 nm indica que probablement una part dels S_{Cys} actuen com a lligands pontals.

Hg₅-MT

DC: L'addició del 5è eq de Hg(II) provoca un petit corriment fins a 301 nm i un feble augment de la intensitat de la banda positiva de l'espectre anterior. Aquesta lleugera variació de l'espectre indica que l'estructura del cluster que es forma des d'un inici no varia apreciablement en afegir aquest darrer eq de Hg(II).

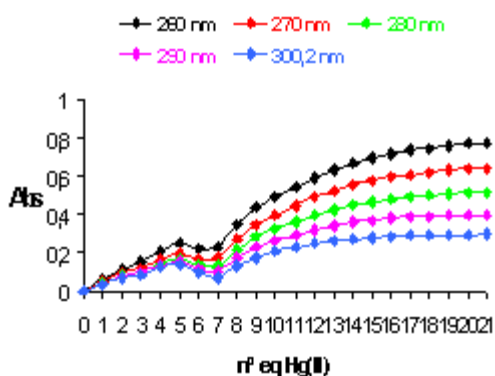


Figura 5.12. Representació gràfica de la variació de l'absorció a una determinada en funció del nombre d'equivalents de Hg(II) afegits al llarg de la valoració de Zn₇-MT amb HgCl₂ a pH 3 a t=24h.

ED: El 5è eq de Hg(II) afegit mostra el mateix comportament que els equivalents afegits anteriorment, si bé s'observa que disminueix la intensitat de les absorcions. Es proposa que el Hg(II) presenta el mateix entorn de coordinació que l'espècie anterior, és a dir, tetraèdric.

Hg₇-MT

DC: L'espectre d'aquesta espècie mostra dues bandes molt febles i amples centrades aproximadament a 280(+) i 330(-) nm. En aquesta

segona fase de la valoració s'observa una pèrdua global de l'estructuració assolida fins a l'espècie anterior.

UV: Des de 5 fins a 7 eq de Hg(II) afegits s'observa una disminució de l'absorció entre 250 i 340 nm i un lleuger augment d'aquesta per sota de 250 nm. La gràfica de l'absorció en funció del nombre d'eq de Hg(II) (Figura 5.11.) indica que la resta d'equivalents afegits a partir d'aquest punt de la valoració provoquen un augment gradual però suau de l'absorció en tot el rang de de l'espectre.

ED: L'addició del 6è i 7è eq de Hg(II) afegits provoca una variació important d'aquest espectre respecte al de l'espècie anterior. L'espectre corresponent al 6è eq de Hg(II) afegit mostra un increment negatiu de l'absorbància en el rang de on apareixen les absorcions assignades a Hg(II) amb entorns de coordinació tetraèdrics, cosa que indica la pèrdua d'aquests cromòfors, i contribucions positives entorn de 230 nm les quals indiquen la presència de Hg(II) digonal. En canvi, l'ED del 7è eq de Hg(II) afegit pot desenvolupar-se en un conjunt de corbes gaussianes positives al voltant de 230 i 260 nm i negatives entorn de 300 i 320 nm. Tenint en compte que el següent equivalent de Hg(II) afegit mostra un espectre de diferència característic de Hg(II) amb un entorn de coordinació de tipus MerR, assignat a Hg(II) trigonal amb S_{Cys}, es pot interpretar que l'espècie Hg₇-MT presenta Hg(II) amb entorns de coordinació mixtos digonal i trigonal.

Hg₁₀-MT

DC: Per a 10 eq de Hg(II) afegits s'observa un espectre amb bandes que provenen del desplaçament cap a superiors i augment d'intensitat de les de l'espècie anterior. La poca intensitat d'aquest espectre indica, com per a l'agregat metàl·lic anterior, un grau d'estructuració baix.

ED: Des del 8è eq de Hg(II) afegit i fins al final de la valoració, s'observen novament absorpcions positives en tot el rang de , si bé cada cop són menys intenses i presenten una participació major de les assignades a Hg(II) trigonal de tipus MerR. En base al que s'ha exposat per a l'espècie anterior, es pot afirmar que Hg₁₀-MT presenta Hg(II) amb entorns de coordinació mixtes trigonal i digonal.

Hg₁₈-MT

DC: L'espectre d'aquesta espècie mostra, respecte al de l'espècie anterior, una disminució de la intensitat de les dues bandes menys energètiques i un augment de la situada a una més baixa, mentre que per a totes elles s'observa un corriment general però suau cap al vermell. En addicionar més eq de Hg(II) la proteïna continua coordinant més Hg(II) sense modificar la seva estructura.

ED: L'addició de Hg(II) a l'espècie anterior provoca la disminució de les contribucions gaussianes assignades a Hg(II) trigonal de tipus MerR de manera que l'absorció principal és causada per Hg(II) digonal.

5.2.2. Valoració de Zn₇-MT amb HgCl₂ a pH 3 a t=0h (Làmina 19)

Una avaluació general de les dades espectroscòpiques enregistrades al llarg de la valoració de Zn₇-MT (apo-MT) amb HgCl₂ a pH 3 i a t=0h i les de la valoració anàloga efectuada a t=24h mostra que, excepte pels primers i darrers equivalents de Hg(II) addicionats, ni l'evolució espectral, ni l'estequiometria, ni l'estructura de les espècies formades coincideixen. L'esquema de reacció que es proposa quan la valoració té lloc a t=0h és

el següent:

apo-MT Hg₅-MT Hg₇-MT Hg₉-MT Hg₁₁-MT Hg₁₃-MT
Hg₁₈-MT

La primera espècie formada, Hg₅-MT, presenta una estructura anàloga a la de la mateixa espècie obtinguda a t=24h (Figura 5.13.), si bé en el primer cas es forma per un procés totalment cooperatiu a partir d'apo-MT.

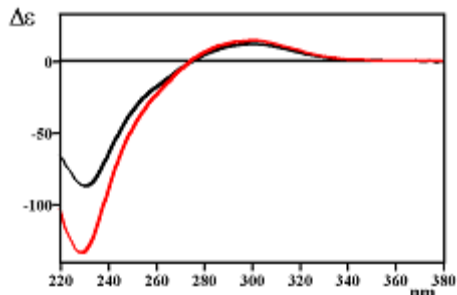


Figura 5.13. Espectres de DC de l'espècie Hg₅-MT obtinguda afegint HgCl₂ a Zn₇-MT a pH 3 t=24h i t=0h.

Hg₇-MT presenta un espectre de DC similar al de l'espècie anterior però

amb un lleuger corriment de les bandes cap a la dreta i un petit augment de la seva intensitat. Els espectres d'absorció UV-Visible mostren un augment progressiu de l'absorció fins a arribar a aquesta espècie, però en aquest cas, a diferència del que s'observa en la valoració a t=24h, és lineal (Figura 5.14.). Finalment, els ED indiquen que els 7 primers eq de

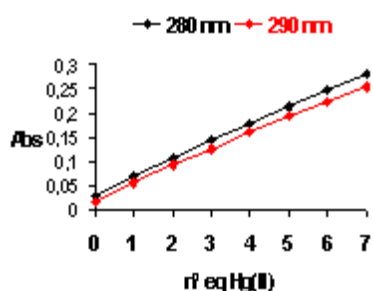


Figura 5.14. Representació gràfica de la variació de l'absorció a unes determinades en funció del nombre d'equivalents de Hg(II) afegits al llarg de l'addició dels 7 primers eq de Hg(II) a Zn₇-MT a pH 3 a t=0h.

