

**Propietats coordinants i estructurals de la  
proteïna CuMT-II del cranc *Callinectes  
sapidus*: Una metal·lotioneïna amb triplets  
de cisteïna**

Tesi Doctoral

Montserrat Serra Batiste

Juliol 2008

Dirigida per Pilar González Duarte i Neus Cols Coll

Departament de Química

Facultat de Ciències



Universitat Autònoma de Barcelona

Pilar González Duarte, Catedràtica d'Universitat del Departament de Química de la Universitat Autònoma de Barcelona, i Neus Cols Coll, Professora Agregada del Departament de Genètica de la Universitat de Barcelona,

CERTIFIQUEM:

que na Montserrat Serra Batiste, llicenciada en Química, ha realitzat sota la nostra direcció, al Departament de Química de la Universitat Autònoma de Barcelona, el treball que té per títol: **Propietats coordinants i estructurals de la proteïna CuMT-II del cranc *Callinectes sapidus*: Una metal·lotioneïna amb triplets de cisteïna**, que es presenta en aquesta memòria per optar al grau de Doctora en Química.

I perquè consti a efectes legals, signem aquest certificat a Bellaterra, el 23 de juny del 2008.

Pilar González Duarte

Neus Cols Coll

## Agraïments

Aquesta tesi no hauria estat possible sense el suport, col·laboració i consells, tant a nivell científic com a nivell personal, d'un gran nombre de gent. Per aquest motiu vull transmetre, amb aquest full, el meu agraïment a totes aquestes persones per la seva participació i implicació en aquest treball.

Agraïco en primer lloc a les meves directores de tesi. A la Dra. Pilar González per l'oportunitat que m'ha brindat d'aproximar-me al món de la recerca, en una línia que m'ha atret moltíssim i que ha despertat en mi un gran interès per la bioinorgànica i la bioquímica. Li agraeixo la seva proximitat i sinceritat en tot moment, la dedicació i esforços esmerçats. Donar també el meu agraïment a la Dra. Neus Cols per la gran contribució a l'hora d'ampliar els meus escassos coneixements de biologia i per les seves bones idees. Gràcies a totes dues per haver-me permès iniciar-me com a investigadora, pel suport i pel vostre temps.

La interdisciplinarietat d'aquesta tesi ha requerit una col·laboració intensa amb experts de diferents àrees, els quals es mereixen una especial menció en aquest apartat. A l'Antonio Donaire, expert de RMN de metal·loproteïnes, pel seu interès, suport constant i magnífic treball per intentar resoldre l'estructura de la proteïna. A en Juan Hidalgo, director del grup de fisiologia animal que ha liderat els estudis funcionals dels dominis de la MT de mamífer, i la Yasmina Manso que ha estat la principal responsable en l'execució d'aquests experiments. A en Milan Vašák, director del grup de Zürich on vaig realitzar una breu estada per aprendre la metodologia de la reconstitució, i a l'Andrei Karotki per la seva dedicació i atenció durant l'estada. Al Xavier Gomis i la gent del seu grup, especialment a la Tibisay i a la Cynthia pels esforços per aconseguir cristalls de la nostra MT.

A tots aquells que m'han fet un lloc en el seu laboratori, on sempre ha estat un plaer treballar. A la gent de microbiologia, especialment al grup d'en Jordi Barbé, al Gerard pel seu entusiasme i dedicació totalment desinteressada, a la Noèlia, en Marc i la Mònica. Al grup del Juan Hidalgo, de fisiologia animal, a la Yasmina per l'entrega i l'amistat, a la Gemma, el Javier, la Mercè, l'Albert, el Sergi, la Lorena i la gent dels laboratoris veïns. A la gent del laboratori de la Neus, a en Jon, la Neus petita, la Irene i la Laura. Al grup de Zürich, al seu director Milan Vašák, a en Gabriele, l'Oliver, en Thomas i molt especialment a l'Andrei. A en Jordi Coello i el Jose "el vasco" d'Analítica.

El món de les metal·lotioneïnes, gairebé desconegut per a mi abans d'entrar en aquest grup de recerca, s'ha fet ràpidament més pròxim gràcies a les meves directores i a tots aquells que hi havien treballat i que m'han transmès tota la seva experiència. La Núria que, com a pionera de les MTs i gran coneixedora del tema, m'ha ajudat en alguns dels punts delicats. La Mini, que m'instruí des d'un principi, compartint amb mi llargues hores en el dicromisme i tants altres moments, aconsellant-me i polint-me per ser una bona investigadora. L'Óscar, que sempre s'ha mostrat infinitament pacient i ha gaudit de compartir les inquietuds del perquè de tot plegat. La Laura, que mantingué l'ordre en aquest vaixell, quedant-se com a veterana en moments difícils, mantenint el seu humor característic i la seva transparència. El Roger, que aparegué més tard, però que ja hi era present des de sempre, amb la seva tesina i la seva tesi. El Rubén, que s'ha iniciat en aquest món uns anys després, i m'ha permès creure que sóc una entesa en el tema, gràcies per ser tant brillant i tant humil a la vegada. I finalment, les noves incorporacions "MTeres", l'Ester i la Sílvia, amb les que gairebé no he tingut temps per interaccionar, però que s'han fet un lloc en aquest laboratori i que, ben segur, seran unes dignes successores. També pertanyents al món de les MTs, vull agrair a la Dra. Mercè Capdevila, per les consultes que molt amablement atengué i, a en Jordi Domènech per fer-me sentir acompanyada en aquest món de multidisciplinarietat...

