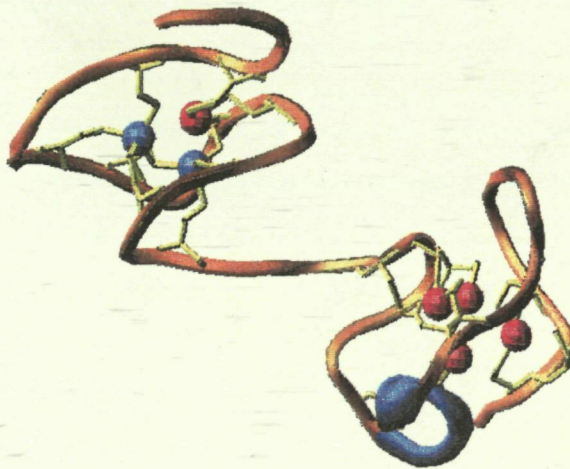


Universitat Autònoma de Barcelona

**EL PAPER ESTRUCTURAL DEL ZINC EN EL PLEGAMENT
DE LES METAL·LOTIONEÏNES DE COURE**



TESI DOCTORAL

Roger Bofill i Arasa

Març 2001



**EL PAPER ESTRUCTURAL DEL ZINC EN EL PLEGAMENT DE
LES METAL·LOTIONEÏNES DE COURE**

Memòria presentada per

Roger Bofill i Arasa

per a aspirar al grau de

Doctor en Ciències (Química)



Tesi realitzada sota la direcció de la Dra. Pilar González Duarte i la
Dra. Mercè Capdevila Vidal, del Departament de Química de la
Universitat Autònoma de Barcelona

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Pilar González Duarte'.

Dra. Pilar González Duarte

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Mercè Capdevila Vidal'.

Dra. Mercè Capdevila Vidal

Bellaterra, 5 de Març de 2001

Dedicada a l'Ester i als meus pares

Tot va començar a mitjans de febrer de 1996, quan un servidor havia acabat una etapa important de la seva vida. Ara, mig decenni més tard, en fineix una altra. I bo i que he après menys “continguts teòrics” en aquesta segona etapa, en canvi he après una mica què vol dir “fer ciència”. Per això mateix, voldria fer expressament públic l'agraïment a totes les persones que han fet viable aquesta Tesi Doctoral:

Per començar, les directores de la Tesi, la Dra. Pilar González i la Dra. Mercè Capdevila, per llur empenta, dedicació, perspicàcia i perseverància. També he d'agrair profundament el fet d'haver pogut mantenir durant tot aquest temps una estreta col·laboració amb el grup de Genètica de la UB, inicialment dirigit per la Dra. Roser González i actualment per la Dra. Sílvia Atrian, del qual cal destacar la seva eficàcia i cordialitat. El més bo de tot plegat és sens dubte l'intercanvi de coneixements entre químics i biòlegs, que en alguna ocasió ha dut lloc a divertits malentesos científics arran del diferent significat atorgat a mots idèntics...

Part dels treballs realitzats han estat possible gràcies a la col·laboració puntual amb diversos grups de recerca. Vull agrair aquí l'ajuda dels grups dirigits pel Dr. Milan Vašák, el Dr. Miquel Esteban, el Dr. Santiago Nonell, el Dr. Ryszard Lobinski i el Dr. Joaquín Abián. Així mateix, vull donar les gràcies al personal del Servei d'Anàlisi Química de la UAB, al dels Serveis Científico-Tècnics de la UB, especialment el Dr. Isidre Casals, i al Dr. Pepe Vidal de l'ICMAB pel suport tècnic prestat.

Per a mi el component humà ha tingut un paper decisiu a l'hora de fer més agradables i interessants les estones passades al llarg d'aquest període de recerca. Per això vull agrair molt sincerament l'ajuda prestada i els bons moments compartits a tots els companys i companyes dels grups de química inorgànica i de genètica. Seria difícil d'esmentar-los tots, però alguns d'ells, com la Dra. Núria Romero, la Dra. Neus Cols i el Dr. Marc Valls, quedaran associats a aquesta etapa de la meua vida. Tampoc no vull oblidar les amistats contretes amb l'Òscar, l'Àngels, en Rubén, la Laura i la Montse.

I anant ja al nivell més proper de tot ésser humà, he d'agrair profundament als meus pares l'haver-me donat l'oportunitat d'estudiar sense haver-me de preocupar per moltes de les adversitats que presenta la vida.

Poques paraules d'agraïment que no sàpigues em calen per a tu, Ester. M'és molt difícil imaginar aquests darrers temps sense la teva ajuda, sobretot en els moments més difícils. I també estic molt agraït a la teva família, que des del primer moment em va tractar com un més de la família –per això molts cops em fa la impressió que enlloc de dos pares en tinc quatre...

En darrer lloc vull tenir un punt de record per a totes aquelles persones que ens han deixat en aquests darrers anys, amics o parents, que de ben segur s'haguessin alegrat de poder llegir aquestes pàgines.

A tots vosaltres, moltes gràcies.

Després de les confessions suara exposades, l'autor d'aquest treball espera que la natural curiositat inherent a l'espècie humana i, doncs, també a l'amable lector d'aquestes humils línies no hagi quedat totalment saciada, de manera que l'esmentat lector es vegi impel·lit a continuar àvidament la lectura dels fets que s'esdevenen a continuació.

Perseuerança requer que moltes virtuts li sien amigues.



Libre de mil proverbis, Capítol XXXVI

Ramon Llull (Ciutat de Mallorca, 1232-1316)

1. INTRODUCCIÓ	1
1.1. Els metalls pesants en el món biològic	3
1.2. Metal·lotionèines	6
1.2.1. Descobriments i definició	6
1.2.2. Classificació	7
1.2.3. Característiques estructurals	9
1.2.4. Funcions fisiològiques	16
1.2.5. Reactivitat	20
1.3. Mètodes d'obtenció de metal·lotionèines	24
1.4. Tècniques espectroscòpiques	27
1.4.1. Espectroscòpia electrònica	28
1.4.2. Espectroscòpia de diroisme circular	30
1.5. Espectrometria de masses amb ionització per electrospai	33
1.6. Objectius de la Tesi Doctoral	36
2. ARTICLES	43
Article 1	45
R. Bofill, O. Palacios, M. Capdevia, N. Cols, R. González-Duarte, S. Arias, P. González-Duarte. "A new insight into the Ag ⁺ and Cu ⁺ binding sites in the metallothionein β domain", <i>J. Inorg. Biochem.</i> , 1999, 73, 57-64.	
Article 2	55
N. Cols, N. Romero-Izart, R. Bofill, M. Capdevia, P. González-Duarte, R. González-Duarte, S. Arias. "In vivo copper- and cadmium-binding ability of mammalian metallothionein β domain". <i>Prot. Engng.</i> , 1999, 12, 265-269.	

ÍNDEX

1. INTRODUCCIÓ	1
1.1. Els metalls pesants en el món biològic	3
1.2. Metal·lotioneïnes.....	6
..... 1.2.1. Descobriment i definició.....	6
..... 1.2.2. Classificació.....	7
..... 1.2.3. Característiques estructurals.....	9
..... 1.2.4. Funcions fisiològiques	16
..... 1.2.5. Reactivitat	20
1.3. Mètodes d'obtenció de metal·lotioneïnes	24
1.4. Tècniques espectroscòpiques	27
..... 1.4.1. Espectroscòpia electrònica.....	28
..... 1.4.2. Espectroscòpia de diroisme circular.....	30
1.5. Espectrometria de masses amb ionització per electrosprai.....	33
1.6. Objectius de la Tesi Doctoral.....	36
2. ARTICLES	43
Article 1	45
R. Bofill, O. Palacios, M. Capdevila, N. Cols, R. González-Duarte, S. Atrian, P. González-Duarte. "A new insight into the Ag ⁺ and Cu ⁺ binding sites in the metallothionein β domain", <i>J. Inorg. Biochem.</i> , 1999 , 73, 57-64.	
Article 2	55
N. Cols, N. Romero-Isart, R. Bofill, M. Capdevila, P. González-Duarte, R. González-Duarte, S. Atrian. " <i>In vivo</i> copper- and cadmium-binding ability of mammalian metallothionein β domain", <i>Prot. Engng.</i> , 1999 , 12, 265-269.	

Article 3	63
R. Bofill, M. Capdevila, N. Cols, S. Atrian, P. González-Duarte. "Zn(II) is required for the <i>in vivo</i> and <i>in vitro</i> folding of mouse Cu- metallothionein in two domains", <i>J. Biol. Inorg. Chem.</i> , 2001 , 000.	
Article 4	103
M. Valls, R. Bofill, N. Romero-Isart, R. González-Duarte, J. Abián, M. Carrascal, P. González-Duarte, M. Capdevila, S. Atrian. " <i>Drosophila</i> MTN: a metazoan copper-thionein related to fungal forms", <i>FEBS Let.</i> , 2000 , 467, 189-194.	
Article 5	111
M. Valls, R. Bofill, R. González-Duarte, P. González-Duarte, M. Capdevila, S. Atrian. "A New Insight into MT Classification and Evolution. The <i>in vivo</i> and <i>in vitro</i> metal binding features of <i>Homarus americanus</i> recombinant MT", enviat a <i>J. Biol. Chem.</i>	
3. DISCUSSIÓ DELS RESULTATS -----	149
3.1. Estudi del paper estructural del Zn(II) en el plegament de la MT de ratolí en presència de Cu(I) <i>in vivo</i>	151
3.2. Estudi del paper estructural del Zn(II) en el plegament de la MT de mosca (<i>Drosophila</i>) en presència de Cu(I) <i>in vivo</i>	158
3.3. Estudi del paper estructural del Zn(II) en el plegament de la MT de llamàntol (<i>Homarus americanus</i>) en presència de Cu(I) <i>in vivo</i>	161
4. CONCLUSIONS -----	167
5. REFERÈNCIES BIBLIOGRÀFIQUES -----	173
ANNEXOS -----	181
Annex I. Espectroscòpia d'emissió aplicada a l'estudi de metal·lotioneïnes de Cu(I)....	183
Annex II. Determinació electroquímica del grau d'oxidació de metal·lotioneïnes de Cu(I)	186

1. INTRODUCCIÓ

1.1. Els metalls pesants en el món biològic

Es totalment acceptat per la ciència actual que els metalls presents a la Terra poden ser classificats en tres grans grups pel que fa a la seva activitat biològica: els metalls essencials, els no essencials i els tòxics. Si bé als metalls no essencials no se'ls ha pogut assignar cap funció biològica coneguda ni cap episodi de toxicitat, és plenament conegut que metalls com cadmi, plom o mercuri són tòxics a qualsevol concentració, mentre que tant una manca com un excés en el contingut de metalls essencials, com coure i zinc, poden provocar greus desordres funcionals. Per exemple, en el cas dels éssers humans el Cu(II) és imprescindible per a efectuar dos processos vitals: la degradació de l'ió superòxid i fer possible la cadena respiratòria,¹ i es coneixen quatre trastorns patològics directament relacionats amb un incorrecte metabolisme del Cu:² la malaltia de Wilson, causada per un emmagatzament insuficient del Cu per part de la ceruloplasmina, que duu a l'acumulació de Cu en el cervell i el fetge, provocant demència, disfuncions hepàtiques i fins i tot la mort;³ el síndrome de Menke, causada per una disfunció en el transport intracel·lular de Cu,⁴ que provoca una deficiència general de Cu en l'organisme, la qual cosa impossibilita un creixement físic i mental normal dels infants (p.ex. aparició de cabells entortolligats, retard en el desenvolupament psicomotriu, etc.);⁵ i sovint desemboca en la mort abans dels 3 anys;⁶ la malaltia de Lou Gehrig o esclerosi amiotròfica lateral,⁷ causada per mutacions en la superòxid dismutasa dependent de Cu i que desemboca en trastorns neurodegeneratius (paràlisi); i per últim en el cas dels animals, que semblen ser una deficiència de Cu provocada per un mal funcionament dels mecanismes de transport i emmagatzament de Cu, que pot causar una insuficient oxigenació del cervell i provocar-hi, per tant, lesions irreversibles.

1. INTRODUCCIÓ

1. M.C. Linder, C.A. Godec, *Biochemistry of copper*, Plenum Press, New York, 1991.
2. W. Kaim, B. Schwederski. In: *Bioinorganic Chemistry, Inorganic Elements in the Chemistry of Life*, ed. by John Wiley & Sons Ltd, Chichester, 1994, p. 187-214.
3. K. Davies, *Nature*, 1953, 767, 38.
4. B. Sarkar, *Chem. Rev.*, 1999, 79, 2535.
5. H.X. Deng, A. Mentati, J.A. Tainer, Z. Iqbal, A. Cavdysh, W.Y. Hang, E.D. Getzoff, P. Ha, B. Herzfeldt, K.P. Roser, C. Wagner, Q. Deng, D. Suck, C. Smith, K.L. Parge, A. Ahmed, A.D. Rosen, R.A. Hallewell, M.A. Perica-Vance, Y. Saitama, *Science*, 1993, 261, 1047.

1. INTRODUCCIÓ

1.1. Els metalls pesants en el món biològic

És totalment acceptat per la ciència actual que els metalls presents a la Terra poden ser classificats en tres grans grups pel que fa a la seva activitat biològica: els metalls essencials, els no essencials i els tòxics. Si bé als metalls no essencials no se'ls ha pogut assignar cap funció biològica coneguda ni cap episodi de toxicitat, és plenament conegut que metalls com cadmi, plom o mercuri són tòxics a qualsevol concentració, mentre que tant una manca com un excés en el contingut de metalls essencials, com coure i zinc, poden provocar greus desordres funcionals. Per exemple, en el cas dels éssers humans el Cu(I) és imprescindible per a efectuar dos processos vitals: la degradació de l'ió superòxid i fer possible la cadena respiratòria,¹ i es coneixen quatre desordres patològics directament relacionats amb un incorrecte metabolisme del Cu:² la malaltia de Wilson, causada per un emmagatzament insuficient del Cu per part de la ceruloplasmina, que duu a l'acumulació de Cu en el cervell i el fetge, provocant demència, disfuncions hepàtiques i fins i tot la mort; la síndrome de Menke, causada per una disfunció en el transport intracel·lular de Cu,³ que provoca una deficiència general de Cu en l'organisme, la qual cosa impossibilita un creixement físic i mental normal dels infants (p.ex. aparició de cabells entortolligats, retard en el desenvolupament psicomotriu, etc.) i sovint desemboca en la mort abans dels 3 anys;⁴ la malaltia de Lou Gehrig o esclerosi amiotròfica lateral,⁵ causada per mutacions en la superòxid dismutasa depenent de Cu i que desemboca en desordres neurodegeneratius (paràlisi), i per últim en el cas dels nadons pot presentar-se una deficiència de Cu provocada per un mal funcionament dels mecanismes de transport i emmagatzament de Cu, que pot causar una insuficient oxigenació del cervell i provocar-hi, per tant, lesions irreversibles.