Hg(II) afegits provoquen les mateixes contribucions gaussianes les quals indiquen entorns de coordinació tetraèdric pel Hg(II).

La formació de l'espècie Hg₇-MT, estequiomètricament igual però estructuralment ben diferent de l'anàloga a t=24h (Figura 5.15.), indica clarament que el mecanisme de reacció d'ambdues

valoracions a partir de l'addició del 5è eq d'espècie de Hg(II) és diferent. Així, en la valoració efectuada a $t=0h$ s'obté Hg_9 -MT, la qual presenta una estructura i una geometria de coordinació del Hg(II) similars a les de l'espècie anterior Hg_7 -MT.

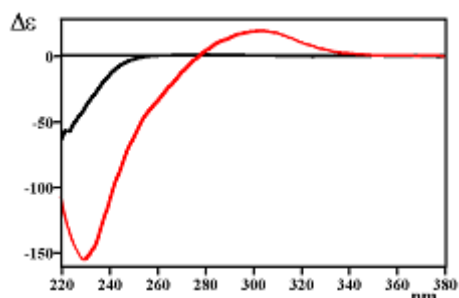


Figura 5.15. Espectres de DC de l'espècie Hg_7 -MT obtinguda afegint $HgCl_2$ a Zn_7 -MT a pH 3 $t=24h$ i $t=0h$.

Hg_{11} -MT té poca rellevància i representa un intermedi detectable del camí de reacció, si bé cal destacar que és amb l'addició d'aquest 11è eq quan es comença a perdre la intensitat de les absorcions de més baixa energia en els espectres d'absorció, i, per tant, és probable una disminució del nombre de coordinació del Hg(II). Es postula que aquesta espècie presenta Hg(II) amb entorns de coordinació tetraèdrics i digonals.

Hg_{13} -MT presenta un espectre de DC indicatiu d'una estructura altament ordenada per a aquesta espècie i similar a l'obtinguda per a Hg_{11} -MT en les valoracions efectuades amb $HgCl_2$ a pH 7 a $t=24h$ i $t=0h$ (Figura 5.16.). Els ED mostren que Hg_{13} -MT presenta Hg(II) amb entorns de coordinació mixtes digonal i trigonal de tipus MerR.

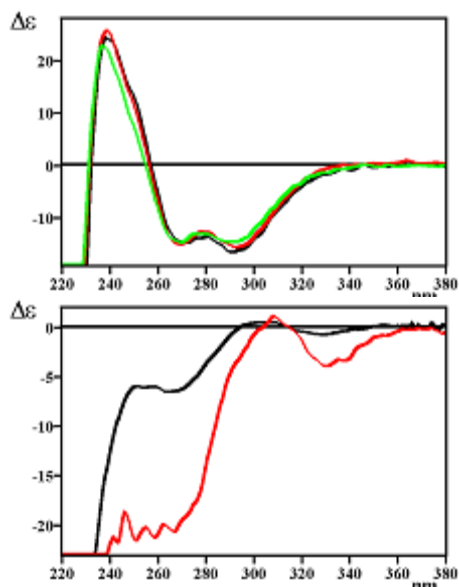


Figura 5.17. Espectres de DC de l'espècie Hg_{18} -MT obtinguda afegint $HgCl_2$ a Zn_7 -MT a pH 3 a $t=24h$ i $t=0h$.

La darrera espècie proposada, Hg_{18} -MT, prové de l'evolució isodicroica de l'espècie anterior però es proposa que

presenta una estructura semblant a la de l'espècie de la mateixa estequiometria detectada en la valoració efectuada a t=24h ja que ambdós agregats mostren essencialment les mateixes bandes en els seus espectres de DC (Figura 5.17.).

Si es comparen les dades obtingudes en aquesta valoració amb les de l'anàloga a pH 7 s'observa que en ambdues valoracions s'arriba a la formació d'una espècie amb la mateixa estructura, Hg₁₃-MT a pH 3 i Hg₁₁-MT a pH 7 (Figura 5.18.). El mecanisme d'incorporació de més equivalents de Hg(II) que segueixen aquests agregats és molt semblant i dóna lloc a unes espècies finals també molt similars en estructura (Figura 5.19.).

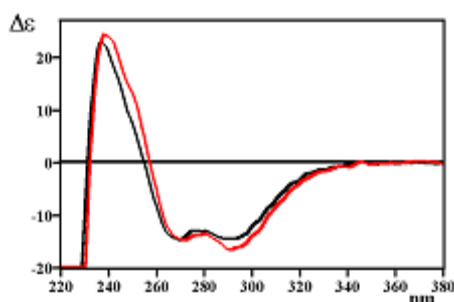


Figura 5.18. Espectres de DC de les espècies **Hg₁₁-MT** i **Hg₁₃-MT** obtingudes afegint HgCl₂ a Zn₇-MT a t=0h a pH 7 i 3 respectivament.

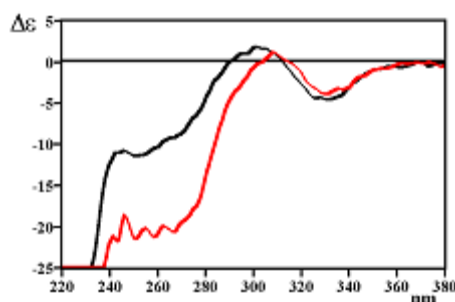


Figura 5.19. Espectres de DC de les espècies **Hg₁₅-MT** i **Hg₁₈-MT** obtingudes afegint HgCl₂ a Zn₇-MT a t=0h a pH 7 i 3 respectivament.

5.2.3. Valoració de Zn₇-MT amb Hg(ClO₄)₂ a pH 3 a t=24h (Làmina 20)

Una anàlisi exhaustiva de les dades espectrals enregistrades al llarg de

la valoració de Zn₇-MT amb Hg(ClO₄)₂ a pH 3 a t=24h permet afirmar que el mecanisme de reacció és el mateix que el proposat en la valoració anàloga en la que s'addiciona HgCl₂ només fins al 4t eq de Hg(II) afegit. L'esquema de reacció que segueix Zn₇-MT (apo-MT) en ser valorada amb Hg(ClO₄)₂ en les condicions esmentades és el següent:



En aquest cas, les espècies finals de la segona i tercera fases de la valoració, Hg₆-MT i Hg₈-MT, presenten un equivalent de Hg(II) més que les espècies finals de les etapes anàlogues de la valoració efectuada amb HgCl₂, Hg₅-MT i Hg₇-MT. Hg₆-MT presenta una estructura i una geometria de coordinació del Hg(II) anàlogues a les de la seva equivalent (Figura 5.20.). En canvi, Hg₈-MT presenta un espectre de DC, i per tant, una estructura, diferent de Hg₇-MT (Figura 5.21.), i, en comptes de Hg(II) digonal i trigonal, conté Hg(II) únicament digonal.