Agraïco a la resta de gent del meu grup per haver compartit amb mi els bons i mals moments. Al Rubén per la seva felicitat contagiosa. Al Fernando per la seva temperància i paciència, a la Cris per l'alegria, constant recolzament i amistat i també a l'Ainara, que sempre

ha anat uns passos davant meu, per ensenyar-me el camí i evitar que em perdés..., per les crítiques constructives, per l'amistat i per tot...

A la Dolors i a l'Isidre pel seu treball. Al personal de la Planta Pilot de Fermentació. Al Servei d'Anàlisi Química, en J. M. Paulís, l'Ignasi i l'Alba. Als Serveis Científic-Tècnics de la UB, a l'Isidre Casals, l'Olga i la Marta, per la seva ajuda amb els equips de masses i a l'Elionor Pelfort i en Paco Menéndez, pel seu suport amb l'ICP. A la Sílvia Bronsoms i la Montse Morell del Servei de Proteòmica i Bioinformàtica per les in comptables purificacions a l'Äkta, consells i recolzament.

També es mereixen una especial menció tots els meus companys d'Inorgànica, heu estat molts i molt importants, moltes gràcies a tots! Gràcies a la Mònica per les rialles i la complicitat, a la Bet i al Tony per les caminades a Cerdanyola i l'amistat, a en Jordi, a en Ponsico, la Meri, el Dani, l'Oriol, el Nacho, l'Artur, la Yoselin, el Mateu, la Laia, en Joan, el Sergi, la Gemma, el Miguel, l'Àlex, en David, l'Abel, la Vane i els que em deixo, pels dinars, festes, cafès i la companyia.

A nivell ja més personal, vull agrair a tots els amics i companys de pis que han ajudat a que aquests anys fossin els millors de la meua vida. A l'Anna, la Núria, l'Èlia, la Marta, la Montserrat, el David, en Fran, el Cosmin, el Jose, la Sandra, el Xavi, el Marc, el Sergi, el Max, el Salva, la Raquel, l'Aleix, l'Eli, l'Ester, el Sergi, la Mònica, la Indira, l'Anna, el Juan, la Marta, l'Ivan, els Alberts... Sou els millors!

Finalment, i no menys importants, a tota la meua família, per ser-hi sempre, per ajudar-me a canviar el xip, per necessitar-me, per estimar-me.

# ÍNDEX

<b>I. Introducció</b>	3
I.1. Característiques generals de les metal·lotioneïnes	3
I.2. Estructura i funció	9
I.3. Preferències metàl·liques	17
I.4. Les cisteïnes en les metal·lotioneïnes: Triplets Cys-Cys-Cys	19
I.5. Metal·lotioneïnes de crustaci: Isoformes del cranc <i>Callinectes sapidus</i>	23
<b>II. Objectius</b>	31
<b>III. Mètodes</b>	35
III.1. Tècniques d'enginyeria genètica	35
III.1.1. Terminologia i procediments generals	35
III.1.2. Protocols	45
III.2. Tècniques de caracterització dels agregats metall-MT	52
III.3. Obtenció d'apoMT i reconstitució	60
III.4. Caracterització estructural	62
III.5. Estudis funcionals dels dominis de MT-1 de mamífer	67
<b>IV. Síntesi de les formes metal·lades de MTC mitjançant tècniques d'enginyeria genètica</b>	77
IV.1. L'enginyeria genètica en la síntesi de metal·lotioneïnes	77
IV.2. Preparació del sistema d'expressió de MTC	80
IV.2.1. Clonació del cDNA de MTC en un vector d'expressió	80
IV.2.2. Cultius a petita escala d' <i>E. coli</i> amb el clon pGEX-MTC	84
IV.3. Obtenció de MTC en medis enriquits amb zinc	87
IV.3.1. Expressió i purificació de MTC obtinguda en medis rics en zinc	88
IV.3.2. Caracterització de ZnMTC	89

IV.4. Obtenció de MTC en medis enriquits amb coure	96
IV.4.1. Expressió i purificació de MTC en presència de coure	96
IV.4.2. Caracterització de les espècies obtingudes en medis rics en coure	96
IV.4.3. Caracterització de les espècies obtingudes en medis rics en coure i zinc	100
IV.4.4. Paper del zinc en la MTC quan s'expressa en medis rics en coure	103
<b>V. Obtenció de les formes holoMTC per reconstitució d'apoMTC amb diferents metalls</b>	107
V.1. Avantatges i requisits de la metodologia de la reconstitució	107
V.2. Preparació i caracterització d'apoMTC	109
V.3. Reconstitució d'apoMTC amb Cu(I)	112
V.4. Reconstitució d'apoMTC amb Zn(II): dinàmica de les posicions de coordinació	114
V.5. Reconstitució d'apoMTC amb Cd(II): dinàmica de les posicions de coordinació	117
V.6. Determinació del nombre de cisteïnes lliures en Zn <sub>6</sub> MTC i Cd <sub>7</sub> MTC, obtingudes per reconstitució	123
<b>VI. Caracterització de les espècies metal·lades que forma MTC amb Cd(II) i Cu(I) mitjançant valoracions <i>in vitro</i></b>	127
VI.1. Valoració d'apoMTC amb cadmi	131
VI.2. Valoració de ZnMTC amb cadmi	137
VI.3. Valoració d'apoMTC amb coure	141
VI.4. Valoració de ZnMTC amb coure	145
<b>VII. Caracterització estructural de <sup>113</sup>CdMTC</b>	153
VII.1. Precedents	153
VII.2. Obtenció de les mostres de <sup>113</sup> CdMTC i <sup>113</sup> CdP10	154
VII.3. Anàlisi per RMN de les mostres de <sup>113</sup> CdMTC i <sup>113</sup> CdP10	155
VII.4. Discussió	163