-
1. M.C. Linder, C.A. Goode, *Biochemistry of Copper*, Plenum Press, New York, 1991.
 2. W. Kaim, B. Schwederski. In: *Bioinorganic Chemistry. Inorganic Elements in the Chemistry of Life*, ed. by John Wiley & Sons Ltd., Chichester, 1994, p. 187-214.
 3. K. Davies, *Nature*, 1993, 361, 98.
 4. B. Sarkar, *Chem. Rev.*, 1999, 99, 2535.
 5. H.X. Deng, A. Hentati, J.A. Tainer, Z. Iqbal, A. Cayabyab, W.Y. Hung, E.D. Getzoff, P. Hu, B. Herzfeldt, R.P. Roos, C. Wagner, G. Deng, E. Soriano, C. Smyth, H.E. Parge, A. Ahmed, A.D. Roses, R.A. Hallewell, M.A. Pericak-Vance, T. Siddique, *Science*, 1993, 261, 1047.

Els sistemes de transport de membrana tant en les cèl·lules procariotes com eucariotes generalment no discriminen entre metalls essencials i metalls tòxics, de manera que ambdós entren a la cèl·lula. Aquesta situació ha de ser convenientment controlada per part de la cèl·lula en situacions fisiològiques normals i pal·liada en casos d'intoxicació accidental. En el cas dels organismes eucariotes, els principals protagonistes apareguts al llarg de l'evolució encarregats de regular la concentració intracel·lular d'ions metàl·lics lliures han estat unes proteïnes anomenades metal·lore reguladores, d'entre les quals s'inclouen les metal·lotioneïnes (MT), encarregades de segrestar els ions metàl·lics lliures mitjançant els grups tiolat de les seves Cys. En canvi, en el cas dels organismes procariotes, tot i que també posseeixen MT, aquests processos de regulació consisteixen bàsicament en l'expulsió dels metalls de l'interior de les cèl·lules.

Així doncs, en els eucariotes els nivells d'ions metàl·lics lliures són baixos ja que la major part d'aquests són segrestats per les MT.⁶ Es coneix amb el nom de metal·lore regulació de la biosíntesi de MT el fenomen consistent en l'acoblament de la síntesi de MT a la concentració metàl·lica intracel·lular. Per exemple, en el cas dels mamífers s'ha observat que es pot induir la síntesi de MT a partir del subministrament de Cu o Cd a l'organisme. De manera significativa cal dir que en tots els casos s'obtenen MT que, a part de contenir quantitats variables del metall subministrat, contenen també ions Zn(II).⁷ Si bé els mecanismes i magnitud d'aquests processos encara no són coneguts en detall, els darrers treballs semblen indicar que, en el cas dels mamífers, el Zn(II) és l'únic metall pesant que indueix directament la síntesi de MT,⁸ mentre que els altres metalls pesants n'induirien la síntesi de manera indirecta. Aquesta observació permetria explicar la presència de Zn(II) en les MT natives de mamífer ara esmentades. En canvi, en el cas dels fongs tots els estudis indiquen que és el Cu(I) qui indueix

6 D R Winge, C T Dameron, G N George, *Advances in Inorganic Biochemistry*, 1994, 10, p 1-48

7 a) I Bremner, B Young, *Biochem J*, 1976, 155, 631 b) I Bremner, B Young, *Biochem J*, 1976, 157, 517 c) D R Winge, R Premakumar, K V Rajagopalan, *Arch Biochem Biophys*, 1978, 188, 466 d) J D Otvos, I M Armitage, *Proc Natl Acad Sci USA*, 1980, 77, 7094 e) R W Briggs, I M Armitage, *J Biol Chem*, 1982, 257, 1259 f) D H Petering, J. Loftsgaarden, J. Schneieder, B Fowler, *Environ Health Persp*, 1984, 54, 73 g) I L Abrahams, I Bremner, G P. Diakun, C D Garner, S S Hasnain, I Ross, M Vašak, *Biochem J*, 1986, 236, 585 h) P Chen, P Onana, C F Shaw III, D H Petering, *Biochem J*, 1996, 317, 389

8 D Bittel, T Dalton, S L A Samson, L Gedamu, G K Andrews, *J Biol Chem*, 1998, 273, 7127

directament la síntesi de MT,⁹ donant lloc a la formació d'espècies homometàl·liques Cu-MT.¹⁰ Sigui com sigui, el que sí està àmpliament acceptat és que el nivell de MT ha de respondre al fluxe entrant d'ions metàl·lics per tal de minimitzar la toxicitat induïda pel metall.

És en aquest context que es decidí de fer un estudi del paper del Zn(II) en metal·lotioneïnes de diferents espècies animals (mamífer, insecte i crustaci), per tal d'analitzar com afecta la seva presència o absència en els processos de plegament d'aquestes proteïnes en presència de Cu(I), l'altre metall fisiològicament actiu amb què les MT es poden trobar unides en estat natiu. Així mateix, també s'ha cregut convenient estudiar el comportament de les MT d'insecte i crustaci envers Cd(II), donada la major simplicitat d'interpretació que suposa l'estudi del comportament de les MT envers aquest metall, el qual presenta preferentment la geometria de coordinació tetraèdrica enfront dels tiolats cisteïnics de la proteïna. Aquests estudis serveixen per a tenir una primera informació sobre el comportament d'aquestes MT, per tal de poder encarar llavors els estudis de llur comportament envers el Cu(I), el qual presenta geometries de coordinació més versàtils. D'altra banda, a partir de la comparació del comportament de les diferents MT estudiades en presència de Cu es proposarà un nou criteri general per a classificar les MT. Aquesta Tesi Doctoral s'emmarca dins d'un projecte coordinat entre l'equip d'investigació dirigit inicialment per la Dra. Roser González i actualment per la Dra. Sílvia Atrian, del Departament de Genètica de la Universitat de Barcelona, i l'equip de recerca dirigit per la Dra. Pilar González, del Departament de Química de la Universitat Autònoma de Barcelona.

9 R K Mehra, D R. Winge, *J Cell Biochem* , 1991, 45, 30

10 a) J Bordas, M.H.J Koch, H J Hartmann, U. Weser, *Inorg Chim Acta*, 1983, 78, 113 b) S S Narula, R K Mehra, D R Winge, I M Armitage, *J Am Chem Soc* , 1991, 113, 9354 c) S S. Narula, D R Winge, I M Armitage, *Biochemistry*, 1993, 32, 6773 d) C W Peterson, S S Narula, I M Armitage, *FEBS Let* , 1996, 379, 85 e) I Bertini, H J Hartmann, T. Klein, G Liu, C Luchinat, U Weser, *Eur J Biochem* , 2000, 267, 1008

1.2. Metal·lotioneïnes

1.2.1. Descobriments i definició

Els estudis sobre metal·lotioneïnes comencen després del descobriment i caracterització per Margoshes i Vallee l'any 1957 d'una proteïna associada a zinc i cadmi a partir de còrtex de ronyó de cavall.¹¹ Aquesta proteïna va ésser anomenada "metal·lotioneïna" per Kägi i Vallee el 1960 a causa de la presència de metalls i del seu elevat contingut en sofre de residus de cisteïna.¹² Posteriorment, s'han aïllat MT a partir de la majoria de teixits de vertebrats, invertebrats, plantes i alguns microorganismes procariotes i eucariotes. El nombre d'estudis centrats en aquestes proteïnes ha anat creixent exponencialment en els darrers vint anys, de manera que fins l'abril de 1996 ja s'havien publicat més de 4000 articles sobre els seus aspectes químics, bioquímics, mediambientals, toxicològics, patològics i nutricionals.¹³ Són especialment interessants les diverses sèries monogràfiques¹⁴ i llibres¹⁵ publicats sobre les MT, i les successives actes de congressos dedicats exclusivament a MT¹⁶ proporcionen un elevat nombre de detalls i permeten assabentar-se de quin és el coneixement que es té actualment d'aquestes proteïnes.

Les metal·lotioneïnes són proteïnes que es caracteritzen per tenir un baix pes molecular (3-10 kD), estabilitat tèrmica i un alt contingut en Cys (aprox. el 30% del total de residus), les quals els confereixen una elevada capacitat per a enllaçar metalls pesants a través dels seus àtoms de sofre.^{13, 14c} Tot i l'elevat nombre de Cys presents, en les proteïnes natives no s'ha observat la presència de ponts disulfur. A més, les MT presenten només un 0-3% de residus hidrofòbics, molt per sota del 15-35% que

11 M Margoshes, B Vallee, *J Am Chem Soc*, **1957**, *79*, 4813.

12 a) J H R Kagi, B L Vallee, *J Biol Chem*, **1960**, *235*, 3460 b) J H R Kagi, B L Vallee, *J Biol Chem*, **1961**, *236*, 2435

13 M Nordberg, *Talanta*, **1998**, *46*, 243

14 a) M Vašak, J H R Kagi, *Metal Ions in Biological Systems*, **1983**, *15*, 213 b) P Kille, A Hemmings, E A Lunney, *Biochimica et Biophysica Acta*, **1994**, *1205*, 151. c) M J Stillman, *Coordination Chemistry Reviews*, **1995**, *144*, 461

15 a) E C Foulkes, ed *Biological Roles of Metallothionein*, Elsevier, **1982** b) J F Riordan, B L Vallee, eds *Methods Enzymol*, vol 205, Academic Press, San Diego, **1991** c) M J Stillman, C F Shaw III, K T Suzuki, eds *Metallothioneins*, VCH, New York, **1992**

16 a) J H R Kagi, M Nordberg, eds *Metallothionein*, Birkhäuser Verlag, Basel, **1979** b) J H R Kägi, Y Kojima, eds *Metallothionein II*, Birkhäuser Verlag, Basel, **1987** c) K T Suzuki, N Imura, M Kimura, eds *Metallothionein III*, Birkhäuser Verlag, Basel, **1993** d) C D Klaassen, ed *Metallothionein IV*, Birkhäuser Verlag, Basel, **1999**.

presenten la majoria de proteïnes.⁶ Cal destacar també que la majoria de les MT no contenen aminoàcids aromàtics ni histidina o arginina, i que presenten varies unitats Cys-X-Cys i algunes de Cys-X-Y-Cys en llur estructura primària, on X i Y representen residus diferents de Cys.¹⁷ Les MT són aïllades en forma nativa contenint metalls essencials, com Zn o Cu, però també metalls tòxics, com Cd, Hg o Pb, i quasi sempre com a unitats monomèriques.^{14c, 17b} En comparació amb els estudis realitzats *in vivo*, el tipus de metalls diferents que poden enllaçar les MT en condicions *in vitro* creix espectacularment. Així, s'han descrit MT enllaçades a Zn(II), Cd(II), Hg(II), Fe(II), Co(II), Ni(II), Pt(II), Pb(II), Cu(I), Ag(I), Au(I), Bi(III), Tc(IV) i Po.^{14c}

1.2.2. Classificació

Les MT es classificaren inicialment en tres grups principals en base principalment a l'homologia de les seves seqüències aminoacídiques –sobretot en les posicions de les Cys- així com també en base a l'estructura terciària de les espècies formades *in vitro*:^{14c, 17b}

Les MT de Classe I, que comprèn unes 60 MT aïllades a partir dels vertebrats, dels crustacis i d'alguns mol·luscs, com ostres i cargols.¹⁸ Totes elles presenten una seqüència peptídica primària d'entre 57 i 75 aminoàcids propera o similar a la de la MT de ronyó de cavall,¹⁸ i estan caracteritzades per una estructura terciària en dos dominis, corresponents als fragments C-terminal i N-terminal de la proteïna. Cal comentar que mentre que les MT de mamífer contenen 20 Cys, les de mol·lusc en contenen entre 18 i 20 i les de crustaci en contenen generalment 18 i, de manera menys freqüent, 19.

Les MT de Classe II, que es troben en plantes, fongs, la majoria d'invertebrats i alguns cianobacteris i es caracteritzen per tenir una seqüència aminoacídica no alineable a la de la MT de ronyó de cavall.¹⁸ En aquest grup, doncs, existeix una heterogeneïtat de seqüències molt superior a la present entre les MT de Classe I. A més, la majoria de les MT de Classe II estan constituïdes per un sol domini, ja que només contenen la meitat de residus de Cys que les MT de Classe I.

17. a) B.L. Vallee, W. Maret. In *Metallothionein III*, Birkhäuser Verlag, Basel, 1993, p. 1-27. b) J. Kay, A. Cryer, B.M. Darke, P. Kille, W.E. Lees, C.G. Norey, J.M. Stark, *Int. J. Biochem.*, 1991, 23, 1.