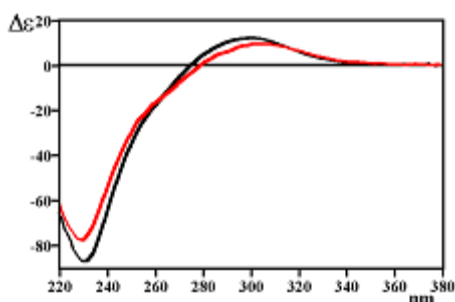


Figura 5.20. Espectres de DC de les espècies **Hg₅-MT** i **Hg₆-MT** obtingudes afegint **HgCl₂** o **Hg(ClO₄)₂**, respectivament, a Zn₇-MT a pH 3 a t=24h.

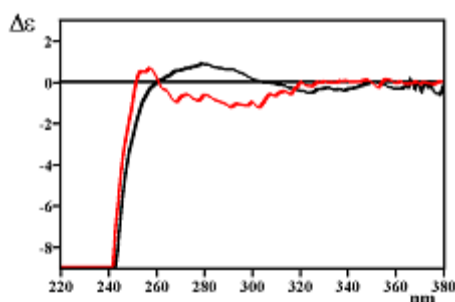


Figura 5.21. Espectres de DC de les espècies **Hg₇-MT** i **Hg₈-MT** obtingudes afegint **HgCl₂** o **Hg(ClO₄)₂**, respectivament, a Zn₇-MT a pH 3 a t=24h.

Les dues darreres espècies detectades, Hg₁₀-MT i Hg₁₈-MT, malgrat presentar la mateixa relació molar Hg(II):MT que les obtingudes en la valoració efectuada amb HgCl₂ mostren estructures molt diferents a aquestes (Figura 5.22.).

A causa de la poca quiralitat de les espècies formades en ambdues valoracions no és possible determinar si el Cl⁻ juga un paper estructural interaccionant en la segona esfera de coordinació del Hg(II). Tot i així, el fet que en absència de Cl⁻ el mecanisme evolutiu procedeixi per un camí de reacció diferent indica que aquest anió determina tant l'estructura de l'agregat metàl·lic que es forma com la geometria de coordinació que adopta el Hg(II), o millor, que marca l'entorn de coordinació del Hg(II) el qual determina alhora l'estructura del cluster metàl·lic. Aquestes consideracions porten a proposar que a pH 3, el Cl⁻ s'enllaça covalentment al Hg(II) determinant així l'evolució que segueix l'espècie a partir de la qual té lloc aquest enllaç.

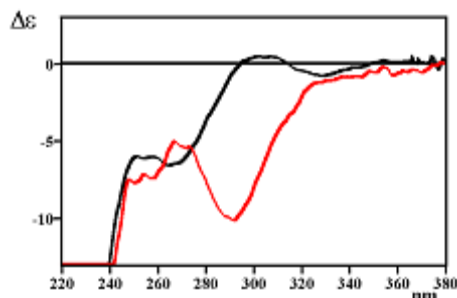


Figura 5.22. Espectres de DC de l'espècie Hg₁₈-MT obtinguda afegint HgCl₂ o Hg(ClO₄)₂ a Zn₇-MT a pH 3 a t=24h.

5.2.4. Conclusions per a la valoració de Zn₇-MT recombinant de ratolí a pH 3

L'exposició i discussió de les dades espectrals corresponents a les valoracions de Zn₇-MT amb Hg(II) a pH 3 permeten proposar l'esquema de reacció i les conclusions següents.

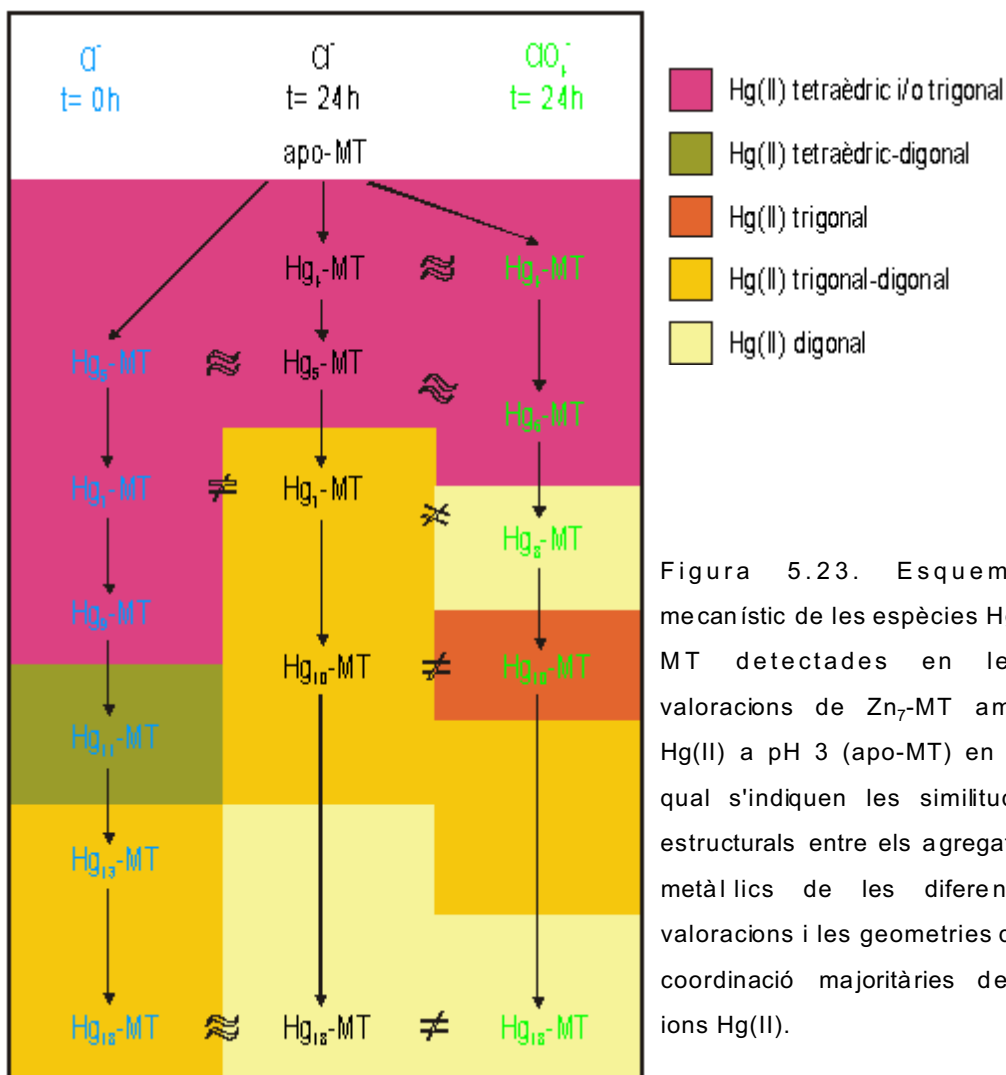


Figura 5.23. Esquema mecanístic de les espècies Hg-MT detectades en les valoracions de Zn₇-MT amb Hg(II) a pH 3 (apo-MT) en el qual s'indiquen les similituds estructurals entre els agregats metàl·lics de les diferents valoracions i les geometries de coordinació majoritàries dels ions Hg(II).