<b>VIII. Paper dels dominis de la MT de mamífer en la resposta inflamatòria</b>	167
VIII.1. Introducció i objectius	167
VIII.2. Resultats	170
VIII.3. Discussió	179
<b>IX. Discussió</b>	183
<b>X. Conclusions</b>	195
<b>XI. Bibliografia</b>	201





# **Introducció**



# I. Introducció

## I.1. Característiques generals de les metal·lotioneïnes

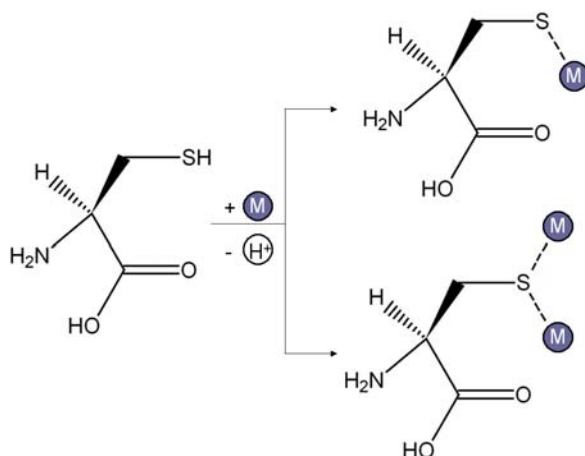
Les metal·lotioneïnes, MTs, són unes proteïnes amb unes propietats excepcionals, que destaquen principalment per la seva gran capacitat per coordinar metalls. Van ser descobertes l'any 1957 per Margoshes i Vallee en còrtex renal de cavall, enllaçades a zinc i a cadmi.<sup>1</sup> Fins a l'actualitat se n'han descrit 259, segons la base de dades Swiss-Prot.<sup>2</sup>

L'estudi d'aquestes proteïnes ha permès establir quines són les característiques que les defineixen, les quals es mostren en els següents punts:<sup>3-5</sup>

- ✓ Baix pes molecular (2 – 12 kDa).
- ✓ Elevat contingut en cisteïnes (~30 % dels residus), aminoàcids responsables, de forma gairebé absoluta, de la coordinació dels metalls.
- ✓ Gran capacitat d'enllaçar ions metàl·lics, preferentment amb configuració  $d^{10}$ .
- ✓ Baix contingut en residus hidrofòbics.
- ✓ Absència, en general, d'aminoàcids aromàtics.
- ✓ Motius cisteïnics característics: Cys-Cys i Cys-X-Cys (essent X un aminoàcid diferent a la cisteïna).

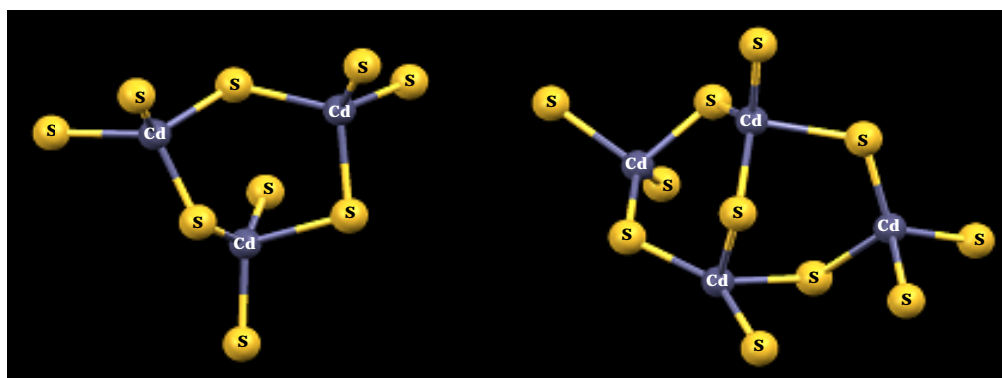
Les metal·lotioneïnes es troben en gairebé tots els éssers vius, tant en el regne animal com en fongs, plantes i cianobacteris. S'han aïllat coordinant metalls essencials (zinc i coure) i metalls tòxics (cadmi i mercuri), mitjançant tiolats cisteïnics.<sup>6</sup>