18. M.G. Cherian, H.M. Chan. In *Metallothionein III*, Birkhäuser Verlag, Basel, 1993, p. 87-109.

Les MT de Classe III són les anomenades fitoquelatines, es troben en diferents espècies del regne vegetal (fongs, algues, plantes)¹⁸ i són polipèptids constituïts a base de repeticions del doblet γ -Glu-Cys, el qual és la base per a la formació d'agregats metall-tiolat amb diversos metalls pesants. Cal indicar que les MT de Classe III no són realment proteïnes perquè no són expressades a partir d'ARN missatger, sinó que són biosintetitzades enzimàticament.¹⁹

Aquesta classificació, considerada vàlida durant molts anys, ha estat recentment vista com a insuficient per part d'alguns autors, donat que s'ha observat que la llargada de les seqüències i la distribució de les Cys és extraordinàriament variable en les MT darrerament descobertes.²⁰ Per exemple, s'ha observat que dins el grup II es podrien englobar MT tan diverses i mancades de relacions estructurals i/o evolutives com MT de plantes que contenen dos agregats de 6 Cys formats a partir de tres unitats Cys-X-Cys, on X és normalment Lys o Asn, els quals estan separats per una regió de 39 residus que conté alguns residus aromàtics (Tyr i Phe),¹⁹ com MT d'equinoderms, les quals contenen 20 Cys distribuïdes en dos dominis amb característiques estructurals similars a les MT de mamífer però en posició intercanviada,²¹ com MT de certs organismes unicel·lulars que contenen 4 triplets Cys-Cys-Cys²² o com una MT de cuc de terra constituïda per un sol domini que conté 12 Cys, tres de les quals estan constituint també un triplet Cys-Cys-Cys.²³

Aquestes i d'altres observacions són les que han provocat el debat sobre els criteris que cal utilitzar per a classificar les MT. Així, en el darrer congrés internacional sobre metal·lotioneïnes, celebrat el setembre del 1997, es va proposar un nou sistema d'ordenació basat en la divisió de les MT en famílies, subfamílies, subgrups, isoformes i subisoformes, en base als criteris seqüencials tradicionals però també en base a les relacions filogenètiques trobades darrerament, amb independència del nombre i tipus de metalls segregats *in vitro*.²⁰ D'aquesta manera, s'introdueixen els coneixements genètics que es tenen actualment i que no havien estat considerats en la classificació tradicional.

19. S. Silver, *Biodeterior. Biodegr.*, 1991, 8, 308.

20. P.A. Binz, J.H.R. Kägi. In *Metallothionein IV*, Birkhäuser Verlag, Basel, 1999, p. 7-13.

21. Y. Wang, E.A. Mackay, M. Kurasaki, J.H.R. Kägi, *Eur. J. Biochem.*, 1994, 225, 449.

22. E. Piccini, W. Staudenmann, V. Albergoni, R. De Gabrieli, P. James, *Eur. J. Biochem.*, 1994, 226, 853.

23. C. Gruber, S. Stürzenbaum, P. Gehrig, R. Sack, P. Hunziker, B. Berger, R. Dallinger, *Eur. J. Biochem.*, 2000, 267, 573.

Així, per exemple, la família de les MT de mamífer es divideix en quatre isoformes: les isoformes MT 1 i MT 2, presents principalment en els teixits parenquimàtics (fetge, ronyons, pàncrees, intestins), i dues isoformes d'expressió més restringida, la MT 3, present únicament en els astròcits cerebrals, i la MT 4, present en els teixits epitelials.

No obstant aquesta millora, darrerament s'han aïllat noves MT que tampoc no han pogut ésser classificades pel nou sistema, com la MT del col·lèmbol *Orchesella cincta*,²⁴ dues MT d'un anèl·lid²⁵ o la MT del bacteri *Thiobacillus thiooxidans*.²⁶ Aquest fet palesa la necessitat de dur a terme estudis encara més exhaustius sobre les relacions evolutives existents entre les MT de les diferents espècies animals i vegetals, per tal de poder assolir una classificació més adient d'aquestes proteïnes.

1.2.3. Característiques estructurals

És plenament conegut que en absència de metalls (forma apo-MT) aquestes proteïnes presenten una estructura desordenada (*random coil*).²⁷ En canvi, en presència de metalls aquestes proteïnes formen agregats metall-tiolat polinuclears, els quals defineixen l'estructura espacial de les MT. Així doncs, els residus no cisteínics de les MT serveixen com a espaiadors que connecten les Cys coordinants. No obstant, la formació d'agregats estables només pot ser aconseguida si la cadena polipeptídica es plega de manera que els àtoms de S quedin disposats en una situació espacial acceptable per a la geometria de coordinació dels ions metàl·lics i sense produir tensions excessives en la conformació de la proteïna. És en aquest punt precisament on rau la importància estructural dels residus no cisteínics.^{14b}

-
24. P.J. Hensbergen, M.H. Donker, M.J. Van Velzen, D. Roelofs, R.C. Van der Schors, P.E. Hunziker, N.M. Van Straalen, *Eur. J. Biochem.*, **1999**, *259*, 197.
 25. S.R. Stuzenbaum, P. Kille, A.J. Morgan, *FEBS Let.*, **1998**, *431*, 437.
 26. J. Villanueva, E.M. Ratilla, K. Kirimura, S. Usami. In *5th ISABC Meeting*, Corfu, Greece, **1999**, Abstracts Book WU-79A.
 27. M. Vašák, A. Galdes, H. Allen, O. Hill, J.H.R. Kägi, I. Bremner, B.W. Young, *Biochemistry*, **1980**, *19*, 416.

Així doncs, l'estructura terciària de les MT ve principalment determinada pel nombre i naturalesa dels ions metàl·lics coordinats, fet que pot conferir a cada possible espècie una funcionalitat diferenciada. No obstant aquestes especificitats, es poden trobar una sèrie de característiques estructurals comunes per a les MT, les quals els confereixen unes propietats de comportament químic també comunes.⁶ D'entre aquestes cal destacar les següents:

- 1) La presència de motius Cys-X-Cys i Cys-X-Y-Cys, on $X, Y \neq \text{Cys}$, que comporta l'estabilització de la cadena peptídica a través de la formació d'enllaços d'hidrogen entre el S del residu i i l'hidrogen amídic del residu $i+2$ (o $i+3$), independentment de quins residus siguin X i Y, tal com s'ha pogut observar per difracció de raigs X en Cd_3Zn_2 -MT nativa de rata (Figura 1.1).^{14b}

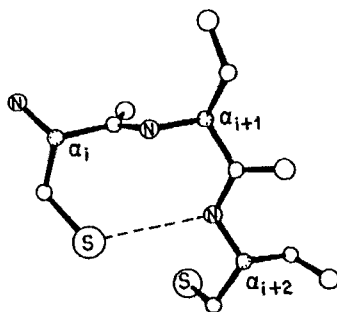


Figura 1.1. Enllaç d'hidrogen entre el S del residu i i el protó amídic del residu $i+2$ d'acord amb les dades estructurals de difracció de raigs X en Cd_3Zn_2 -MT 2A nativa de rata ^{14b}

- 2) L'escassetat de residus hidrofòbics, fet que minimitza l'estabilització estructural causada per efectes en l'entropia del solvent, de manera que l'estabilització ve principalment dominada per la formació de l'agregat polinuclear metall-tiolat.
- 3) La presència de tiolats cisteínics accessibles, que contribueixen a la reactivitat de les MT enfront agents electrofílics i en processos d'intercanvi de metalls.²⁸ S'ha observat que tot i l'elevada estabilitat termodinàmica dels agregats metall-tiolat aquests són cinèticament força làbils.

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

Les tècniques de RMN de ^{111}Cd , ^{113}Cd i/o ^1H i de difracció de raigs X han permès disposar d'informació precisa sobre l'estructura tridimensional de diverses MT. Així, s'ha pogut determinar per RMN ^{7d, 29} i difracció de raigs X³⁰ que les MT de mamífer davant de cations metàl·lics divalents com Zn(II) o Cd(II) constitueixen dos agregats metall-tiolat del tipus M_3S_9 i M_4S_{11} . D'acord amb experiments de digestió proteolítica,³¹ s'observa que l'agregat tetranuclear es situa en el fragment C-t, constituint l'anomenat domini α , i el trinuclear en el fragment N-t, constituint l'anomenat domini β . Els dos fragments polipeptídics són aproximadament del mateix tamany i embolcallen els agregats metall-tiolat donant lloc a dues espirals de quiralitat oposada³² (Figura 1.2).

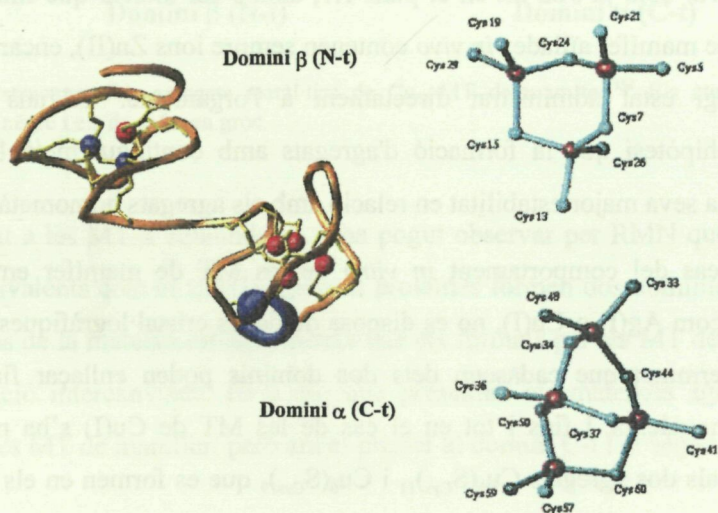


Figura 1.2. Estructura de Cd_2Zn_2 -MT 2 nativa de rata (esquerra). Els fragments de cadena amb estructura desordenada s'indiquen en groc fosc mentre que els fragments amb estructura d'hèlix s'indiquen en blau. L'esquelet hidrocarbonat de les Cys s'indica en groc clar, els ions Zn(II) en blau i els ions Cd(II) en vermell. Per motius de claredat s'han omès els hidrògens de les Cys. Coordenades cristal·logràfiques segons el Protein Data Bank.³⁰ A la dreta es mostra l'estructura dels agregats metàl·lics formats.

29. a) J.D. Otvos, I.M. Armitage, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1980**, *77*, 7094. b) Y. Boulanger, C.M. Goodman, C.P. Forte, S.W. Fesik, I.M. Armitage, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1983**, *80*, 1501. c) A. Arseniev, P. Schultze, E. Wörgötter, W. Braun, G. Wagner, M. Vašák, J.H.R. Kägi, K. Wüthrich, *J. Mol. Biol.*, **1988**, *201*, 637. d) M. Good, R. Hollestein, P.J. Sadler, M. Vašák, *Biochemistry*, **1988**, *27*, 7163. e) A. Arseniev, P. Schultze, E. Wörgötter, W. Braun, G. Wagner, M. Vašák, J.H.R. Kägi, K. Wüthrich, *J. Mol. Biol.*, **1988**, *201*, 637. f) P. Schultze, E. Wörgötter, W. Braum, G. Wagner, M. Vašák, J.H.R. Kägi, K. Wüthrich, *J. Mol. Biol.*, **1988**, *203*, 251. g) B.A. Messerle, A. Schäffer, M. Vašák, J.H.R. Kägi, K. Wüthrich, *J. Mol. Biol.*, **1990**, *214*, 765. h) B.A. Krizek, B.T. Amann, V.J. Kilfoil, D.L. Merkle, J.M. Berg, *J. Am. Chem. Soc.*, **1991**, *113*, 4518. i) J.D. Otvos, K. Liu, H. Li, G. Shen, M. Basti, *Experientia Supplementum. Metallothionein*, **1993**, *57*. j) K. Zangger, G. Oz, J.D. Otvos, I.M. Armitage, *Prot. Sci.*, **1999**, *8*, 2630.
30. A.H. Robbins, D.E. McRee, M. Williamson, S.A. Collett, N.H. Xuong, W.F. Furey, B.C. Wang, C.D. Stout, *J. Mol. Biol.*, **1991**, *221*, 1269.
31. D.R. Winge, K.A. Miklossy, *J. Biol. Chem.*, **1982**, *257*, 3471.
32. J.H.R. Kägi, A. Schäffer, *Biochemistry*, **1988**, *27*, 8509.

En ambdós dominis tots els àtoms metàl·lics presenten un entorn de coordinació de tipus MS_4 tetraèdric. El domini α presenta la meitat dels àtoms metàl·lics coordinats per dos tiolats pontals i dos tiolats terminals i l'altra meitat per tres tiolats pontals i un de terminal. En el domini β tots tres àtoms metàl·lics estan coordinats per dos tiolats pontals i dos de terminals. En total, doncs, dels 20 àtoms de sofre cisteínics 8 actuen de pont i els 12 restants actuen com a lligands terminals.

A més, les dades espectroscòpiques de RMN i difracció de raigs X també han demostrat l'isomorfisme entre la proteïna complexada a Zn(II) o Cd(II)³³ i entre la proteïna cristal·lina i en solució,^{34, 29i} i la manca pràcticament total d'interacció entre els dos dominis. Tal com ja s'ha dit en el punt 1.1, també cal indicar que fins al moment totes les MT de mamífer aïllades *in vivo* contenen sempre ions Zn(II), encara que aquest metall no hagi estat administrat directament a l'organisme.⁷ Alguns autors han assenyalat la hipòtesi que la formació d'agregats amb contingut metàl·lic mixte ve afavorida per la seva major estabilitat en relació amb els agregats homometàl·lics.²⁸

En el cas del comportament *in vitro* de les MT de mamífer envers metalls monovalents, com Ag(I) o Cu(I), no es disposa de dades cristal·logràfiques ni de RMN però s'ha determinat que cadascun dels dos dominis poden enllaçar fins a 6 ions metàl·lics monovalents, i fins i tot en el cas de les MT de Cu(I) s'ha proposat una estructura per als dos agregats $Cu_6(S_{Cys})_{11}$ i $Cu_6(S_{Cys})_9$ que es formen en els dominis α i β , respectivament (Figura 1.3).³⁵ Aquests autors proposen que tots els àtoms de Cu presenten un entorn de coordinació de tipus CuS_3 plano-trigonal, i que mentre que el domini α presenta quatre àtoms de Cu units a dos tiolats pontals i un de terminal i dos àtoms de Cu units a tres tiolats pontals, el domini β presenta tots els sis àtoms de Cu units a tres tiolats pontals. Així doncs, dels 20 àtoms de sofre cisteínics de la proteïna 16 actuarien com a pontals i 4 com a terminals.

33. B.A. Messerle, A. Schäffer, M. Vašák, J.H.R. Kägi, K. Wüthrich, *J. Mol. Biol.*, **1992**, 225, 433.

34. W. Braun, M. Vašák, A.H. Robbins, C.D. Stout, G. Wagner, J.H.R. Kägi, K. Wüthrich, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1992**, 89, 10124.