El mecanisme de reacció que segueixen les tres valoracions només és anàleg fins a l'addició del 4t eq de Hg(II) afegit. Així doncs, es pot afirmar que a pH 3 la incorporació dels 4 primers equivalents de Hg(II) a Zn₇-MT (apo-MT a pH 3) és independent tant del temps d'estabilització permès com de la sal de Hg(II) addicionada. A partir d'aquest punt ambdós paràmetres determinen el mecanisme de reacció seguit, l'estequiometria

Hg(II):MT i l'estructura de les espècies que es formen.

L'estequiometria Hg(II):MT i estructura de les espècies que es formen al llarg de les tres valoracions presenta semblances i diferències.

En la valoració realitzada amb HgCl₂ a t=0h no es detecta cap espècie amb 4 ni 10 eq de Hg(II) però en canvi se'n formen amb 9, 11 i 13.

En el cas de valorar amb Hg(ClO₄)₂ les espècies Hg₅-MT i Hg₇-MT obtingudes amb HgCl₂ es detecten amb un equivalent de Hg(II) més, Hg₆-MT i Hg₈-MT.

Les primeres espècies de les tres valoracions, Hg₄-MT, Hg₅-MT i Hg₆-MT, presenten estructures anàlogues (Figura 5.24.).

La resta dels agregats formats mostren una estructura que depèn del temps d'estabilització permès i de la sal emprada com a agent valorant amb l'excepció de l'agregat

Hg₁₈-MT el qual mostra una estructura molt poc quiral. Aquesta és similar en les dues valoracions efectuades afegint HgCl₂.

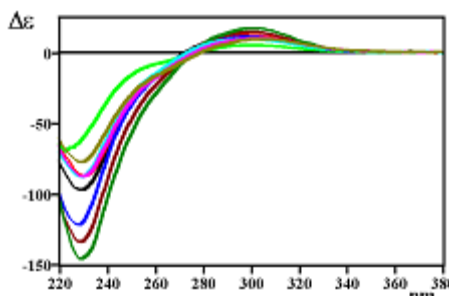


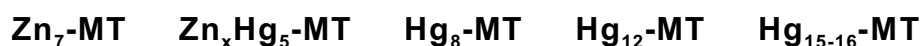
Figura 5.24. Espectres de DC de les espècies Hg₄-MT, Hg₅-MT i Hg₆-MT obtingudes afegint HgCl₂ a Zn₇-MT a pH 3 a t=24h (●●●●●●) i t=0h (●●●●●●) i afegint-li Hg(ClO₄)₂ (●●●●●●).

La geometria de coordinació majoritària del Hg(II) en els agregats Hg(II)-MT detectats es mostra a l'esquema amb zones ombrejades. S'observen força diferències a partir de Hg₅-MT, en afegir HgCl₂, i Hg₆-MT, en afegir Hg(ClO₄)₂. Malgrat tot es pot establir que l'ordre general en què apareix l'adopció de les diferents geometries de coordinació és tetraèdric, digonal, trigonal i altre cop digonal, essent molt freqüent trobar espècies en les quals el Hg(II) presenta entorns de coordinació mixtes. Cal

destacar que, en base a les absorcions detectades, els ions Hg(II) que presenten entorn de coordinació digonal, molt probablement contenen lligands diferents en les espècies intermitges i finals de les valoracions.

5.3. Valoració de Zn₇-MT recombinant de ratolí amb HgCl₂ a pH variable (Làmina 21)

L'anàlisi de les dades espectroscòpiques enregistrades durant la valoració de Zn₇-MT amb HgCl₂ a pH variable permet establir que el mecanisme de reacció de les primeres etapes de la valoració és similar al seguit en la valoració anàloga efectuada a pH 7 mentre que en les darreres etapes s'assembla al de la realitzada a pH 3. L'evolució de l'espècie inicial en addicionar Hg(II) segueix l'esquema de reacció següent:



L'espècie Zn_xHg₅-MT mostra una empremta espectral molt similar a la corresponent a la mateixa espècie detectada a pH 7 (Figura 5.25.).

A partir de la formació d'aquest agregat, es proposa que l'addició de més equivalents de Hg(II) provoca una alteració del pH que afecta l'evolució de la valoració. Així, aquest descens del pH afavoreix la formació d'una espècie d'estequiometria Hg₈-MT estructuralment molt propera a l'espècie Hg₇-MT detectada en la valoració a pH 3 (Figura 5.26.).

La valoració a pH variable, ara ja a pH àcid, continua evolucionant des de Hg₈-MT fins a Hg₁₂-MT, la qual mostra un

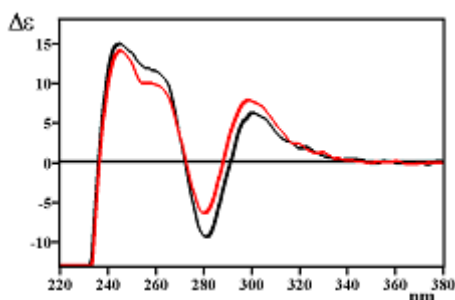


Figura 5.25. Espectres de DC de l'espècie Zn_xHg₅-MT obtinguda afegint HgCl₂ a Zn₇-MT a pH 7 a t=0h i a pH variable.

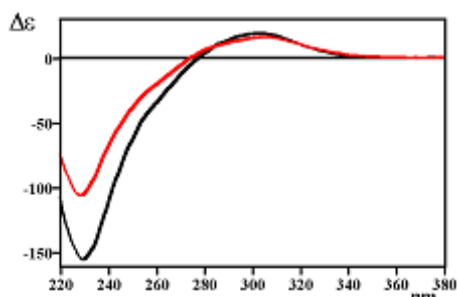


Figura 5.26. Espectres de DC de les espècies: Hg₇-MT, obtinguda afegint HgCl₂ a Zn₇-MT a pH 3 a t=0h, i Hg₈-MT, obtinguda afegint-l'hi a pH variable.

espectre de DC anàleg al que caracteritza l'espècie Hg₁₃-MT obtinguda en la valoració a pH 3 però també al que mostra l'agregat Hg₁₁-MT detectat a pH 7 (Figura 5.27.).

El punt final de la valoració també és anàleg al de la valoració efectuada a pH 3 amb 15 o 16 eq de Hg(II) (Figura 5.28.).

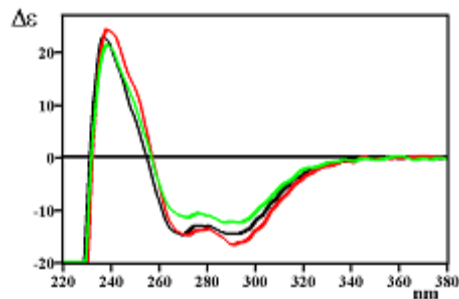


Figura 5.27. Espectres de DC de les espècies **Hg₁₁-MT**, **Hg₁₃-MT** i **Hg₁₂-MT** obtingudes afegint HgCl₂ a Zn₇-MT a **pH 7 a t=0h**, a **pH 3 a t=0h** i a **pH variable**, respectivament.