Les propietats de les cisteïnes tenen un paper clau a l'hora de definir les característiques que fan tan especials les MTs, ja que, com es comentava abans, són les principals responsables de la coordinació dels metalls i representen gairebé una tercera part de la seva seqüència aminoacídica. La cisteïna, juntament amb la histidina, el glutàmic, l'aspàrtic i la tirosina, és un dels aminoàcids amb major capacitat per actuar com a lligand gràcies al grup tiol que presenta en la seva cadena lateral (Figura I.1). Segons la teoria de Pearson de les bases i àcids durs i tous, el tiolat cisteïníc (base tova) tendirà a coordinar-se a àcids com el  $\text{Cu}^+$ , el  $\text{Cd}^{2+}$  (àcids tous) i el  $\text{Zn}^{2+}$  (àcid intermedi). La capacitat de les cisteïnes d'actuar tant de lligand terminal com de lligand pontal (Figura I.1) permet la formació d'agregats metàl·lics com els que s'observen en la Figura I.2. Els agregats més habituals que formen les MTs quan estan coordinades a ions divalents són:  $\text{M}^{\text{II}}_3(\text{SCys})_9$  i  $\text{M}^{\text{II}}_4(\text{SCys})_{11}$ , on tots els ions  $\text{M}^{\text{II}}$  tenen un entorn

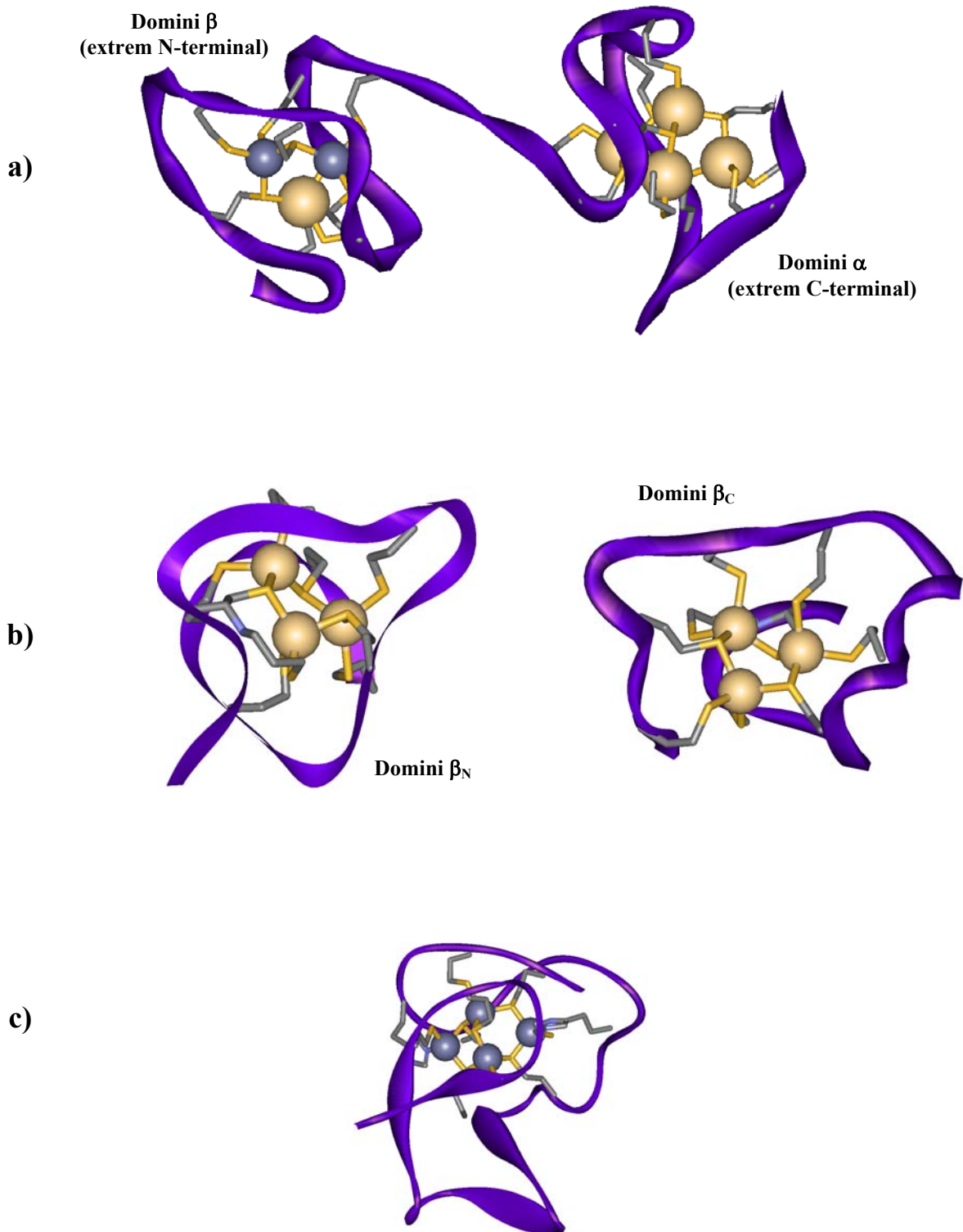


**Figura I.1.-** Complexació de l'aminoàcid cisteïna amb un o dos ions metàl·lics (M) actuant com a lligand terminal o pontal.

tetraèdric  $\{M(SCys)_4\}$ . Cal destacar que en gairebé totes les  $M^{II}$ MTs descrites fins al moment es manté una distribució metàl·lica regida per agregats amb aquestes estequiometries, malgrat que les estructures primàries difereixin significativament. S'han proposat, en casos puntuals, altres distribucions dels ions divalents, especialment en MTs de plantes.<sup>4, 7</sup> Sorprenentment, en química de coordinació, no s'han descrits tiolats metàl·lics amb fórmula  $[M^{II}_3(SR)_9]^{3-}$  i  $[M^{II}_4(SR)_{11}]^{3-}$  ni en fase sòlida ni en solució,<sup>4</sup> el que indica la importància de la cadena peptídica en l'estabilització dels agregats  $M^{II}_3(SCys)_9$  i  $M^{II}_4(SCys)_{11}$ . En la Figura I.3 es mostra l'estructura de dues metal·lotioneïnes enllaçades a ions divalents, on es pot observar la distribució dels metalls segons els agregats abans esmentats (a i b), i una tercera estructura (c) on es manté l'estequiometria  $M^{II}_4L_{11}$ , però en lloc de tenir 11 cisteïnes coordinant el metall, la proteïna SmtA forma l'agregat metàl·lic mitjançant 9 cisteïnes i 2 histidines.