35. a) K.B. Nielson, C.L. Atkin, D.R. Winge, *J. Biol. Chem.*, **1985**, 260, 5342. b) G.N. George, D. Winge, C.D. Stout, S.P. Cramer, *J. Inorg. Biochem.*, **1986**, 27, 213. c) A. Presta, M. J. Stillman, *Chirality*, **1994**, 6, 521. d) M.J. Sillman, A. Presta, Z. Gui, D.T. Jiang, *Metal-Based Drugs*, **1994**, 1, 1. e) A. Presta, A.R. Green, A. Zelazowski, M.J. Stillman, *Eur. J. Biochem*, **1995**, 227, 226. f) H. Li, J.D. Otvos, *Biochemistry*, **1996**, 35, 13929. g) A. Presta, D.A. Fowle, M.J. Stillman, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, **1997**, 977.

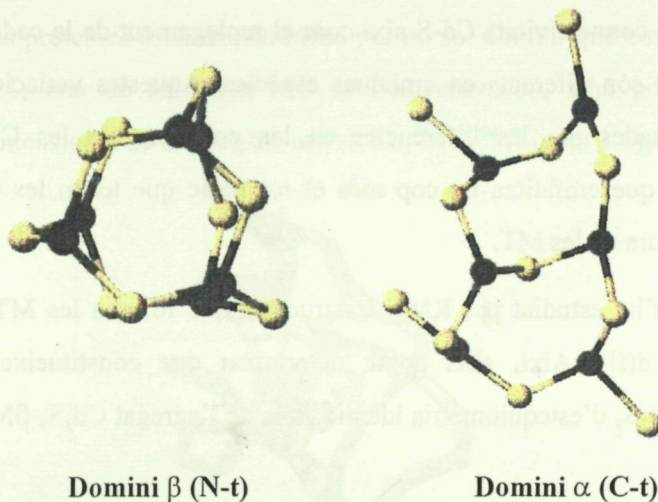


Figura 1.3. Estructura dels agregats metàl·lics de Cu_{12} -MT de mamífer.^{35d} Els àtoms de $Cu(I)$ es representen en negre i els de sofre en groc.

Quant a les MT d'equinoderm, s'ha pogut observar per RMN que en presència de metalls divalents com el $Cd(II)$ aquestes proteïnes formen dos dominis pràcticament no interactius de la mateixa estequiometria que els formats per les MT de mamífer però amb la posició intercanviada. És a dir, que presenten els mateixos agregats Cd_3S_9 i Cd_4S_{11} que les MT de mamífer, però ara el primer al domini C-t i el segon al N-t (Figura 1.4).³⁶

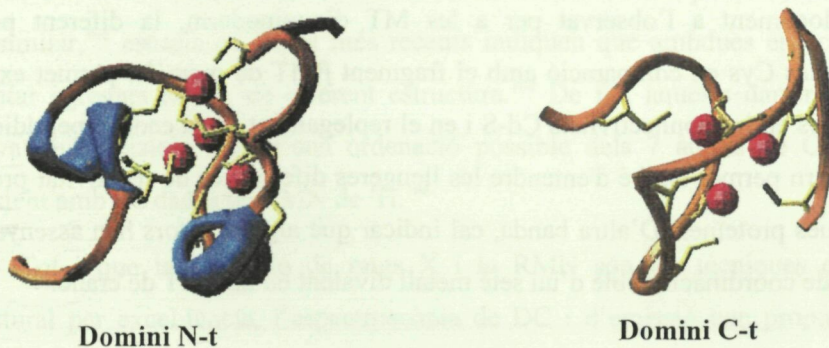


Figura 1.4. Estructura dels dos dominis de Cd_7 -MTA recombinant de l'eriçó de mar *Strongylocentrotus purpuratus* (Protein Data Bank).³⁶ La representació és anàloga a la utilitzada en la Figura 1.2.

36. R. Riek, B. Precheur, Y. Wang, E.A. Mackay, G. Wider, P. Guntert, A. Liu, J.H.R. Kägi, K. Wüthrich, *J. Mol. Biol.*, 1999, 291, 417.

No obstant aquestes similituds d'estequiometria amb els dominis de la Cd₇-MT de mamífer, les connectivitats Cd-S així com el replegament de la cadena peptídica en molts segments són diferents en ambdues espècies. Aquestes variacions es creu que poden ser causades per les diferències en les posicions de les Cys en ambdues seqüències, fet que emfatitza un cop més el rol bàsic que tenen les Cys a l'hora de definir l'estructura de les MT.

També s'ha estudiat per RMN l'estructura que formen les MT de crustaci en presència de Cd(II). Així, s'ha pogut determinar que constitueixen dos agregats independents Cd₃S₉ d'estequiometria idèntica a la de l'agregat Cd₃S₉-βMT de mamífer³⁷ (Figura 1.5).

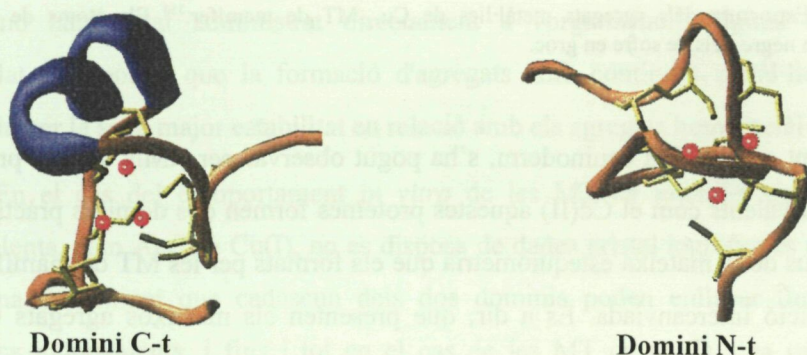


Figura 1.5. Estructura dels dos dominis de Cd₆-MT I nativa del cranc *Callinectes sapidus* (Protein Data Bank).^{37d} La representació és anàloga a la utilitzada en la Figura 1.2.

Anàlogament a l'observat per a les MT d'equinoderm, la diferent posició d'alguna de les Cys en comparació amb el fragment βMT de mamífer permet explicar les diferències en les connectivitats Cd-S i en el replegament de la cadena peptídica, fet que al seu torn permet també d'entendre les lleugeres diferències de reactivitat presents entre ambdues proteïnes. D'altra banda, cal indicar que alguns autors han assenyalat la possibilitat de coordinació feble d'un setè metall divalent en una MT de cranc.³⁸

37. a) J.D. Otvos, R.W. Olafson, I.M. Armitage, *J. Biol. Chem.*, **1982**, 257, 2427. b) Z. Zhu, E.F. De Rose, G.P. Mullen, D.H. Petering, C.F. Shaw III, *Biochemistry*, **1994**, 33, 8858. c) Z. Zhu, D.H. Petering, C.F. Shaw III, *Inorg. Chem.*, **1995**, 34, 4477. d) S.S. Narula, M. Brouwer, Y. Hua, I.M. Armitage, *Biochemistry*, **1995**, 34, 620.

38. J. Overnell, M. Good, M. Vašák, *Eur. J. Biochem.*, **1988**, 172, 171.

El darrer grup de MT que han estat estudiades per RMN ha estat el de les MT de llevat.¹⁰ Aquestes proteïnes estan constituïdes per un sol domini que conté 12 Cys, i en el cas de CUP1, una de les dues MT de *Sac.cerevisiae*, s'ha pogut determinar l'estructura tridimensional de la proteïna nativa Cu₇-MT^{10d} (Figura 1.6).

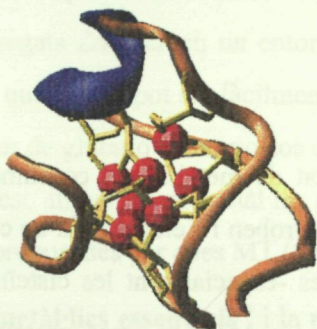


Figura 1.6. Estructura de Cu₇-CUP1 nativa del llevat *Saccharomyces cerevisiae* (Protein Data Bank).^{10d} La representació de l'estructura de la cadena peptídica és anàloga a la utilitzada en la Figura 1.2, mentre que els ions Cu(I) s'han representat de color vermell.

De manera excepcional en les MT, en el cas de CUP1 de *Sac.cerevisiae* s'ha observat que no totes les Cys participen en la coordinació dels metalls. Així, només 10 de les 12 Cys participen en la formació de l'agregat Cu₇S₁₀, en el qual coexisteixen unitats CuS₂ i CuS₃. Les Cys no involucrades en la coordinació metàl·lica són les dues darreres de l'extrem C-t (C49 i C50), i actualment encara no se sap quin paper realitzen. D'altra banda, si bé aquests autors consideren que l'espècie Ag₇-CUP1 obtinguda a partir de Cu₇-CUP1 presenta les mateixes connectivitats M^I-S i, per tant, una estructura molt similar,^{10d} estudis de RMN més recents indiquen que ambdues espècies podrien presentar agregats M^I₇S₁₀ de diferent estructura.^{10e} De fet, aquests darrers autors han observat que existeix més d'una ordenació possible dels 7 àtoms de Cu que sigui consistent amb les dades de RMN de ¹H.^{10e}

Tot i que la difracció de raigs X i la RMN són les tècniques d'elucidació estructural per excel·lència, l'espectroscòpia de DC i d'emissió han proporcionat una informació considerable sobre la coordinació dels metalls a les MT. Així, s'han identificat diversos motius estructurals a partir d'estudis realitzats amb Zn(II), Cd(II), Hg(II), Cu(I) o Ag(I). Per exemple, s'ha determinat que la MT nativa de fetge de conill forma els agregats Zn₇-MT, Cd₇-MT, Cu₁₂-MT, Ag₁₂-MT, Ag₁₈-MT o Hg₁₈-MT.^{14c}

Estudis realitzats en aquest laboratori amb MT 1 recombinant de ratolí i els seus fragments han demostrat l'extraordinària capacitat coordinant d'aquestes proteïnes per tal de formar espècies de diversa estructura i nuclearitat en presència de Cd(II),³⁹ Hg(II)^{39e 40} o Ag(I).^{39e 41}

1 2 4 Funcions fisiològiques

Donada la gran diversitat de metalls que coordinen les MT, la gran varietat d'organismes en què aquestes es troben i l'elevat grau de conservació que presenten les seves seqüències aminoacídiques -especialment les cisteïnes- en organismes diferents del mateix ordre, es creu que les MT són unes proteïnes d'una gran importància biològica. D'altra banda, s'ha vist que les possibles funcions fisiològiques de les metal·lotioneïnes són conseqüència de les característiques fisicoquímiques dels seus agregats metall-tiolat. Fins al moment s'han proposat les següents funcions genèriques per a les MT, totes estretament relacionades les unes amb les altres:

- a) **Emmagatzament dels ions metàl·lics essencials Zn(II) i Cu(I).** Aquesta funció ha estat proposada en base sobretot als elevats nivells hepàtics endògens de Zn-MT i Cu-MT en fetus i nounats de diversos mamífers, fet que indicaria que les MT podrien servir com a proteïnes d'emmagatzement intracel·lular d'aquests metalls essencials durant el desenvolupament perinatal,¹⁸ reduint-ne així llur concentració com a metalls lliures.

-
- 39 a) Nuria Romero Isart, *Treball de Recerca*, Facultat de Ciències, UAB, 1995 b) M Capdevila, N Romero, N Cols, S Atrian, M J Stillman, R González-Duarte, P González-Duarte, *Anales de Química, Int Ed*, 1996, 92, 199 c) M Capdevila, N Romero, N Cols, S Atrian, R González-Duarte, P González-Duarte, *Cell Mol Life Sci*, 1997, 53, 681 d) N Cols, N Romero, M Capdevila, B Oliva, S Atrian, R González-Duarte, P González-Duarte, *J Inorg Biochem*, 1997, 68, 157 e) S Atrian, R Bofill, M Capdevila, N Cols, P González-Duarte, R González-Duarte, A Leiva, O Palacios, N Romero-Isart In *Metallothionein IV*, Birkhäuser, Verlag, Basel, 1999, p 55-61 f) N Cols, N Romero-Isart, R Bofill, M Capdevila, P González-Duarte, R González-Duarte, S Atrian, *Prot Engng*, 1999, 12, 265
- 40 Angels Leiva Presa, *Treball de Recerca*, Facultat de Ciències, UAB, 1997
- 41 a) Oscar Palacios Bonilla, *Treball de Recerca*, Facultat de Ciències, UAB, 1997 b) R Bofill, O Palacios, M Capdevila, N Cols, R González-Duarte, S Atrian, P Gonzalez-Duarte, *J Inorg Biochem*, 1999, 73, 57

b) **Detoxificació de radicals lliures**⁴² gràcies al caràcter reductor dels grups sulfhidril. Per exemple, s'ha observat que les Cu-MT de llevat posseeixen funcions antioxidants,⁴³ que les isoformes MT 1 i MT 2 de mamífer són induïdes davant de condicions d'estrès oxidatiu⁴⁴ o que les cèl·lules de mamífer que no poden sintetitzar MT són més vulnerables en aquestes condicions.^{16d} En el cas concret de les Zn-MT, s'ha postulat que els agregats Zn-S creen un entorn oxidoreductor per al Zn a un potencial redox tan baix que la MT pot ser fàcilment oxidada per oxidants cel·lulars suaus, tals com el disulfur de glutatió o compostos de Se, amb la consegüent pèrdua del Zn coordinat.⁴⁵ Aquest alliberament metàl·lic podria estar relacionat amb les següents dues funcions proposades per a les MT (vegeu apt. c i d).

c) El **transport d'ions metàl·lics essencials**⁴⁶ i la **reconstitució d'altres proteïnes o enzims demetal·lats**,⁴⁷ potser amb l'ajuda d'altres molècules com, per exemple, el glutatió. És a dir, que les MT podrien actuar com a xaperones per a la síntesi de metal·loproteïnes.^{45b}

No obstant, aquesta funció ha estat posada en qüestió darrerament. Experiments genètics han evidenciat que la transferència de Zn des de les MT a d'altres molècules no és un procés essencial per a la supervivència cel·lular, donat que s'ha observat que més de la meitat del Zn intracel·lular pot ser intercanviat per Zn extracel·lular en poques hores en cèl·lules de mamífer que no posseeixen la capacitat de sintetitzar MT.⁴⁸ Així doncs, potser les MT no són unes molècules indispensables en condicions normals, però podrien servir com a una important reserva de metalls essencials quan la concentració d'aquests fos escassa o quan les cèl·lules estiguessin exposades a canvis en l'estat d'oxidació.^{45b} Per exemple, s'ha observat que canvis en el potencial redox de la cèl·lula tan petits com 15 mV poden afectar de manera crítica certs processos bioquímics, com p.ex. la unió de factors de