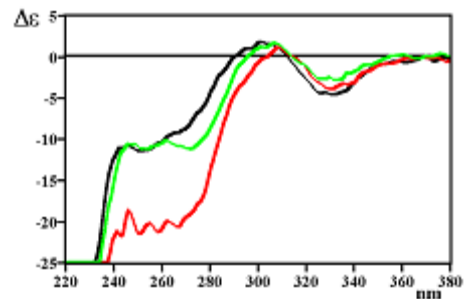


Figura 5.28. Espectres de DC de les espècies **Hg₁₅-MT**, **Hg₁₆-MT** i **Hg₁₅-MT** obtingudes afegint HgCl₂ a Zn₇-MT a **pH 7 a t=0h**, a **pH 3 a t=0h** i a **pH variable**, respectivament.

5.5. Comparació del comportament de la MT respecte als seus fragments constitutius enfront de Hg(II)

Un cop descrit el comportament de la Zn₇-MT recombinant de ratolí i dels seus fragments i enfront de Hg(II) als diferents pH és interessant determinar les relacions existents entre la proteïna sencera i els seus fragments constitutius.

Amb la intenció de determinar: a) el grau de participació de cadascun dels fragments en el comportament de la proteïna sencera, i/o b) si el comportament de la proteïna sencera correspon a la suma dels comportaments dels fragments per separat, es comparen, primerament, els esquemes de reacció globals de les valoracions amb HgCl₂ a t=24h de les tres proteïnes als dos pH estudiats, 7 i 3, (Figures 5.30. i 5.31.), i s'efectuen, després, les sumes dels espectres de DC de les espècies formades pels dos fragments que, estequiomètricament, podrien donar lloc als agregats metàl·lics detectats per a la MT sencera (Taula 5.1. i Figures 5.32.-5.46.).

Així, a la Taula 5.1. s'indiquen les possibles distribucions metàl·liques entre dominis que podrien presentar les espècies detectades al llarg de les valoracions Zn₇-MT amb Hg(II) a pH 7 i 3.

No obstant aquestes propostes distributives, la suma dels espectres de DC de les espècies considerades pels fragments en cap cas dóna espectres superposables amb els característics de les espècies obtingudes amb la MT sencera (Figures 5.32.-5.46.).

5. Comportament de Zn₇-MT enfront de Hg(II) 5.5. Comparació de MT i fragments

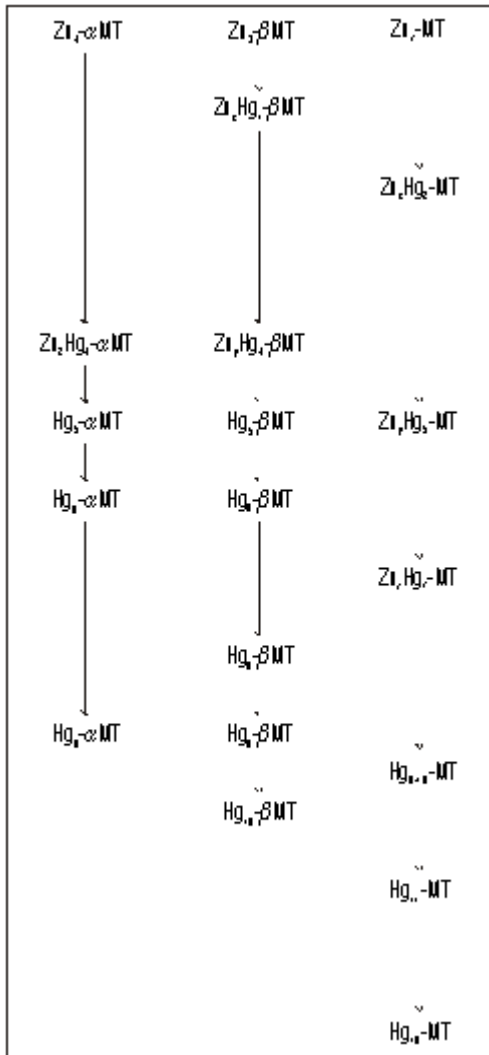


Figura 5.30. Esquema de reacció de les valoracions de Zn_4^- -MT, Zn_3^- -MT i Zn_7^- -MT amb $HgCl_2$ a pH 7 a t=24h.

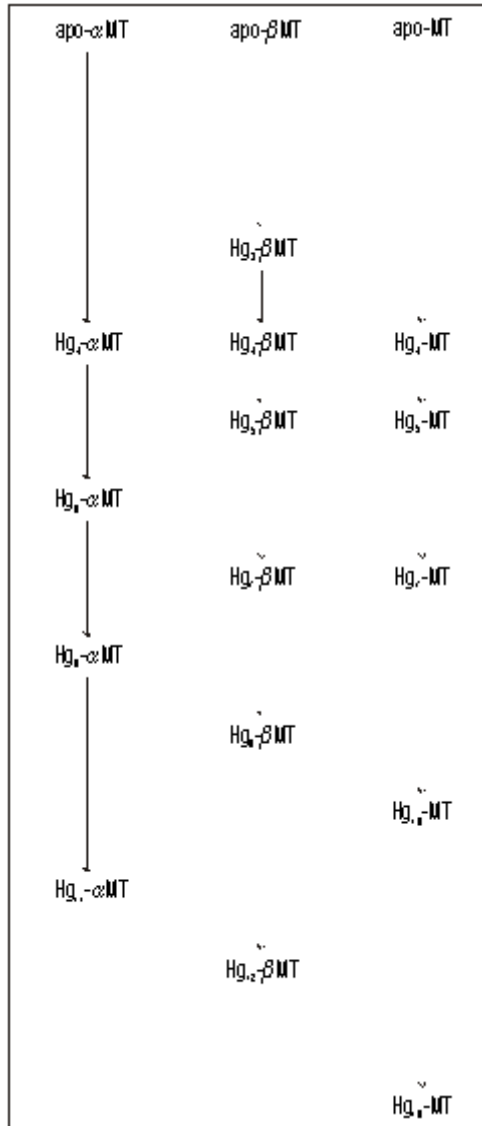


Figura 5.31. Esquema de reacció de les valoracions de Zn_4^- -MT, Zn_3^- -MT i Zn_7^- -MT amb $HgCl_2$ a pH 3 a t=24h.