**Figura I.2.-** Agregats  $Cd_x(SCys)_y$  que configuren els dominis  $\alpha$  i  $\beta$  de les MTs de mamífer. A l'esquerra es mostra l'agregat  $Cd_3(SCys)_9$ , del domini  $\beta$  i a la dreta l'agregat  $Cd_4(SCys)_{11}$  del domini  $\alpha$ .

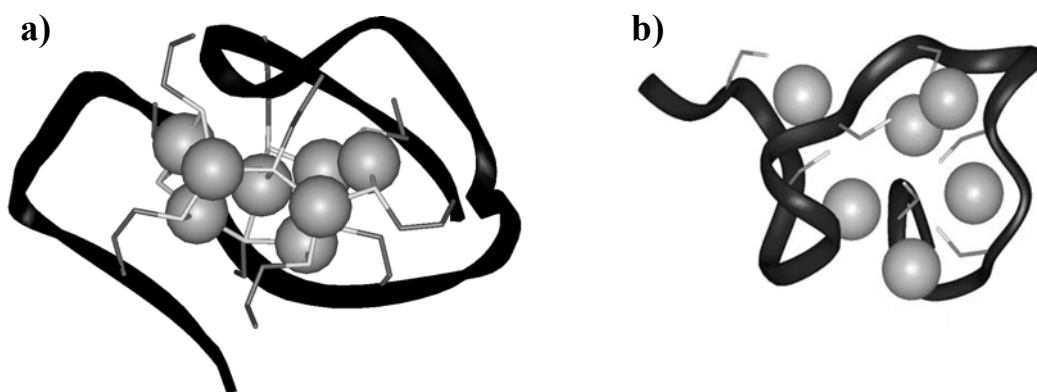


**Figura I.3.-** Estructura tridimensional de diverses MTs enllaçades a ions divalents: a)  $Zn_2Cd_5$ MT-2 de mamífer (metal·lotioneïna II de rata, resolta per difracció de raigs X), dividida en un domini  $\alpha$  i un domini  $\beta$ ,<sup>8</sup> b)  $Cd_6$ MT1 de crustaci (MT1 de *Callinectes sapidus*, resolta per RMN), dividida en dos dominis ( $\beta_N$  i  $\beta_C$ ),<sup>9</sup> c)  $Zn_4$ SmtA de cianobacteri (MT de *Synechococcus* PCC7942, resolta per RMN), amb un únic domini.<sup>10</sup> Les esferes blaves representen els ions  $Zn(II)$  i les esferes grogues indiquen els ions  $Cd(II)$ .

## INTRODUCCIÓ

La informació estructural dels agregats que formen les MTs amb Cu(I) és molt escassa, essent la manca de resposta d'aquest ió metàl·lic en RMN una de les principals limitacions. En les CuMTs de mamífer existeix una gran controvèrsia a l'hora d'assignar les estequiometries metall-proteïna predominants. Alguns autors suggereixen que les isoformes<sup>†</sup> MT-1 i MT-2 totalment metal·lades amb coure contenen 12 ions Cu(I) distribuïts en dos agregats metall-tiolat.<sup>11</sup> En canvi, altres autors afirmen que MT-1 requereix del zinc perquè aquesta proteïna adopti un plegament en dos dominis.<sup>12</sup>

En organismes inferiors s'ha aconseguit resultats molt satisfactoris en la determinació estructural de dues CuMTs, essent Cu<sub>8</sub>MT de *Saccharomyces cerevisiae* la més estudiada. La recent resolució de l'estructura per difracció de raigs X d'aquesta proteïna ha permès descriure l'agregat Cu<sub>8</sub>(SCys)<sub>10</sub>, on 6 ions Cu(I) presenten una coordinació plano-trigonal i els dos restants digonal, Figura I.4.a.<sup>13</sup>



**Figura I.4.-** Estructura tridimensional de a) Cu<sub>8</sub>MT de *Saccharomyces cerevisiae*, obtinguda per difracció de raigs X<sup>13</sup> i b) Cu<sub>6</sub>MT de *Neurospora crassa*, obtinguda per RMN. En aquest segon cas, la posició dels ions Cu ha estat calculada teòricament mitjançant un model que minimitza les energies.<sup>14</sup>

Un altre tret diferencial de les cisteïnes és la seva capacitat per oxidar-se formant ponts disulfur entre elles. Aquesta és la interacció covalent més important involucrada en l'estructura tridimensional de moltes proteïnes. Els ponts disulfur poden contribuir en les propietats d'una proteïna de diferents maneres, ja sigui estabilitzant la conformació biològicament activa,<sup>15</sup> actuant com a nexa d'unió entre els diversos monòmers d'una proteïna polimèrica<sup>16</sup> o conferint-li propietats redox.<sup>17</sup> En general, en les metal·lotioneïnes totes les cisteïnes estan en forma reduïda i participen en la coordinació dels ions metàl·lics, la qual cosa les fa menys sensibles a l'oxidació a