-
42. M.G. Cherian, S.B. Howell, N. Imura, C.D. Klaassen, J. Koropatnik, J.S. Lazo, M.P. Waalkes, *Toxic. Appl. Pharm.*, **1994**, *126*, 1.
43. K.T. Tamai, E.B. Gralla, L.M. Ellerby, J.S. Valentine, D.J. Thiele, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1993**, *90*, 8013.
44. S.K. De, M.T. Mc Caster, G.K. Andrews, *J. Biol. Chem.*, **1990**, *265*, 15267.
45. a) B.L. Vallee, *Neurochem. Int.*, **1995**, *27*, 23. b) R.D. Palmiter, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1998**, *95*, 8428. c) W. Maret, *J. Nutrition*, **2000**, *130*, 1455S.
46. W.E.N.D. Evering, S. Haywood, I. Bremner, A.M. Wood, J. Trafford, *Chem. Biol. Interactions*, **1991**, *78*, 297.
47. W. Maret, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1994**, *91*, 237.
48. R.D. Palmiter, S. Findley, *EMBO J.*, **1995**, *14*, 639.

transcripció a l'ADN, i alhora permeten alliberar Zn de la MT.^{45c} L'altra possible propietat de les MT relacionada amb llur capacitat d'alliberament de Zn seria la que es descriu tot seguit.

d) **Proliferació cel·lular**,⁴⁹ procés al llarg del qual es requereixen quantitats gens menyspreables de Zn per tal de sintetitzar nous enzims de Zn, dels quals se'n coneixen més de 300. Així, durant els processos de proliferació cel·lular hepàtica i maduració en diversos mamífers, s'han detectat canvis importants en els nivells i la localització cel·lular de MT.¹⁸ La proliferació cel·lular està activada per la presència d'agents oxidants en el citosol.^{45c, 50} Així, per exemple, s'ha suggerit que certs esteroides, interferons i catecolamines indueixen la síntesi de MT, fenomen que ajudaria a la regulació de la distribució de Zn a dins de la cèl·lula⁵¹ i, en definitiva, regularia la biosíntesi de proteïnes de Zn durant la proliferació cel·lular.

e) **Segrestament d'ions metàl·lics tòxics**.⁵² Aquesta funció s'ha proposat en base a experiments efectuats *in vivo* amb organismes modificats genèticament per tal que no puguin sintetitzar MT (organismes *knock-out*). Aquests organismes presenten una acusada major sensibilitat a la toxicitat per Cd, mentre que només lleugerament major en el cas de Cu o Zn.^{45b} El motiu d'aquest fet podria ser que la primera via de defensa coneguda davant un increment excessiu de la concentració de Zn i Cu a dins de les cèl·lules de mamífer és la seva expulsió. En canvi, la manca de mecanismes d'expulsió coneguts en el cas del Cd confereix a les MT un paper primordial com a segrestadors d'aquest metall.^{45b}

No obstant aquest fet, alguns autors han suggerit que la concentració intracel·lular de MT no pot ser massa elevada, ja que nivells excessius de MT podrien afectar la distribució de metalls essencials.⁶ En aquest sentit, es creu que la inducció de MT per agents no metàl·lics (vegeu apt. d) podria ser un mecanisme de regulació de la distribució de Zn a dins de la cèl·lula.⁵¹

49. T. Wlostowski, *Biometals*, **1993**, 6, 71

50. R.H. Burdon, *Free Rad. Biol. Med.*, **1995**, 18, 775.

51. J. Zeng, R. Heuchel, W. Schaffner, J.H.R. Kägi, *FEBS Let.*, **1991**, 279, 310.

52. E.J. Kasarskis, W.D. Ehmann, W.R. Markesbery, *Essential and Toxic Trace Elements in Human Health and Disease: an update*, In Prasad S.A. Ed., New York, **1993**, p. 299-310.

D'altra banda, caldria considerar que el **paper detoxificador** de les MT és conseqüència més aviat d'una propietat química inherent d'aquestes proteïnes més que no pas d'una funció evolutiva implícita, donat que els episodis de contaminació per metalls pesants han aparegut a la Terra de manera freqüent només en els darrers decennis a causa de l'acció humana, període de temps insignificant respecte els milions d'anys d'existència de les MT.^{45a, b}

També cal indicar que les MT podrien presentar capacitat de **resistència a la toxicitat induïda pels agents alquilants** utilitzats durant el tractament quimioterapèutic del càncer, ja que s'ha observat que la síntesi de MT és induïda per la presència d'aquestes drogues,⁵³ les quals són segrestades covalentment per les MT.⁵⁴

Quant a les isoformes MT 3 i MT 4 de mamífer, es creu que podrien tenir funcions específiques i diferenciades de les corresponents a les isoformes MT 1 i MT 2. Així, s'ha postulat que la MT 3, una Cu₄Zn₃-MT de 68 residus que conté 7 residus de més respecte les isoformes 1 i 2 de mamífer i l'expressió de la qual no està regulada per metalls,¹³ actua com a **factor inhibidor del creixement neuronal** (growth inhibitory factor, GIF). Aquesta MT ha estat relacionada per alguns autors amb la malaltia d'Alzheimer perquè evita la formació de dendrites en cultius neuronals extrets de cervells que presenten aquesta malaltia i perquè aquesta proteïna és poc abundant de manera natural en aquest tipus de cervells.⁵⁵ No obstant, d'altres autors creuen que no existeix una relació directa entre la MT 3 i la malaltia d'Alzheimer.⁵⁶ L'altra isoforma, la MT 4, és una Cu₂Zn-MT de 62 aminoàcids que és induïda durant la diferenciació de l'epiteli escamós estratificat de la boca, esòfag i extremitats i també de la pell neonatal,⁵⁷ i es creu que presenta propietats defensives davant dels radicals lliures.⁵⁸

-
53. S.L. Kelley, A. Basu, B.A. Teicher, M.P. Hacker, D.H. Hamer, J.S. Lazo, *Science*, **1988**, *241*, 1813.
 54. a) X. Yu, Z. Wu, C. Fenselau, *Biochemistry*, **1995**, *34*, 3377. b) J. Zaia, L. Jiang, M.S. Han, J.R. Tabb, Z. Wu, D. Fabris, C. Fenselau, *Biochemistry*, **1996**, *35*, 2830.
 55. a) Y. Uchida, K. Takio, K. Titani, Y. Ihara, M. Tomonaga, *Neuron*, **1991**, *7*, 3337. b) R.D. Palmiter, S.D. Findley, T.E. Whitmore, D.M. Durnam, *Proc Natl Acad Sci USA*, **1992**, *89*, 6333. c) S. Tsuji, H. Kobayashi, Y. Uchida, Y. Yhara, T. Miyatake, *EMBO J*, **1992**, *11*, 4843.
 56. J.C. Erickson, A.K. Sewell, L.T. Jensen, D.R. Winge, R.D. Palmiter, *Brain Res*, **1994**, *649*, 247.
 57. C.J. Quaife, S.D. Findley, J.C. Erickson, G.J. Froelick, E.J. Kelly, B.P. Zambrowicz, R.D. Palmiter, *Biochemistry*, **1994**, *33*, 7250.
 58. a) J. Hidalgo, L. Campmany, M. Borràs, J.S. Garvey, A. Armario, *Am J Physiol*, **1988**, E518. b) C.T. Aravindakumar, J. Ceulemans, M. De Ley, *Biochem J*, **1999**, *344*, 253. c) R.I. Viner, T.D. Williams, L. Schoneich, *Biochemistry*, **1999**, *38*, 12408.

Tot i els avenços aconseguits en els darrers anys, encara avui en dia, després de més de quaranta anys d'ençà del descobriment de les MT, les seves possibles funcions fisiològiques són motiu de controvèrsia. Tal com deia Richard D. Palmiter en un article recent,^{45b} "It is surprising that elucidating the function of these unusual inducible proteins that are expressed ubiquitously should be so difficult".

1.2.5. Reactivitat

Generalment, les reaccions en les que es veuen involucrades les MT estan relacionades amb les seves propietats com a lligands multidentats o com a agents reductors.⁵⁹ Les reaccions de MT més ben estudiades són les d'incorporació de metalls i les de substitució de metalls. Aquestes reaccions són força ràpides ja que la coordinació de metalls a les MT presenta una elevada estabilitat termodinàmica però en canvi una molt baixa estabilitat cinètica, de manera que la unió de metalls és forta però aquests poden ser fàcilment intercanviats amb els d'altres proteïnes.⁶⁰

Tot i el fet que l'espècie apo-MT presenta molt poca estructura terciària a causa de la baixa hidrofobicitat dels seus residus,^{6,61} la reconstitució d'apo-MT de mamífer amb Zn(II) o Cd(II) transcorre donant lloc a la formació d'agregats metall-tiolat idèntics als de la proteïna en estat natiu, amb les mateixes connectivitats metall-cisteïna.⁵⁹ De forma interessant, s'ha vist que el Cd(II) afegit a apo-MT de mamífer s'uneix preferentment al domini α ,⁶² mentre que el Cu(I) prefereix el domini β .⁶³ Les mateixes preferències del Cd(II) per al domini α ^{62a} i del Cu(I) per al β han estat observades a pH 7 partint de l'espècie Zn₇-MT.

Les MT participen ràpidament en reaccions d'intercanvi o substitució de metalls, en les que un ió metàl·lic amb més alta afinitat d'unió a les MT -i.e., als tiolats alifàtics

59. Paul Anthony Presta, *PhD. Theses*, University of Western Ontario, Faculty of Graduate Studies, 1995.

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

61. D.R. Winge, C.T. Dameron. In *Metallothionein III*, Birkhäuser Verlag, Basel, 1993, p. 381-397.

62. a) M.J. Stillman, W. Cai, A.J. Zelazowski, *J. Biol. Chem.*, 1987, 262, 4538. b) M.J. Stillman, A.J. Zelazowski, *J. Biol. Chem.*, 1988, 263, 6128.

63. a) K.B. Nielson, D.R. Winge, *J. Biol. Chem.*, 1984, 259, 4941. b) K.B. Nielson, D.R. Winge, *J. Biol. Chem.*, 1985, 260, 8698. c) F.J. Kull, H.F. Reed, T.E. Elgren, T.L. Ciardelli, D.E. Wilcox, *J. Am. Chem. Soc.*, 1990, 112, 2291. d) P. Chen, A. Muñoz, D. Nettesheim, C.F. Shaw III, D.H. Petering, *Biochem. J.*, 1996, 317, 395.

de les sevs Cys- desplaça un ió metàl·lic inicialment unit a una MT amb una afinitat menor. L'ordre d'afinitats d'unió dels ions metàl·lics a les MT és el següent: Hg(II) > Ag(I) ~ Au(I) > Cu(I) > Cd(II) > Co(II) ~ Zn(II) ~ Fe(II).⁵⁹

Existeixen dos possibles mecanismes de coordinació dels ions metàl·lics a les MT de dos dominis: *específicament per dominis*, quan els ions s'enllacen preferentment a un dels dominis, o *estadísticament distribuïts* als dos dominis, quan no hi ha una preferència clara per cap dels dominis i els ions s'hi uneixen de manera aleatòria. D'altra banda, la unió de metalls a les MT pot ser qualificada de *cooperativa* si es forma una sola espècie a expenses de totes les espècies intermèdies possibles, de manera que la formació d'una primera molècula de l'espècie en qüestió suposa la formació de tantes molècules de la mateixa espècie com sigui possible en funció de la quantitat de metall disponible.

L'extremada habilitat de les MT per a enllaçar ions metàl·lics, tant directament com mitjançant reaccions de desplaçament, és conseqüència de la plasticitat i flexibilitat de la seva estructura així com de la labilitat cinètica dels agregats metall-tiolat formats. Les dades de RMN^{28,29f} i de difracció de raigs X³⁰ demostren clarament la manca de rigidesa dels agregats polinuclears en base al desordre dinàmic dels girs polipeptídics que uneixen les Cys coordinants i al ràpid intercanvi dels protons amídics de llur estructura.⁶⁴ És precisament aquesta flexibilitat el que dificulta estudiar la possibilitat d'interacció o no entre els dominis de les MT bidomínials. No obstant, d'altres autors creuen que justament la manca total d'informació per RMN de la zona interdominial a causa de l'extremada flexibilitat de la proteïna indica que els dos dominis són independents.²⁸

Els partidaris de la hipòtesi de la independència dels dos dominis en les MT bidomínials assenyalen com a argument addicional que s'obtenen les mateixes estequiometries per als fragments aïllats que quan aquests estan junts en la proteïna sencera.^{63b,65} No obstant, estudis més recents realitzats per membres d'aquest grup d'investigació indiquen que si bé es pot obtenir la mateixa estequiometria amb els

64. B.A. Messerle, M. Bos, A. Schäffer, M. Vašák, J.H.R. Kägi, K. Wüthrich, *J. Mol. Biol.*, **1990**, *214*, 781.

65. a) Y.J. Li, U. Weser, *Inorg. Chem.*, **1992**, *31*, 5526. b) S. Matsumoto, S. Nakayama, Y. Nishiyama, Y. Okada, K.S. Min, S. Onosaka, K. Tanaka, *Chem. Pharm. Bull.*, **1992**, *40*, 2694. c) S. Matsumoto, Y. Nishiyama, Y. Okada, K.S. Min, S. Onosaka, K. Tanaka, *Chem. Pharm. Bull.*, **1992**, *40*, 2701.

fragments aïllats que formant part de la proteïna sencera, llur estructura es veu lleugerament modificada per la presència de l'altre domini, indicant l'existència d'interaccions entre dominis.^{39c}

Aquesta no absoluta independència entre dominis ha estat també corroborada a partir de mesures de la capacitat de transferència de Zn(II) per part dels dos dominis de la MT 2 humana⁶⁶ i també per l'observació de la pèrdua d'estabilitat *in vivo* de MT mutants amb zones interdomini més llargues que les de les MT natives.⁶⁷ A més, s'ha observat per RMN que els metalls s'intercanvien entre ambdós dominis i dins del mateix domini a T ambient.²⁸ Així, per exemple, es calcula que en la Cd₇-MT de mamífer el temps de vida mig dels metalls en processos d'intercanvi intra i intermoleculars és de l'ordre de 0.5 segons en el domini β i de 16 minuts en el domini α .⁶⁸

Les metal·lotioneïnes presenten una alta reactivitat enfront els electròfils, quedant sovint oxidades en aquests processos.⁴⁷ Aquestes reaccions són també molt eficients a l'hora d'arrencar els metalls units a les MT. Per exemple, la MT de fetge de conill reacciona amb el disulfur de glutatió (GSSG) o el 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoat) (DTNB). La reacció que té lloc és l'oxidació dels grups tiolat de la MT a disulfur prèvia pèrdua dels metalls que presentaven units i la reducció del GSSG o DTNB a glutatió (GSH) o 5-tio-2-nitrobenzoat (TNB), respectivament. La reacció amb DTNB és la base del mètode anomenat d'Ellman⁶⁹ de determinació per mètodes colorimètrics de la concentració de MT.