Estequiometri a de les espècies de MT a pH 7	Possibles distribucions metàliques	Estequiometri a de les espècies de MT a pH 3	Possibles distribucions metàliques
Zn _x Hg ₂ -MT	—	Hg ₄ -MT	(Hg ₄) (apo) -MT (Figura 5.4 0.)
Zn _y Hg ₅ -MT	(Zn ₄) (Hg ₅) -MT (Figura 5.3 2.)	Hg ₅ -MT	(apo) (Hg ₅) -MT (Figura 5.4 1.)
	(Hg ₅) (Zn ₃) -MT (Figura 5.3 3.)	Hg ₇ -MT	(apo) (Hg ₇) -MT (Figura 5.4 2.)
(Zn ₂ Hg ₄) (Zn _x Hg ₁) - MT (Figura 5.3 4.)	(Hg ₄) (Hg ₃) -MT (Figura 5.4 3.)		
Zn _z Hg ₇ -MT	(Hg ₆) (Zn _x Hg ₁) -MT (Figura 5.3 5.)	Hg ₁₀ -MT	(Hg ₆) (Hg ₄) -MT (Figura 5.4 4.)
Hg ₉₋₁₀ -MT	(Hg ₅) (Hg ₅) -MT (Figura 5.3 6.)	Hg ₁₈ -MT	(Hg ₆) (Hg ₁₂) - MT (Figura 5.4 5.)
			(Hg ₁₁) (Hg ₇) - MT (Figura 5.4 6.)
Hg ₁₁ -MT	(Hg ₅) (Hg ₆) -MT (Figura 5.3 7.)		
	(Hg ₆) (Hg ₅) -MT (Figura 5.3 8.)		
Hg ₁₆ -MT	(Hg ₆) (Hg ₁₀) -MT (Figura 5.3 9.)		

Taula 5.1. Possible distribució metàlica entre dominis dels agregats Hg-MT. Aquestes propostes estan basades en les estequiometries trobades per a les espècies detectades en les valoracions dels fragments i de la MT.

En les figures següents es superposen els espectres de DC corresponents a les sumes proposades a la taula. Es representen: en negre, les espècies Hg-MT, en blau i verd, els agregats Hg- MT i Hg- MT, respectivament, i en vermell, l'espectre resultant de la suma dels dos

darrers.

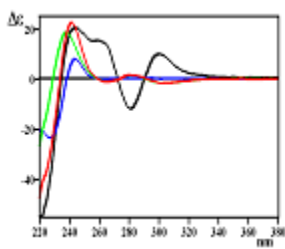


Figura 5.32. (Zn₄) (Hg₅) - MT

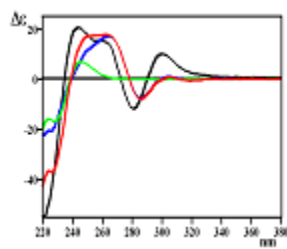


Figura 5.33. (Hg₅) (Zn₃) - MT

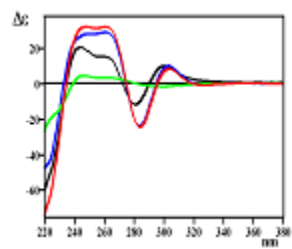


Figura 5.34. (Hg₄) (Hg₁) - MT

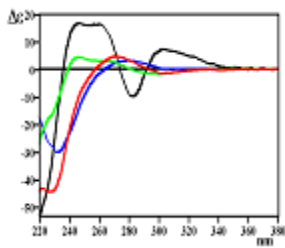


Figura 5.35. (Hg₆) (Hg₁) - MT

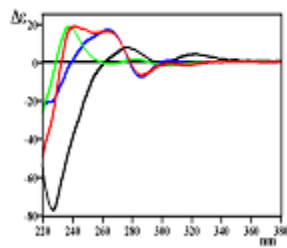


Figura 5.36. (Hg₅) (Hg₅) - MT

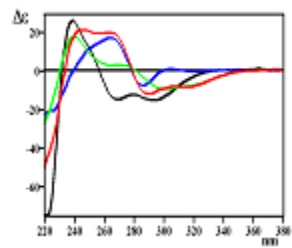


Figura 5.37. (Hg₅) (Hg₆) - MT

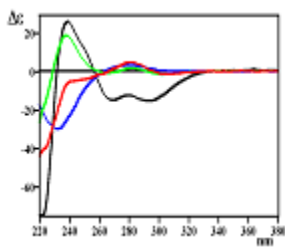


Figura 5.38. (Hg₆) (Hg₅) - MT

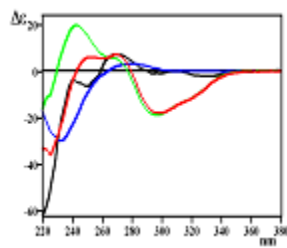


Figura 5.39. (Hg₆) (Hg₁₀) - MT

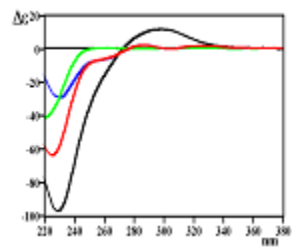


Figura 5.40. (Hg₄) (apo) - MT

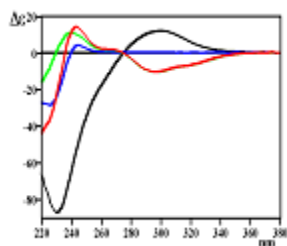


Figura 5.41. (apo) (Hg₅) - MT

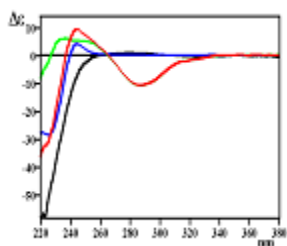


Figura 5.42. (apo) (Hg₇) - MT

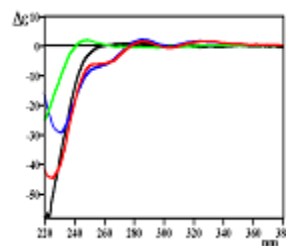


Figura 5.43. (Hg₄) (Hg₃) - MT

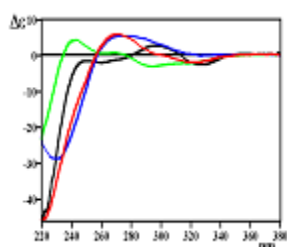


Figura 5.44. (Hg₆) (Hg₄) - MT

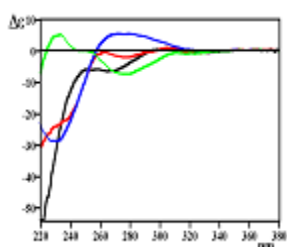


Figura 5.45. (Hg₆) (Hg₁₂) - MT

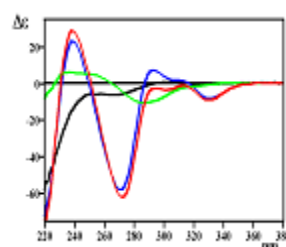


Figura 5.46. (Hg₁₁) (Hg₇) - MT

Aquest resultat està en desacord amb el que era acceptat fins fa ben poc pel comportament dels dominis de MT. El 1985 Winge i col laboradors van proposar que els dos dominis de MT es comportaven de manera independent en enllaçar ions metàl·lics.¹¹² Segons aquests autors, la coordinació dels ions metàl·lics a un dels dominis de MT no es veu afectada per la presència o absència de l'altre domini de manera que aquests es comporten igual quan es troben separats que formant part de la MT. El grup de recerca en el qual s'ha realitzat el treball que es presenta ha pogut precisar amb més detall aquesta proposada independència entre dominis. Així, tal i com s'ha publicat recentment,⁸⁷ en el cas de la isoforma 1 de MT recombinant de ratolí, quan Zn₇-MT enllaça ions Cu(I) aquesta independència entre dominis només es dóna mentre queda Zn(II) coordinat a algun dels dos fragments de MT.