<sup>†</sup> En aquest text s'empra el mot isoforma per descriure les diferents MTs d'un mateix organisme.

disulfur. En base l'elevat contingut en grups tiolat,  $RS^-$ , s'han atribuït propietats redox a algunes MTs, en les quals el procés d'oxidació és assistit per molècules que contenen ponts disulfur (com el glutatió oxidat, GSSG) i va acompanyat de l'alliberament d'ions metàl·lics.<sup>18-20</sup> També s'ha descrit en algun cas la presència de cisteïnes que no participen en la coordinació metàl·lica i romanen com a tiols lliures en l'estructura caracteritzada,<sup>13</sup> o en els complexos proposats.<sup>21,22</sup>

Malgrat la presència de metal·lotioneïnes en gairebé tots els éssers vius i la inusual capacitat coordinant que presenten aquestes proteïnes, propietats que semblen suggerir un important paper fisiològic, encara, avui en dia, és motiu de debat l'assignació específica de les funcions que desenvolupen.<sup>23, 24</sup> Un procediment àmpliament utilitzat per determinar les funcions d'una proteïna és l'estudi dels efectes causats per la modificació genètica d'organismes i línees cel·lulars, dirigida a aconseguir una sobreexpressió o una deficiència d'aquesta proteïna. En el cas de les MTs, aquest procediment no ha permès detectar anomalies importants durant el creixement i el desenvolupament en condicions fisiològiques, com a conseqüència de la manca o sobreexpressió de la proteïna,<sup>25</sup> dificultant així la tasca de determinar el paper de les metal·lotioneïnes.

Aquest buit en el coneixement funcional de les MTs ha dificultat la classificació d'aquestes proteïnes, fent que sorgissin diferents propostes basades en la seqüència aminoacídica, en les característiques estructurals i en les preferències coordinants, en lloc d'establir les diferents classes de MTs en funció del seu paper biològic, com és habitual en la resta de proteïnes.

La primera classificació, que data del 1985, inclou 3 grans grups de MTs, establerts segons la seva estructura primària.<sup>26</sup>

**Classe I:** MTs d'uns 60 aminoàcids, dels quals aproximadament una tercera part són Cys. Aquest tipus de MTs es troba en la majoria de vertebrats i en alguns invertebrats. S'engloben en aquest grup totes aquelles MTs que presenten una estructura primària pròxima a la de les MTs de mamífer.

**Classe II:** MTs amb una estructura primària llunyana a la de les MTs de mamífer. Aquest grup presenta una gran heterogeneïtat de seqüències i inclou MTs de planta, fong, invertebrat i algun bacteri. La majoria estan constituïdes per un únic domini.

**Classe III:** cadistines, fitoquelatines i altres polipèptids de fórmula general  $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{Gly}$ , de síntesi enzimàtica, que es troben principalment en vegetals i organismes unicel·lulars.

El creixent coneixement de noves seqüències de MT ha fet insuficient i inadequada aquesta classificació, induint-ne l'aparició d'altres. Una d'aquestes, molt més detallada, divideix les MTs en famílies, subfamílies, subgrups, isoformes i subisoformes, en funció de les relacions filogenètiques i les semblances seqüencials,<sup>27</sup> (<http://www.bioc.uzh.ch/mtpage/classif.html>).

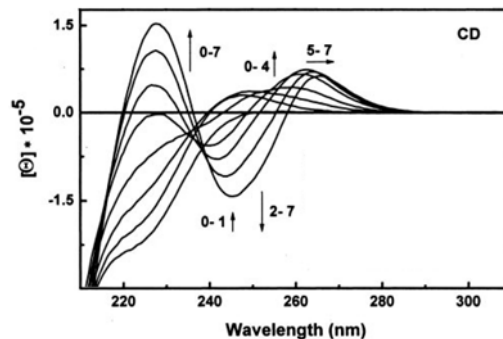
Més recentment s'ha proposat una tercera classificació que avança un cert paper diferencial de cada metal·lotioneïna en funció de les seves preferències metàl·liques. Aquesta classificació divideix les MTs en zinc-tioneïnes i coure-tioneïnes tenint en compte el seu comportament front a aquests metalls essencials quan s'obté la proteïna recombinant en un medi enriquit amb zinc o amb coure.<sup>28</sup> Les propietats que donen suport a la classificació d'una MT com a zinc-tioneïna són: una gran estabilitat i elevat grau d'estructuració de la forma totalment metal·lada amb zinc i, la formació de complexos heterometàl·lics Cu,ZnMT quan s'obté la proteïna per enginyeria genètica, en medis suplementats amb coure.<sup>28</sup> En canvi, a l'hora de classificar una MT com a coure-tioneïna es té en compte propietats com: una baixa quiralitat de la forma totalment metal·lada amb zinc, i l'obtenció de complexos homometàl·lics CuMT quan es sintetitza la proteïna en *E. coli* (bacteris emprats per obtenir la proteïna recombinant) en medis enriquits amb coure.<sup>29</sup>



## I.2. Estructura i funció

### *Estructura de les MTs*

Es ben conegut que les metal·lotioneïnes en la seva forma demetal·lada, també coneguda com a apotioneïna (apoMT), mostren una estructura bàsicament desordenada.<sup>30</sup> En canvi, aquestes proteïnes adopten un plegament ben definit quan es coordinen a ions metàl·lics, tal i com es mostra en la Figura I.5, on es representa l'evolució de l'estructura de la proteïna MT-4 de mamífer, analitzada per dicròisme circular, a mesura que es van addicionant ions Cd(II) a la forma demetal·lada apoMT-4.<sup>31</sup>



**Figura I.5.-** Espectres de CD de la valoració d'apoMT-4 amb ions Cd(II),<sup>31</sup> on s'observa l'adquisició d'una estructura tridimensional definida, com a conseqüència de la coordinació al cadmi.