Tal com ja s'ha explicat en l'apartat 1.2.4, també s'ha descrit la interacció de les MT amb CCl₄, agents orgànics alquilants com el clorambucil o el iodoacetat, drogues antiartrítics de Au(I), agents antitumorals de Pt(II) i radicals hidroxil o superòxid.²⁸ A més, s'ha observat que la Zn-MT allibera els ions Zn(II) per reacció amb òxid nítric⁷⁰ o N-etilmaleïmida,²⁸ a conseqüència de la nitrosilació de les Cys seguit de la formació de

66. J.L. Jiang, M. Vašák, B.L. Vallee, W. Maret, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2000**, *97*, 2503.

67. K.I. Rhee, K.S. Lee, P.C. Huang, *Prot. Engng.*, **1990**, *3*, 221.

68. a) J.H.R. Kägi, *Methods Enzymol.*, **1991**, *205*, p. 613-626. b) J.D. Otvos, X. Liu, H. Li, G. Shen, M. Basti. In *Metallothionein III*, Birkhäuser Verlag, Basel, **1993**, p. 57-74.

69. G.L. Ellman, *Archives Biochem. Biophys.*, **1959**, *82*, 70.

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

ponts disulfur en el primer cas o de la formació de derivats tioéter de les Cys en el segon cas.

Un altre exemple de reactivitat de les MT és l'extracció del Cu(I) contingut en Cu-MT per reacció amb H_2O_2 .⁷¹ D'altra banda, és ben coneguda la reactivitat dels tiolats alifàtics en presència de Cu(II): reducció del Cu(II) a Cu(I) i oxidació dels tiolats a disulfur, seguit de coordinació del Cu(I) als grups tiolat restants en el cas d'haver-hi excés estequiomètric d'aquests grups coordinants. En aquest sentit, les MT poden representar una bona via d'obtenció d'importantes reserves de Cu(I) a partir d'espècies de Cu(II).

71. A. Richter, U. Weser, *Inorg. Chim. Acta*, **1988**, *151*, 145.

1.3. Mètodes d'obtenció de metal·lotioneïnes

D'ençà de la descoberta de les MT, el procediment més utilitzat per a la seva obtenció ha estat la seva **inducció** en éssers vius per diferents vies i el seu posterior **aïllament i purificació** a partir dels òrgans on més s'ha expressat. Pel que fa a la inducció de la síntesi de MT, actualment es coneix un alt nombre de factors que la provoquen, com l'exposició a radiació UV, raigs X, infeccions víriques o bacterianes diverses, determinades hormones, diversos metalls pesants, tant tòxics com essencials, agents oxidants radicalaris presents en els processos de stress oxidatiu o en processos inflamatoris,¹⁸ i agents citotòxics,¹⁷ com p.ex. les substàncies alquilants.⁵³ Pel que fa a l'aïllament i caracterització de les MT, tot i el progrés aconseguit en els darrers anys, cal dir que aquest és precisament el punt que més dificulta l'obtenció de la proteïna amb una qualitat final acceptable. La purificació d'una proteïna a partir d'organismes sencers o d'òrgans aïllats i l'obtenció dels seus fragments per digestió de la mateixa és una tasca difícil i llarga que no sempre condueix a un bon resultat. L'èxit de l'experiment dependrà essencialment de la quantitat relativa de proteïna en la mostra inicial i dels potencials contaminants biològics. Per exemple, les MT de mamífer es sintetitzen principalment en el fetge i aquest hauria d'ésser el material de partida per a la purificació. Però el fetge és també un reservori important de proteases que apareixen en l'homogeneat inicial, les quals, si no són eliminades ràpidament, degraden la proteïna que es pretén obtenir. És molt difícil d'eliminar totalment aquests contaminants, que d'altra banda actuen a molt baixa concentració i amb extrema celeritat. Per tal d'evitar els problemes esmentats, diversos autors han intentat com a mètode alternatiu la **síntesi química** sobre suport sòlid de les cadenes peptídiques corresponents a MT de mamífer⁷² i els seus fragments.^{63c, 73}

Una alternativa òptima consisteix en l'ús de l'**enginyeria genètica**, que permet la bioproducció de MT mitjançant microorganismes modificats genèticament. La tecnologia de l'enginyeria genètica, o de l'ADN recombinant, permet utilitzar cèl·lules bacterianes, de llevats o de mamífer per a sintetitzar productes heteròlegs, és a dir,

72. Y. Nishiyama, S. Nakayama, Y. Okada, K. S. Min, S. Onosaka, K. Tanaka, *Chem. Pharm. Bull.*, **1990**, *38*, 2112.

73. a) H.J. Hartmann, Y.J. Li, U. Weser, *Biometals*, **1992**, *5*, 187. b) A.K. Sewell, L.T. Jensen, J.C. Erickson, R.D. Palmiter, D.R. Winge, *Biochemistry*, **1995**, *34*, 4740.

propis d'una altra espècie. Es tracta d'aprofitar els mecanismes cel·lulars propis de síntesi de proteïnes per a obtenir quantitats elevades d'un producte que normalment no es sintetitzaria en aquestes cèl·lules.

Per tal de sintetitzar una MT recombinant s'ha d'introduir un ADN que contingui tota la informació per a la seva síntesi, o sigui, un gen de MT modificat amb un senyal de final de síntesi proteica després del codó que codifica per al seu darrer aminoàcid constitutiu, així com també els senyals de transcripció i traducció adequats i la informació genètica addicional que garanteixi que la molècula d'ADN que conté tots aquests elements es mantingui estable a dins la cèl·lula i es transmeti a les descendents. L'ADN que porta tota aquesta informació es denomina *vector* i la cèl·lula emprada per a la síntesi de la molècula heteròloga, *hoste*. Per a portar a terme aquestes síntesis *in vivo* s'ha de procedir a la construcció de l'ADN vector partint dels components individuals esmentats. Per això cal construir els fragments d'ADN i enllaçar-los en l'ordre adient. Aquesta construcció s'introduirà a dins de cèl·lules d'*E.coli* (transformació) i es seleccionaran aquelles que hagin incorporat el vector. Les cèl·lules transformades s'han de fer créixer en un medi de cultiu selectiu, que conté tots els nutrients necessaris i un antibiòtic el gen de resistència del qual s'ha introduït en el vector, i que ha permès fer la selecció dels transformats.

No totes les construccions són igualment bones per a assolir un nivell de síntesi elevat de proteïna recombinant. L'estabilitat de l'ARN missatger, l'eficàcia de la traducció, l'estabilitat de la proteïna recombinant en un ambient en què normalment no es troba i, finalment, la potencial toxicitat que genera dins d'*E.coli*, són tots ells factors limitants que s'han de minimitzar i/o optimitzar abans d'establir un cultiu a gran escala. Un cop s'han optimitzat les condicions del cultiu cal fer un seguiment per tal d'avaluar el creixement cel·lular i determinar-ne la seva durada. Finalment, per a obtenir les MT recombinants cal lisar les cèl·lules, lliurar totes les proteïnes solubles al medi extern i dissenyar una estratègia de purificació. Quan més elevat sigui el nivell de síntesi del producte exogen, més elevat serà el rendiment de la purificació.

La tècnica de l'ADN recombinant ja ha estat assajada satisfactòriament per a la producció de MT de llevat,⁷⁴ mamífer^{39b d f 75} i equinoderm.⁷⁶ A causa dels avantatges ara exposats, la tècnica de l'ADN recombinant ha estat escollida en els treballs que constitueixen aquesta Tesi Doctoral per tal d'obtenir les proteïnes desitjades.

-
- 74 a) M Beltramini, K Lerch, *Biochemistry*, **1983**, 22, 2043 b) U Weser, H J Hartmann, *Biochim Biophys Acta*, **1988**, 953, 1 c) Z Sayers, P Brouillon, C E Vorgias, H F Nolting, C Hermes, M H J Koch, *Eur J Biochem*, **1993**, 212, 521
- 75 a) P K Pan, F Hou, C W Cody, P C Huang, *Biochem Biophys Res Commun*, **1994**, 202, 621 b) C W Cody, P C Huang, *Biochem Biophys Res Commun*, **1994**, 202, 954
- 76 Y Wang, D Hess, P E Hunziker, J H R Kagl, *Eur J Biochem*, **1996**, 241, 835

1.4. Tècniques espectroscòpiques

Les tècniques espectroscòpiques d'absorció UV-Vis i de dicroisme circular (DC) han estat utilitzades molt sovint per tal de caracteritzar les propietats coordinants de les MT envers els metalls. Aquestes tècniques permeten distingir diferències entre estructures formades per diferents metalls, que comporten absorcions de diferent energia, i entre estructures formades per diferents relacions estequiomètriques metall:proteïna, ja que determinades relacions donen lloc a saturacions dels senyals.

A diferència d'altres proteïnes, la gran majoria de les MT no contenen aminoàcids aromàtics. Per això la seva forma apo és totalment incolora i transparent a longituds d'ona superiors a 215 nm,^{15c} i les úniques transicions que s'observen corresponen a transicions de la cadena peptídica, essent la més important la transició $n \rightarrow \pi^*$ a 213 nm corresponent al grup carbonil. Si bé els ions de metalls amb configuració electrònica d^{10} , com el Zn(II), Cd(II), Hg(II), Cu(I) o Ag(I), no presenten absorcions en la regió del visible, la seva coordinació a lligands tiolat produeix l'aparició de bandes de transferència de càrrega. D'aquestes transicions, les més intenses són les bandes de transferència de càrrega del lligand tiolat cisteínic al metall (TCLM), que apareixen entre 220 i 400 nm.^{16b, 77} Així doncs, les transicions electròniques observades a longituds d'ona superiors a 220 nm proporcionen informació exclusivament sobre la forma com estan units els metalls a la proteïna. Aquí radica precisament l'interès en l'estudi d'aquestes transicions.

D'altra banda, mentre que els espectres d'absorció UV-Vis permeten d'identificar clarament la presència de noves transicions quan s'addiciona metall a una apo-proteïna, l'escassa resolució de les bandes i la seva baixa intensitat sovint dificulten l'estimació de les estequiometries de les espècies formades durant la valoració. En canvi, l'espectroscòpia de DC no presenta aquest problema. Aquesta tècnica, adequada per a espècies cromòfores que presentin activitat òptica, és molt més sensible a petites variacions en l'entorn de coordinació dels metalls que la tècnica d'absorció UV-Vis i, en conseqüència, permet una anàlisi molt més detallada de les bandes que van apareixent durant les valoracions de MT o dels seus fragments amb els diversos metalls.

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

1.4.1. Espectroscòpia electrònica

Tal com s'ha dit en l'inici de l'apartat 1.4, a mesura que l'espècie apo-MT coordina metalls, apareixen noves transicions a longituds d'ona majors de 220 nm en forma d'espatlla poc resolta. L'assignació d'aquestes bandes a transicions de transferència de càrrega de lligand a metall (TCLM)^{16b,77} es féu en base a les observacions sobre complexos inorgànics efectuades per Jørgensen.⁷⁸

Aquest autor va desenvolupar una teoria en la qual es correlaciona empíricament el número d'ona d'una transició electrònica de lligand a metall amb la diferència d'electronegativitat òptica entre el lligand i el metall.⁷⁹ En concret, Jørgensen va comprovar que, per a una sèrie d'halurs diferents del mateix metall, l'energia de les transicions de transferència de càrrega era directament proporcional a la diferència d'electronegativitat entre els orbitals acceptor i donador. És justament l'electronegativitat d'un orbital el que Jørgensen va batejar com a “electronegativitat òptica” (χ_{opt}), i després d'assignar arbitràriament el valor de 3.9 a la χ_{opt} del F, va poder calcular les χ_{opt} de diferents lligands comparant diferents compostos contenint el mateix centre metàl·lic i, viceversa, comparant compostos de diferents metalls contenint el mateix lligand va poder calcular la χ_{opt} d'aquests metalls.

No obstant, cal dir que el terme χ_{opt} no és una propietat específica d'un element químic, sinó que, per exemple, en el cas dels metalls depèn del seu estat d'oxidació i de la seva geometria de coordinació. Per aquest motiu, i tenint presents les simplificacions que aquesta teoria comporta, les χ_{opt} de diferents metalls només són comparables en el cas de complexos anàlegs.

La fórmula senzilla que Jørgensen va proposar per a una banda de transferència de càrrega de lligand a metall (TCLM) fou:

$$\left(\frac{1}{\lambda}\right)_{TCLM} = 30000 \cdot (\chi_{opt}(L) - \chi_{opt}(M)) \text{ cm}^{-1}, \text{ on } \chi_{opt}(L) \text{ és la } \chi_{opt} \text{ de l'orbital}$$

donador del lligand i $\chi_{opt}(M)$ és la χ_{opt} de l'orbital acceptor del metall.

78. C.K. Jørgensen, *Prog. Inorg. Chem.*, **1970**, *12*, 101.

79. A.B.P. Lever, *Inorganic Electronic Spectroscopy (2nd ed.)*, Elsevier, **1984**, p. 218-223.

Així, per exemple, en el cas del Zn i el Cd, és conegut que, per a compostos anàlegs, la $\chi_{\text{opt}}(\text{Cd}) > \chi_{\text{opt}}(\text{Zn})$.⁷⁹ Per tant, l'energia de la transició de transferència de càrrega del lligand tiolat al metall en les MT serà menor en el cas de les MT de Cd(II) que en el de les MT de Zn(II). Aquesta deducció pot fer-se donat que ambdós metalls divalents presenten una geometria de coordinació tetraèdrica. No obstant, aquesta teoria no permet predir els canvis en absorció causats per variacions en els entorns de coordinació. És per aquest motiu que, per exemple, aquesta teoria no és útil en el cas de les MT de Cu(I), donat el fet que el Cu(I) pot presentar diversos entorns de coordinació davant dels lligands tiolat.