Així, com a conclusió dels resultats exposats anteriorment es dedueix que, enfront de Hg(II), els fragments i de la isoforma 1 de MT

recombinant de ratolí es comporten de manera dependent a qualsevol dels pH estudiats tant en presència com en absència de Zn(II).

Per un altre costat, l'anàlisi global de les valoracions d'aquestes proteïnes amb Hg(II) ha permès observar una analogia en el comportament de Zn₇-MT i Zn₄-MT a pH 7 en coordinar Hg(II). Concretament, s'ha detectat que les valoracions de Zn₇-MT i Zn₄-MT amb HgCl₂ a pH 7 i a t=24h transcorren de manera anàloga en ambdós casos fins el punt en què tot

el Zn(II) és desplaçat per Hg(II), és a dir, fins que s'han addicionat 8 i 5 eq de Hg(II) a Zn₇-MT i Zn₄-MT, respectivament. A la Figura 5.47. s'observa que Zn_yHg₅-MT mostra una empremta espectral força semblant a la de l'agregat Zn₂Hg₄-MT que es forma en la valoració de Zn₄-MT. Així mateix, la superposició de l'espectre de

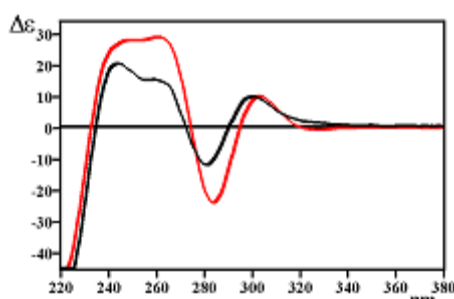


Figura 5.47. Espectres de DC de les espècies **Zn_yHg₅-MT** i **Zn₂Hg₄-MT** obtingudes afegint HgCl₂ a **Zn₇-MT** i **Zn₄-MT**, respectivament, a pH 7 a t=24h.

DC de l'espècie Zn₂Hg₇-MT amb el corresponent a Zn₂Hg₄-MT mostra una gran semblança (Figura 5.48.). Tanmateix, si també es superposen els espectres de DC corresponents a les següents addicions de Hg(II) en ambdues proteïnes, 8 equivalents per a Zn₇-MT i 5 per a Zn₄-MT, s'observa que l'analogia entre ambdues empremtes espectrals encara es manté (Figura 5.49.). A partir d'aquest punt ja no es detecten més equivalències entre els espectres de DC d'ambdues valoracions.

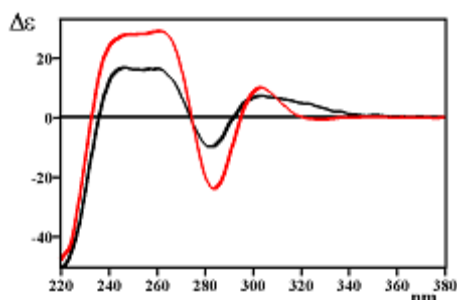


Figura 5.48. Espectres de DC de les espècies **Zn₂Hg₇-MT** i **Zn₂Hg₄- MT** obtingudes afegint HgCl₂ a **Zn₇-MT** i **Zn₄- MT**, respectivament, a pH 7 a t=24h.

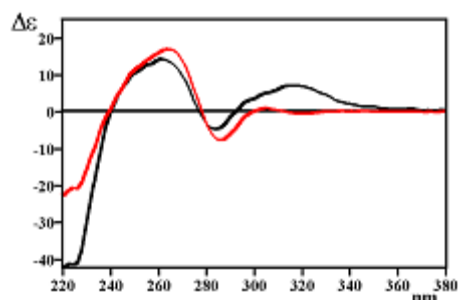


Figura 5.49. Espectres de DC de les espècies **Hg₈-MT** i **Hg₅- MT** obtingudes afegint HgCl₂ a **Zn₇-MT** i **Zn₄- MT**, respectivament, a pH 7 a t=24h.

Tot això sembla indicar que, en les primeres etapes de la valoració de Zn₇-MT a pH 7, el Hg(II) es coordina inicialment al domini i que no és fins que tot el Zn(II) ha estat desplaçat de la proteïna que el domini comença a participar en la coordinació de Hg(II).

Finalment, comparant totes les valoracions (Figures 5.30. i 5.31.) es conclou que, per a les tres proteïnes, l'espècie final té una relació estequiomètrica Hg(II):proteïna superior en el cas de les valoracions efectuades a pH 3 que en el de les realitzades a pH 7. Això permet deduir que la capacitat coordinant de Hg(II) màxima de la MT i dels seus fragments constitutius és superior a pH 3 que a pH 7.

Aquesta mateixa comparació aplicada només als fragments permet concloure que, malgrat que el nombre de S_{Cys} és inferior en el fragment que en l' (9 respecte a 11), el fragment té una capacitat de coordinació de Hg(II) subtilment superior a la del fragment ja que les espècies finals Hg- MT presenten nuclearitats superiors a les obtingudes per als darrers agregats Hg- MT.

5.6. Conclusions del comportament de Zn₇-MT recombinant de ratolí enfront de Hg(II) a diferents pH

L'anàlisi de les dades presentades pels diferents pH, amb diferents temps d'estabilització i addicionant Hg(II) en forma de HgCl₂ o Hg(ClO₄)₂, la seva comparació amb les dades bibliogràfiques, i, finalment, la determinació del grau de participació dels fragments en la MT sencera, permet establir el comportament la MT recombinant de ratolí enfront de Hg(II) d'acord amb l'esquema següent i proposar les conclusions que es detallen a continuació.

Independentment del pH, del temps d'estabilització i de la sal de Hg(II) addicionada, la coordinació del Hg(II) a Zn₇-MT dóna espècies amb una relació molar Hg(II):MT de 5 i 7. L'estequiometria de les espècies amb una relació molar inferior o superior a les esmentades depèn fortament del pH. A diferència del que s'ha observat en els fragments, per als darrers agregats metàl·lics detectats al llarg de les valoracions el nombre de Hg(II) coordinats és inferior al nombre de S_{Cys} de la proteïna.

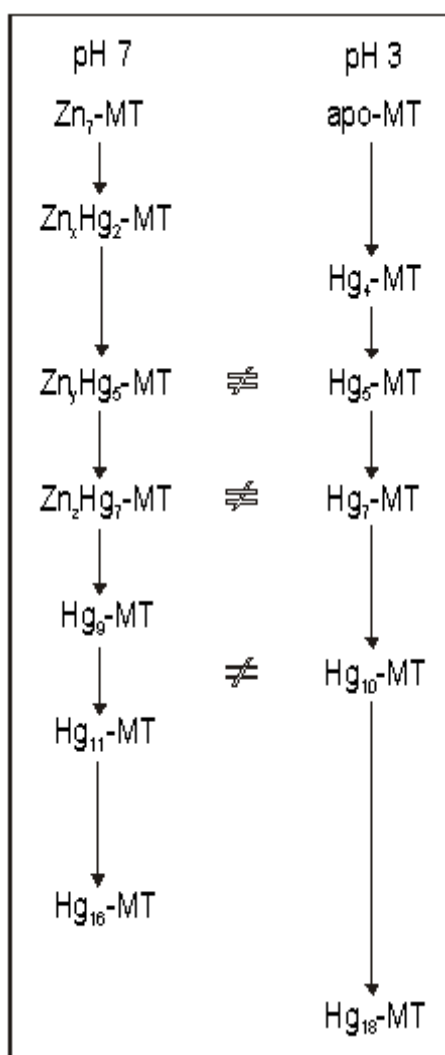


Figura 5.50. Esquema general de les espècies detectades al llarg de la valoració de Zn₇-MT amb Hg(II).