La primera estructura tridimensional resolta d'una MT fou la de la MT-2 de mamífer, mitjançant estudis tant de RMN de  $^{113}\text{Cd}$  i  $^1\text{H}$ , a partir d'una mostra de  $^{113}\text{Cd}_7\text{MT-2}$ ,<sup>32</sup> com de difracció de raigs X, de l'espècie  $\text{Zn}_2\text{Cd}_5\text{MT-2}$ ,<sup>8</sup> en els anys 1990 i 1991, respectivament. D'aleshores ençà només s'ha pogut resoldre l'estructura parcial o total de les MTs descrites en la Taula I.1, fet que posa de manifest la dificultat que comporta l'estudi estructural d'aquestes metal·loproteïnes.

Totes les estructures resoltes de MT amb metalls divalents ( $\text{Zn}^{2+}$  i  $\text{Cd}^{2+}$ ), exceptuant la SmtA de cianobacteri, consisteixen en dos dominis globulars que contenen, cadascun d'ells, un agregat metall-tiolat. En el cas de les MTs de mamífer, l'agregat inclòs en el domini amino terminal, també anomenat domini  $\beta$ , està format per tres ions divalents i nou tiolats cisteïnics,  $\text{M}^{\text{II}}_3(\text{SCys})_9$ , i l'agregat de l'extrem C-terminal, o domini  $\alpha$ , es compon de quatre ions metàl·lics i onze cisteïnes,  $\text{M}^{\text{II}}_4(\text{SCys})_{11}$  (Figures I.2 i I.3.a). Aquesta mateixa distribució dels metalls s'ha descrit pel peix

## INTRODUCCIÓ

*Notothenia coriiceps*<sup>33</sup> i per l'eriçó de mar *Strongylocentrotus purpuratus*,<sup>34</sup> amb una inversió dels agregats metàl·lics en aquesta darrera MT, presentant l'agregat trinuclear en l'extrem carboxi terminal i el tetranuclear en el N-terminal.

**Taula I.1.-** MTs amb l'estructura tridimensional inclosa en el *Protein Data Bank* (PDB)

<b>Classe taxonòmica (organisme)</b>	<b>Metal·lotioneïna</b>	<b>Codi ID - PDB</b>	<b>Tècnica <sup>referència</sup></b>
Mamífer (humà, conill i rata)	Cd <sub>7</sub> MT-2	(1MHU, 2MHU), (1MRB, 2MRB), (1MRT, 2MRT)	RMN <sup>32, 35, 36</sup>
Mamífer (rata)	Zn <sub>2</sub> Cd <sub>5</sub> MT-2	(4MT2)	Difracció de raigs X <sup>8</sup>
Mamífer (ratolí)	Cd <sub>7</sub> MT-1	(1DFT, 1DFS)	RMN <sup>37</sup>
Mamífer (ratolí; humà)	Cd <sub>4</sub> αMT-3	(1JI9); (2F5H)	RMN, <sup>38</sup> RMN <sup>39</sup>
Peix ( <i>N. coriiceps</i> )	Cd <sub>7</sub> MT_nc	(1M0J, 1M0G)	RMN <sup>33</sup>
Crustaci ( <i>C. sapidus</i> )	Cd <sub>6</sub> MT1	(1DMC, 1DME)	RMN <sup>9</sup>
Crustaci ( <i>H. americanus</i> )	Cd <sub>6</sub> MT-1	(1J5M, 1J5L)	RMN <sup>40</sup>
Equinoderm (Sea Urchin)	Cd <sub>7</sub> MTA	(1QJK, 1QJL)	RMN <sup>34</sup>
Llevat ( <i>S. cerevisiae</i> )	Cu <sub>7</sub> MT, Ag <sub>7</sub> MT	(1AQR, 1AQS), (1A00, 1AQQ)	RMN <sup>41</sup>
Llevat ( <i>S. cerevisiae</i> )	Cu <sub>8</sub> MT	(1RJU)	Difracció de raigs X <sup>13</sup>
Bacteri ( <i>Synechococcus</i> )	Cd <sub>4</sub> SmtA	(1JJD)	RMN <sup>10</sup>
Fong ( <i>N. crassa</i> )	Cu <sub>6</sub> NcMT	(1T2Y)	RMN <sup>14</sup>

En el cas de les MTs de crustaci, ambdós dominis inclouen 3 ions metàl·lics formant dos agregats amb estequiometria M<sup>II</sup><sub>3</sub>(SCys)<sub>9</sub>.<sup>9</sup> Aquests dominis han estat anomenats domini β<sub>C</sub> i domini β<sub>N</sub>, per associació amb les MTs de mamífer,<sup>40, 42</sup> Figura I.3.b.