En general, les absorptions observables en les MT poden ser englobades en algun d'aquests quatre casos:^{15c}

- a) Bandes TCLM per al Zn(II), Cd(II) i Hg(II) en entorns de coordinació tetraèdrics.
- b) Bandes de transferència de càrrega del metall al lligand (TCML) en el cas de Cu(I), Ag(I), Au(I) i Hg(II) en entorns de coordinació no tetraèdrics.
- c) Transicions intrametàl·liques en metalls dels grups 11 i 12. Per exemple, transicions *d-s* o *d-p* en Cu(I) o Ag(I), les quals depenen de l'entorn de coordinació del metall.
- d) Bandes TCLM, TCML i *d-d* en el cas de metalls de configuració no d^{10} , com Co(II), Fe(II) o Pt(II).

L'espectroscòpia d'absorció UV-Vis, complementada amb d'altres tècniques, ha estat àmpliament utilitzada al llarg d'aquesta Tesi Doctoral per tal de determinar la naturalesa i estequiometria de les espècies formades. En el cas d'addicions successives de metall a una solució de proteïna és especialment convenient la representació dels increments d'absorbància produïts entre punts successius de la valoració (espectres de diferència), ja que aquests permeten una anàlisi més detallada dels canvis esdeinguts en la coordinació dels metalls. No obstant, i tal com ja s'ha explicat en l'apartat 1.4, la tècnica de DC ha estat fonamental per a estudiar els mecanismes de coordinació de metalls a MT i obtenir informació sobre el grau d'estructuració adquirida per la proteïna.

1.4.2. Espectroscòpia de dicroisme circular

L'espectroscòpia de dicroisme circular (DC) estudia la interacció de la llum polaritzada en un pla amb substàncies absorbents òpticament actives.⁸⁰ A causa de la naturalesa quiral de la substància a estudiar i donat que la llum polaritzada linealment és la suma de dos feixos de llum enantiomèrics polaritzats circularment, les interaccions d'aquests feixos amb la substància seran diastereotòpiques. Així doncs, tant els índexs de refracció dels dos feixos de llum polaritzats circularment en un sentit i en l'altre, n_e i n_d , com els respectius coeficients d'extinció molar, ϵ_e i ϵ_d , variaran en atravesar la mostra, de manera que la llum emergent estarà polaritzada el·lípticament i l'eix major d'aquesta el·lipse haurà girat α graus respecte l'angle d'incidència de la llum linealment polaritzada. Un espectre de dicroisme circular és la representació gràfica de la diferència entre els dos coeficients d'extinció molar, $\Delta\epsilon = |\epsilon_e - \epsilon_d|$ o eix menor de l'el·lipse que forma la radiació emergent, en funció de la longitud d'ona de la radiació incident.

En el món biològic la tècnica de DC ha estat emprada principalment per a determinar els diferents tipus d'estructura secundària de les proteïnes: hèlix α , làmina β o estructura desordenada, ja que els respectius espectres de DC són altament característics de cadascun d'aquests tipus d'ordenació de la cadena peptídica.

També s'ha aplicat la tècnica de DC per a l'estudi de complexos inorgànics. En aquest cas existeixen tres tipus possibles de transicions electròniques: les bandes $d-d$, les bandes de transferència de càrrega i les bandes degudes exclusivament al lligand. En els espectres de DC de complexos metàl·lics òpticament actius aquests tres tipus de transicions presenten efecte Cotton,^{15c} que es caracteritza per la formació, per a un enantiòmer determinat, d'una banda gaussiana en la mateixa posició i de la mateixa intensitat però de signe contrari que la que s'observa per a l'altre enantiòmer.

En el cas de les metal·loproteïnes, s'observa un increment de l'activitat òptica per a les transicions originades en els metalls quan es formen estructures tridimensionals metall-proteïna. Dit d'una altra manera, la incorporació de cromòfors a proteïnes amb una estructura terciària ben definida comporta una transferència de quiralitat des de la proteïna al cromòfor. Aquesta inducció de quiralitat es manifesta en els espectres de

80. E.L. Eliel, S.H. Wilen, *Stereochemistry of Organic Compounds*, John Wiley & Sons, New York, 1994, p. 992-1080.

DC, que són característics del tipus d'interacció cromòfor-proteïna. Més concretament, el senyal de DC dóna informació directa sobre l'entorn del cromòfor.

Les metal·lotioneïnes representen un cas especial d'augment de quiralitat. La presència de metalls coordinats provoca la formació d'una estructura tridimensional, la qual indueix quiralitat a les bandes *d-d* i/o a les bandes TCLM, que apareixen en una regió clarament diferenciada de la característica de l'enllaç peptídic.

En definitiva, les MT poden presentar dos tipus diferents de senyals de DC. El primer procedeix de la transferència de la quiralitat de la proteïna als agregats metall-tiolat i es manifesta per bandes en forma de gaussiana centrades al màxim d'absorció del cromòfor. El segon tipus de senyals, menys freqüents, es donen en el cas de formació d'agregats metàl·lics tridimensionals fortament estructurats. En aquests casos té lloc un increment considerable de la intensitat de les absorcions que condueixen als estats excitats. Aquest fenomen és conegut com a *exciton coupling*, i consisteix en l'acoblament dels moments dipolars elèctrics de transició entre dos o més cromòfors quirals idèntics connectats per enllaços σ , de manera que l'estat excitat global del sistema es desdobla en tants nivells energètics com cromòfors hi ha interaccionant. Les excitacions fins als dos o més nivells energètics desdoblats genera efectes Cotton de signe contrari separats per diferències d'energia $\Delta\lambda$, de manera que la banda de DC resultant és una banda en forma de derivada centrada aproximadament al màxim de la corresponent banda d'absorció en l'UV-Vis.

Les variacions en l'estructura tridimensional dels agregats metall-tiolat que es formen en les MT es manifesten clarament en els espectres de DC, donat que aquests són particularment sensibles a les transicions electròniques que s'originen en una estructura quiral. En canvi, aquestes variacions estructurals poden no representar cap modificació en els corresponents espectres d'absorció UV-Vis, que depenen exclusivament de la concentració de cromòfor.⁸¹ D'altra banda, com que les regles de selecció de les bandes de DC es basen en els operadors dels moments dipolars magnètic i elèctric, les intensitats de les bandes de DC poden ser bastant diferents de les intensitats de les bandes d'absorció UV-Vis associades.⁸⁰ Així doncs, és d'esperar que el

81. H. Willner, M. Vašák, J.H.R. Kägi, *Biochemistry*, 1987, 26, 6287.

signe i magnitud de cadascuna de les bandes de DC canviï a mesura que l'estructura tridimensional dels agregats metall-tiolat es modifiqui.

En les valoracions en què un metall amb elevada afinitat envers el sofre -per exemple Cu(I) o Cd(II)- s'afegeix a una Zn-MT, les variacions en la intensitat de les bandes de DC al llarg de la valoració poden indicar els següents fenòmens:

- a) L'estructura del centre actiu es manté anàloga a la present en l'espècie Zn-MT inicial si l'envolvent espectral manté la seva forma però es desplaça a una altra longitud d'ona.
- b) S'està formant una nova estructura a causa de la influència del metall que desplaça el Zn(II) si es desenvolupa, a una energia diferent, una envolvent espectral diferent de la de l'espècie inicial.

D'altra banda, si el senyal de DC col·lapsa -i.e., esdevé nul o molt petit- aquest fet molt probablement indica que el centre actiu s'ha obert i que la proteïna ha perdut l'estructura tridimensional de partida, tot i que existeix també la possibilitat que la proteïna estigui plegada però presenti diferents bandes de DC la resultant de les quals sigui nul·la o pràcticament nul·la.

En canvi, quan les intensitats de DC enlloc de variar es saturen a totes les longituds d'ona per a una determinada relació estequiomètrica metall:proteïna es pot suposar la formació d'una espècie estable amb aquesta estequiometria.

En resum, la tècnica de DC proporciona informació sobre el replegament de la cadena peptídica al voltant dels enllaços M-S i de la geometria de coordinació dels centres metàl·lics. És per aquest motiu que aquesta tècnica és especialment apropiada per als estudis de coordinació metàl·lica en MT i ha estat àmpliament utilitzada al llarg d'aquesta Tesi Doctoral.

1.5. Espectrometria de masses amb ionització per electrospai

L'espectrometria de masses amb ionització per electrospai, ESI-MS (Electrospray Ionization Mass Spectrometry), és un tipus d'espectrometria de masses que es basa en la volatilització a pressió atmosfèrica d'espècies iòniques existents en el si d'una solució. Així doncs, aquesta tècnica es basa en una ionització suau que, a l'actuar a pressió atmosfèrica i no en alt buit com és freqüent en les tècniques de masses convencionals, aconseguix un acusat major rendiment i sensibilitat.⁸² És per aquesta raó que la tècnica d'ESI-MS ha esdevingut dominant en els darrers anys en els estudis de molècules biològiques i, particularment, metal·loproteïnes.⁸³

La formació d'ions en fase gasosa a partir d'una solució iònica en un aparell d'ESI-MS s'aconsegueix a partir de l'aplicació d'una tensió elevada entre un capil·lar d'entrada i un contraelectrode,⁸² de manera que la mostra emergeix en forma de petites gotes amb una elevada càrrega elèctrica. Tot seguit, s'aplica un flux de gas nitrogen sec en una cambra a baixes pressions, de manera que té lloc la dessolvatació dels ions (fenomen d'evaporació iònica). Aquest sistema d'ionització aconseguix generar ions quasi-moleculars intactes, evitant el trencament d'enllaços de tipus covalent, fins i tot els més febles. Aquesta qualitat fa que la tècnica d'ESI-MS sigui ideal per a l'anàlisi de processos intermoleculars,⁸³ ja que només es trenquen les associacions no covalents. Per aquest mateix motiu és molt poc freqüent la formació d'adductes.

El principal avantatge d'aquesta tècnica rau en el fet que, en produir una gran abundància d'ions de càrrega múltiple, es poden determinar pesos moleculars de macromolècules (p.ex. proteïnes). A més, això és factible utilitzant un detector de masses quadrupolar convencional, ja que, com que es determina realment el valor de m/z (massa/càrrega), els ions de masses molt elevades apareixen en l'espectre a valors molt més baixos. Així, el rang de masses que abarca un aparell d'ESI-MS pot anar des de 500 D fins a 150-200 kD. D'altra banda, els aparells d'ESI-MS poden analitzar tant ions positius (mode ESI⁺) com negatius (mode ESI⁻), depenent del tipus de mostra.⁸² En

82. L. Esteban, *La Espectrometría de Masas en Imágenes*, ACK Editores, 1993, p. 175-185.

83. P.A. Brady, J.K.M. Sanders, *New J. Chem.*, 1998, 411.

el cas de l'estudi de MT, els pics moleculars que es generen són catiónics i de càrrega baixa.⁸⁴

L'espectre de masses que s'obté per ESI és totalment diferent del que s'aconsegueix mitjançant d'altres tècniques d'ionització, i consisteix en una sèrie de senyals discrets al llarg de tot el domini espectral, que corresponen, cadascun d'aquests, a una molècula intacta carregada amb diferent número de càrregues i amb un cert nombre de protons afegits. Així, per exemple, en el cas del mode ESI⁺, els ions que es formen són del tipus $(M+nH)^{n+}$, $(M+(n+1)H)^{n+1}$, etc, i apareixen en l'espectre a una massa aparent de $M_1 = (M+nH)/n$, $M_2 = (M+(n+1)H)/(n+1)$ respectivament, essent M el pes molecular (PM) real de l'espècie a determinar, H el pes atòmic (PA) del protó i M_1 i M_2 els PM aparents corresponents a dos pics consecutius de l'espectre. Resolent aquest sistema d'equacions es pot determinar el valor de la càrrega, que serà $n = [(M_1-H)/(M_1-M_2)]-1$. Com que els pics consecutius en una sèrie es diferencien per una sola càrrega, es pot identificar la càrrega n associada a cada pic, i per tant calcular el PM d'una espècie (M) en cadascun dels pics observats, que serà $M = n(m-H)$, on m és la massa aparent observada en el pic en qüestió i H el PA del protó. El PM d'una espècie es calcularà com el promig dels valors de pes trobats per a cadascun dels seus pics moleculars.

Si bé la tècnica d'ESI-MS ofereix molts avantatges, d'entre els quals cal destacar la capacitat d'estudiar espècies d'elevat pes molecular, la seva elevada sensibilitat (límits de detecció de l'ordre de 10^{-15} mols) i la poca quantitat de mostra requerida (de l'ordre de 1-20 μ l), també presenta alguns inconvenients. El principal problema que presenta aquesta tècnica és la seva baixa selectivitat. Dit d'una altra manera, qualsevol espècie iònica present en la mostra (p.ex. tampó) és susceptible de passar en fase gasosa i dificultar l'anàlisi dels pics corresponents a l'analít a estudiar. Aquesta contrarietat pot ser resolta acoblant a la tècnica d'ESI-MS una tècnica prèvia de separació, de manera que l'analít a estudiar no entri a l'espectromètre de masses acompanyat d'altres espècies iòniques que no siguin d'interès. L'acoblament dels cromatògrafs del tipus HPLC amb els aparells d'ESI-MS ha estat demostrat com a molt satisfactori per a l'estudi de

84. X. Yu, M. Wojciechowski, C. Fenselau, *Anal. Chem.*, 1993, 65, 1355.

diverses MT, i encara semblen més prometedors els primers acoblaments fets entre la tècnica d'electroforesi capil·lar (CZE) i l'ESI-MS.⁸⁵

La tècnica d'ESI-MS ha estat molt utilitzada al llarg d'aquesta Tesi Doctoral, ja que ha permès identificar i comprovar la puresa de les MT recombinants obtingudes així com determinar l'estequiometria de les espècies formades al llarg de les valoracions efectuades. No obstant, cal indicar que en el cas d'espècies mixtes Cu_xZn_y -MT la determinació exacta de llur estequiometria no ha estat possible per ESI-MS, donada la similitud dels pesos aparents corresponents als ions Cu^+ ($63.546 - 1 = 62.546$) i Zn^{+2} ($65.39 - 2 = 63.39$) i l'ordre de resolució inherent al detector de l'aparell d'ESI-MS utilitzat en aquest treball. En aquests casos només s'ha pogut determinar el nombre total d'ions metàl·lics presents en les MT, de manera que ha calgut la utilització de la tècnica d'espectroscòpia d'emissió atòmica de plasma acoblat per inducció (ICP-AES)⁸⁶ per tal de poder quantificar el contingut exacte de Cu i Zn presents en les proteïnes. Així doncs, la tècnica d'ESI-MS ha estat una tècnica complementària a les tècniques de DC, absorció UV-Vis i ICP-AES per tal d'estudiar les propietats coordinants de les metal·lotioneïnes estudiades.