L'estructura de les espècies amb la

mateixa relació Hg(II):MT depèn del pH.

Adicionalment, el fet de què a pH 7 aquestes espècies mantinguin Zn(II) coordinat causa que aquests agregats metàl·lics presentin estructures diferents als dos pH estudiats. Probablement, de la mateixa manera que passa en el fragment , ambdós agregats, a pH 7 i 3, s'interconverteixen reversiblement variant el pH del medi.

D'altra banda, mentre que l'espècie amb 5 eq de Hg(II) presenta un nombre de coordinació superior a pH 3 que a pH 7, tetraèdric i/o trigonal enfront de mixt tetraèdric-digonal, en l'agregat amb 7 eq de Hg(II) s'observa una situació inversa, és a dir, la geometria de coordinació del Hg(II) és inferior a pH 3 que a pH 7: mixt digonal-trigonal i tetraèdric-digonal, respectivament. Així, aquest fenomen permet pensar que el Zn(II) és responsable de que es mantingui la geometria de coordinació tetraèdrica com a prioritària en les primeres espècies detectades.

La geometria de coordinació dels ions Hg(II) varia a mesura que creix la relació Hg:MT.

Les primeres espècies, on la proporció de Hg(II) és petita, presenten Hg(II) amb entorns de coordinació tetraèdrics i/o trigonals; a mesura que augmenta el nombre de Hg(II) per MT la geometria de coordinació tendeix a ser digonal, passant per espècies on coexisteixen diferents entorns de coordinació; i finalment, les darreres espècies exhibeixen Hg(II) trigonals de tipus MerR. Quan el nombre de Hg(II) de l'espècie s'apropa al nombre de S_{Cys} , l'entorn de coordinació tendeix a ser digonal.

El temps d'estabilització permès per a l'estabilització de cadascun dels equivalents de Hg(II) afegits causa efectes diferents en funció del pH.

A pH 7, el mecanisme de reacció de la valoració és independent del temps d'estabilització excepte en l'etapa final, però no obstant això es

detecta un cert avançament de la valoració efectuada sota control cinètic respecte a la realitzada sota control termodinàmic. D'altra banda, les espècies amb una mateixa relació estequiomètrica Hg(II):MT mostren un grau de quiralitat inferior en el cas de ser obtingudes en la valoració efectuada sota control cinètic que en la realitzada controlada termodinàmicament. Aquest fet permet concloure que, sota control cinètic, les espècies presenten una manca d'estructuració respecte als agregats metàl·lics equivalents formats sota control termodinàmic.

A pH 3, tot i que el principi i el final de les valoracions són anàlegs, independentment del temps d'estabilització, les etapes intermitges difereixen completament si la valoració es realitza a $t=0h$ o a $t=24h$.

En general, el mecanisme de reacció i l'estructura de les espècies detectades en la primera meitat de les valoracions efectuades tant a pH 7 com a pH 3 són similars independentment de la presència de Cl^- o ClO_4^- al medi. Així doncs, el paper del Cl^- com a lligand que intervé clarament i de manera definida en l'esfera de coordinació del Hg(II) i també en l'estructura tridimensional del cluster format és molt més notable en la segona part de les valoracions i més en les realitzades a pH 3 que en les dutes a terme a pH 7.

A pH 3, el fet que tant el mecanisme de reacció com l'evolució de la geometria de coordinació del Hg(II) en les espècies detectades siguin diferents en funció de la presència de Cl^- o ClO_4^- indica que el Cl^- actua tant com a lligand covalentment enllaçat al Hg(II) com participant en interaccions Hg...Cl a llarga distància.

A pH 7, la diferència més rellevant en la segona meitat de les valoracions es detecta a partir de la formació de l'espècie Hg_{11}^- -MT. S'observa que en aquesta espècie el Cl^- intervé tant com a lligand del Hg(II) com establint interaccions a llarga distància Hg...Cl.

A pH 7, la presència de Cl⁻ al medi provoca la retenció del Zn(II) coordinat a la proteïna. Aquest fet és invers al que ocorre quan es valora el fragment i anàleg al que s'observa pel . Així, pel que fa al desplaçament del Zn(II) en presència de Cl⁻ o ClO₄⁻ al medi, s'observa que el fragment es comporta de manera similar a la MT sencera, retenint el Zn(II) coordinat durant l'addició de més equivalents de Hg(II) quan hi ha Cl⁻ en solució. En canvi, el fragment es comporta de forma inversa.

A pH 3, la segona i tercera espècies detectades contenen 5 i 7 eq de Hg(II) en presència de Cl⁻ mentre que si hi ha ClO₄⁻ en tenen 6 i 8 respectivament. Això indica que la presència de Cl⁻ estabilitza les espècies amb un nombre de Hg(II) menor.

Cal destacar, d'entre totes les espècies detectades al llarg de les valoracions, els agregats: Hg₁₁-MT (a pH 7 a t=24h i t=0h), Hg₁₃-MT (a pH 3 a t=0h) i Hg₁₂-MT (a pH variable). Aquestes espècies mostren un grau d'estructuració elevat, relacionat, molt probablement, amb l'estructura d'hèlix que presenten moltes proteïnes, i una gran tendència cinètica a formar-se, tot i que presenten, alhora, una elevada estabilitat termodinàmica. Cal remarcar la probable interacció del Cl⁻ en la segona esfera de coordinació del Hg(II) atorgant a aquests agregats una certa superestructuració.

Els fragments i mostren un comportament dependent entre ells de tal forma que la suma d'aquests dos no reproduïx el de la MT sencera.

El fragment i la MT sencera mostren un comportament inicial similar en les valoracions efectuades a pH 7 independentment del temps

d'estabilització i de la sal de Hg(II) addicionada. Això sembla indicar que, a pH 7, en addicionar Hg(II) a la MT aquests ions es coordinen inicialment al domini de manera que l'espècie formada adopta una estructura en la que el domini pràcticament no hi participa. En canvi, a pH 3, donat que la proteïna no té una estructura dominial sinó desordenada, no hi ha cap preferència de coordinació del Hg(II) per un o altre extrem de la cadena polipeptídica.

La capacitat coordinant de Hg(II) de la MT sencera i dels seus fragments constitutius és superior a pH 3 que a pH 7. En els fragments, la capacitat de coordinació de Hg(II) del fragment és subtilment superior a la del fragment .

Les dades bibliogràfiques existents: a) permeten validar el comportament de la MT recombinant de mamífer, b) posen de manifest que, molt probablement, algunes de les diferències observades entre les proteïnes natives i les recombinants són causades per la diferència en la seva puresa, c) evidencien la necessitat de controlar altres paràmetres com el temps d'estabilització i el pH per tal de definir el comportament coordinatiu de la MT enfront de Hg(II).