85. R. Lobinski, H. Chassaigne, J. Szpunar, *Talanta*, **1998**, *46*, 271.

86. J. Bongers, C.D. Walton, D.E. Richardson, J.U. Bell, *Anal. Chem.*, **1988**, *60*, 2683.

1.6. Objectius de la Tesi Doctoral

L'objectiu principal d'aquesta Tesi Doctoral ha estat analitzar i comparar la influència del Zn(II) en els processos de plegament de les MT de ratolí, mosca i llamàntol en presència de Cu(I) *in vivo* i, a partir d'aquests resultats, proposar un nou criteri general per a classificar les MT.

Evidentment, donar resposta a l'objectiu assenyalat i poder establir conclusions concretes exigeix unes fites més específiques i unes tècniques experimentals determinades. Els diferents objectius que s'han fixat al llarg del treball així com les tècniques espectroscòpiques escollides per assolir-los es resumeixen a continuació.

1. Estudi del paper estructural del Zn(II) en el plegament de la MT de ratolí en presència de Cu(I) *in vivo*.

Aquest objectiu pot sorprendre si es té en compte l'abundant bibliografia existent sobre MT de coure, la qual inclou proteïnes procedents d'organismes diversos -des de fongs i llevats fins a mamífers- i es refereix majoritàriament a estudis *in vitro* però també *in vivo*. D'altra banda, una observació més atenta de la literatura posa en evidència una gran diversitat de resultats, de difícil sistematització, i l'aparició regular de Cu(I) i Zn(II) barrejats en les Cu-MT natives de mamífer. Cal notar que els mètodes més habituals seguits a la bibliografia per a la obtenció de les proteïnes Cu-MT esmentades, així com els seus fragments α i β , han estat bé la síntesi química en fase sòlida o bé el seu aïllament i purificació a partir d'òrgans d'éssers vius.

Aquestes dades porten a plantejar les següents qüestions:

* És possible establir sense ambigüitat l'estequiometria metall/proteïna en les espècies Cu-MT en el cas dels mamífers?

* És important, necessària o fins i tot imprescindible la presència de Zn(II) per a que les espècies Cu-MT tinguin l'estructura bidomínial característica de les MT de mamífer?

Donar resposta a aquestes preguntes constitueix l'eix central d'aquest objectiu, el qual s'ha abordat d'acord amb les fases següents:

1.1. Estudi de les propietats coordinants de Zn_3 - β MT, Zn_4 - α MT i Zn_7 -MT recombinants de ratolí i de les corresponents formes apo envers Cu(I) *in vitro*.

1.2. Expressió de la MT de ratolí sencera i dels seus fragments en medis rics en coure. Determinació de l'estequiometria de les espècies Cu_x -MT o Cu_xZn_y -MT obtingudes *in vivo*. Comparació del comportament observat *in vivo* amb l'obtingut *in vitro* i anàlisi estructural i funcional en base als resultats obtinguts amb els fragments aïllats.

2. Estudi del paper estructural del Zn(II) en el plegament de la MT de mosca (*Drosophila*) en presència de Cu(I) *in vivo*.

La diversitat d'organismes en què les MT són presents fa que sigui difícil extrapolar la funció del Zn(II) en l'estructuració *in vivo* de la Cu-MT d'una determinada espècie per a una altra espècie. D'altra banda, és plenament acceptat que les MT bidominals dels organismes superiors (MT de Classe I) provenen de la duplicació i posterior evolució de les MT monodominals dels organismes inferiors (MT de Classe II). Aquest fet, juntament amb l'escàs coneixement que es té actualment sobre les característiques estructurals i funcionals de les MT de Classe II, fa particularment interessant l'estudi d'aquestes proteïnes.

Així, es va decidir obrir camí en el coneixement de les característiques estructurals d'una MT d'insecte, MTN de *Drosophila melanogaster*, i a partir d'aquest estudi intentar contribuir en el coneixement existent avui en dia sobre l'origen dels dos dominis en les MT de Classe I.

Per tal d'abordar aquests objectius, s'ha procedit a les següents tasques:

2.1. Expressió de MTN en un medi ric en Zn(II) i caracterització de les propietats coordinants *in vitro* envers Cu(I) i Cd(II) de la proteïna obtinguda.

2.2. Expressió de MTN en un medi ric en coure. Determinació del possible paper estructural del Zn(II) en el plegament de Cu-MTN *in vivo* a partir de la comparació amb els resultats obtinguts *in vitro* en presència de Cu(I).

2.3. Comparació de seqüència i estructura entre MTN i d'altres MT, tant de Classe I com de Classe II, i determinació de relacions evolutives entre les MT analitzades.

3. Estudi del paper estructural del Zn(II) en el plegament de la MT de llamàntol (*Homarus americanus*) en presència de Cu(I) *in vivo*.

Si bé s'han descrit en la bibliografia alguns estudis d'aïllament de Cu-MT natives de crustaci, en cap cas no s'ha determinat la possible presència de Zn(II) en aquestes proteïnes. Paradoxalment, s'ha observat la presència de quantitats significatives de Zn(II) i/o Cu(I) en MT de crustaci obtingudes a partir de l'administració de Cd(II) a l'animal. No obstant, encara no s'ha analitzat de manera rigorosa l'origen ni la significació d'aquest fet.

D'altra banda, els estudis realitzats sobre les propietats coordinants de les MT de crustaci en presència de metalls divalents han posat de manifest que ambdós dominis són funcionalment comparables al domini β MT de mamífer. Per aquest motiu, és acceptat que les MT de crustaci representen el pas evolutiu comprès entre les MT monodominials i les MT bidominials tipus β - α o α - β , característiques de vertebrats i equinoderms, respectivament. Tot i així, aquest model evolutiu només està basat en comparacions de seqüència i en les estructures terciàries formades *in vitro* per diferents MT, menystenint les dades obtingudes *in vivo*.

Tots aquests fets indiquen que seria especialment interessant poder determinar el possible rol del Zn(II) en el plegament *in vivo* de les Cu-MT de crustaci i dels seus fragments per separat, i a partir d'aquests resultats poder proporcionar arguments que permetin classificar les MT d'una nova manera, amb uns criteris més apropiats a la funcionalitat *in vivo* de les MT.

Per tal d'abordar aquests objectius s'ha procedit a l'estudi de les propietats coordinants de la MT del llamàntol *Homarus americanus* (MTH) en base a les següents etapes:

3.1. Expressió de MTH i els seus fragments constitutius $\beta\beta$ i $\beta\alpha$ en medis rics en Zn(II), caracterització de les propietats coordinants *in vitro* envers Cu(I) i Cd(II)

de les proteïnes obtingudes i validació del sistema d'expressió heteròloga utilitzat.

3.2. Expressió de MTH i els seus fragments constitutius $\beta\beta$ i $\beta\alpha$ en medis rics en coure. Determinació del paper estructural del Zn(II) en el plegament *in vivo* de les proteïnes a partir de la comparació amb els resultats obtinguts *in vitro* en presència de Cu(I).

3.3. Anàlisi de seqüències i de propietats coordinants *in vivo* de MTH i d'altres MT potencialment properes en l'evolució i, a partir d'aquesta anàlisi, proposta d'un nou criteri per a classificar les MT.

Adicionalment, també caldrà tenir en compte l'efecte que provoca en les propietats coordinants dels fragments $\beta\beta$ i $\beta\alpha$ envers Zn(II), Cd(II) i Cu(I) la introducció o eliminació d'alguns residus de Cys.

Per tal d'assolir els objectius anteriors, s'ha procedit a la caracterització completa (DC, UV-Vis, ICP-AES, ESI-MS) de totes les espècies obtingudes *in vivo* i de totes les espècies formades *in vitro* en valorar les holo-proteïnes de Zn(II) amb d'altres metalls, com Cu(I) o Cd(II), els quals presenten una major afinitat envers els tiolats cisteïnics. Adicionalment, per tal de facilitar la interpretació dels resultats obtinguts *in vitro* en presència de Cu(I) a pH 7, també s'han caracteritzat les espècies formades en les valoracions a pH 3 de les corresponents formes apo amb Cu(I). D'altra banda, també s'ha utilitzat la tècnica d'espectroscòpia d'emissió per a caracteritzar les espècies Cu-MT obtingudes *in vitro* (vegeu Annex I).

Els resultats obtinguts en cadascuna d'aquestes etapes es recullen en els diferents articles presentats. Concretament, dins del primer objectiu s'inclourien els tres primers treballs. En el primer, "A new insight into the Ag^+ and Cu^+ binding sites in the metallothionein β domain", *J. Inorg. Biochem.*, **1999**, *73*, 57-64, es descriuen les propietats coordinants *in vitro* del fragment β MT recombinant de ratolí en presència de Cu(I). En el segon, "*In vivo* copper- and cadmium-binding ability of mammalian metallothionein β domain", *Prot. Engng.*, **1999**, *12*, 265-269, se n'analitzen les propietats coordinants *in vivo* envers Cu(I) i es comparen amb els resultats obtinguts prèviament *in vitro*. En el tercer, "Zn(II) is required for the *in vivo* and *in vitro* folding

of mouse Cu-metallothionein in two domains”, *J. Biol. Inorg. Chem.*, **2001**, 000, s’estudien les propietats coordinants *in vivo* i *in vitro* de la MT recombinant de ratolí i el seu fragment α envers Cu(I) i, incorporant els resultats obtinguts en els articles anteriors, es dedueix el paper del Zn(II) en el plegament de la proteïna sencera en presència de Cu(I).

Pel que fa als resultats sobre les propietats coordinants de MTN recombinant de *Drosophila* i la relació de MTN amb l’origen de les MT bidominals, plantejats en el segon objectiu, aquests són descrits en el quart article, “*Drosophila* MTN: a metazoan copper-thionein related to fungal forms”, *FEBS Let.*, **2000**, 467, 189-194.

Finalment, els resultats del darrer objectiu de la Tesi es descriuen parcialment en l’últim article presentat, "A New Insight into MT Classification and Evolution. The *in vivo* and *in vitro* metal binding features of *Homarus americanus* recombinant MT", *J. Biol. Chem.*, enviat, on es descriu l’expressió de MTH de llamàntol, els seus fragments i formes mutades d’aquests, se n’estudien llurs propietats coordinants en presència de Zn(II) i Cu(I) *in vivo* i Cd(II) *in vitro* i es proposa un sistema complementari de classificació de les MT.

Així mateix, la resta de resultats obtinguts en aquesta darrera fase del treball, corresponents a les propietats coordinants *in vitro* de les proteïnes recombinants silvestres de crustaci enfront de Cu(I), s’inclouen en la secció de Discussió dels Resultats i són en aquests moments objecte de redacció d’un sisè article.

Com a un estudi adicional, cal afegir també els diferents intents de determinació del grau d’oxidació de les MT recombinants de crustaci expressades en un medi ric en Cu mitjançant mètodes voltamperomètrics (vegeu Annex II).

En definitiva, el conjunt de tots els resultats obtinguts en aquesta Tesi Doctoral s’inclou en un únic objectiu: el de proposar un nou criteri general per a classificar les MT.

Per tal d’assolir tots aquests propòsits ha calgut des del primer moment una col·laboració estreta entre el grup de recerca dirigit per la Dra. Pilar Gonzàlez, del Departament de Química de la Universitat Autònoma de Barcelona, i el grup dirigit inicialment per la Dra. Roser Gonzàlez i actualment per la Dra. Sílvia Atrian, del

Departament de Genètica de la Universitat de Barcelona, el qual ha estat responsable de la síntesi de totes les proteïnes estudiades al llarg d'aquest treball. Aquestes síntesis han estat realitzades a través de la tècnica de l'ADN recombinant, que ha permès d'obtenir quantitats elevades de totes les MT desitjades amb un grau de puresa considerablement superior a l'obtingut per mètodes convencionals (síntesi en fase sòlida o aïllament i purificació a partir d'organismes vius). En el nostre cas podem assegurar que més del 95% de les molècules proteiques presents en solució estan constituïdes exactament per una seqüència primària idèntica a la de la MT nativa.

Així mateix, la diversitat de tècniques utilitzades en aquest treball ha requerit la col·laboració de diversos especialistes, els quals han aportat els seus coneixements i experiència als temes aquí tractats, tot augmentant la validesa dels resultats obtinguts i permetent aprofundir en les possibles conclusions. Així, s'ha col·laborat amb els equips dirigits pel Dr. Ryszard Lobinski, del Laboratoire de Chimie Bio-inorganique et Environment, CNRS, Pau, i el Dr. Joaquín Abián, de l'Institut d'Investigacions Biomèdiques de Barcelona, CSIC, experts en espectrometria de masses amb ionització per electrosprai aplicada a proteïnes; amb el del Dr. Milan Vašák, del Biochemisches Institut der Universität Zürich, i el Dr. Santiago Nonell, del Departament de Química Física de l'Institut Químic de Sarrià, experts en la utilització de la tècnica d'espectroscòpia d'emissió en estudis estructurals de proteïnes (vegeu Annex I), i el del Dr. Miquel Esteban, del Departament de Química Analítica de la Universitat de Barcelona, expert en l'aplicació de tècniques voltamperomètriques per a la detecció i determinació de MT (Annex II). Tots ells són mereixedors d'un important reconeixement.