La metal·lotioneïna de bacteri SmtA conté un únic agregat metàl·lic: M<sup>II</sup><sub>4</sub>(SCys)<sub>9</sub>(NHis)<sub>2</sub>, Figura I.3.c. L'estequiometria global metall·ligand d'aquesta proteïna és equiparable a l'observada en el domini tetranuclear de les MTs de mamífer (domini α), però mantenen importants diferències:

- ✓ Es descriu per primera vegada, per SmtA, la participació de les histidines en la coordinació dels ions metàl·lics en una MT.
- ✓ SmtA presenta elements d'estructura secundària, absents en les MTs d'organismes superiors.
- ✓ Un dels ions Zn(II), enllaçat tetraèdicament a 4 residus de cisteïna, és inert front a la substitució per ions Cd(II).<sup>10</sup>

Aquestes dues darreres característiques han permès associar SmtA amb les proteïnes conegudes com a “dits de zinc” en eucariotes.

Les MTs quan s'enllacen a Cu(I), a diferència del que passa amb els ions divalents Zn(II) i Cd(II), on l'entorn de coordinació és essencialment tetraèdic, coordinen el coure mitjançant 2 o 3 lligands cisteínics, amb una geometria digonal o plano-trigonal, respectivament.<sup>6, 30, 43</sup> En MTs de mamífer es disposa de molt poca informació sobre la coordinació d'aquestes proteïnes al coure. Un estudi recent de la valoració de Zn<sub>7</sub>MT-1 amb Cu<sup>+</sup> seguida per RMN de <sup>1</sup>H mostra els canvis conformacionals provocats per la incorporació dels ions coure i destaca l'estabilitat de l'estequiometria Zn<sub>x</sub>Cu<sub>7</sub>MT-1 (en la que es desconeix el contingut en zinc),<sup>44</sup> recolzant els resultats presentats en un extensiu estudi de dicroïsmes circulars, en el qual es proposava la formació cooperativa de l'intermedi Zn<sub>3</sub>Cu<sub>7</sub>MT-1, en la valoració de Zn<sub>7</sub>MT-1 amb coure.<sup>12</sup> En el cas de MT-3 s'ha aïllat la proteïna nativa amb un contingut metàl·lic de 4 ions Cu<sup>+</sup> i 3 ions Zn<sup>2+</sup>, distribuïts en dos dominis homometàl·lics: (Zn<sub>3</sub>)α(Cu<sub>4</sub>)βMT-3,<sup>45</sup> però aquesta espècie no ha estat caracteritzada estructuralment.

El coure coordinat a les metal·lotioneïnes es troba en tots els casos en estat d'oxidació +1, degut a que els tiols cisteínics tenen una major capacitat reductora que el Cu(I) ( $E^\circ(\text{Cu}^{2+}/\text{Cu}^+) = 0.153 \text{ V}$ ;  $E^\circ(\text{cistina}^\dagger/\text{cisteïna}) = -0.22 \text{ V}$ <sup>46</sup>). En diversos estudis s'ha fet reaccionar les MTs amb Cu(II) i s'ha observat una reducció del metall a Cu(I), incorporant-se posteriorment aquest ió en l'estructura de la proteïna, la qual ha format un o més ponts disulfur.<sup>20, 47</sup> Aquests estudis han permès proposar les metal·lotioneïnes com a proteïnes amb activitat redox, relacionada en l'eliminació de radicals lliures i altres espècies oxidants.

Les úniques estructures tridimensionals de MT amb coure que han estat resoltes són la MT del llevat *Saccharomyces cerevisiae*, també coneguda com a CUP1,<sup>13, 48-50</sup> i la MT del fong *Neurospora crassa*.<sup>14</sup> Ambdues proteïnes estan formades per un únic

<sup>†</sup> Cistina: dímer de la cisteïna, fruit de l'oxidació dels grups tiols, formant un pont disulfur (CysS-SCys).

agregat metàl·lic: Cu<sub>8</sub>MT en llevat, i Cu<sub>6</sub>NcMT en *Neurospora crassa* (Figura I.4). Aquesta escassetat de coneixement estructural per les CuMTs és essencialment deguda a dos motius. En primer lloc s'ha de tenir en compte que els estudis de RMN d'una proteïna coordinada a coure és veuen limitats a l'estudi de la cadena polipeptídica, ja que el Cu(I) no dona cap informació mitjançant aquesta tècnica (moment quadrupolar diferent a 1/2, I(Cu<sup>+</sup>) = 5/2). Aquest inconvenient s'ha intentat solucionar mitjançant la substitució del Cu(I) per Ag(I), ió actiu per RMN, però s'ha conclòs que no en tots els casos aquests ions donen espècies isomorfes.<sup>49, 51</sup> La determinació estructural de les CuMTs mitjançant difracció de raigs X està condicionada a l'obtenció de monocristalls d'aquestes proteïnes amb coure, intents que, en molts pocs casos, han estat fructífers.<sup>13</sup>

La determinació de l'estructura tridimensional que assoleix una MT en coordinar-se als diferents ions metàl·lics és tan important perquè pot proporcionar una valuosa informació a l'hora d'analitzar els processos biològics en els quals està implicada aquesta proteïna.

### ***Funció de les MTs***

Les funcions que s'han atribuït a les metal·lotioneïnes són molt diverses i, encara avui en dia, després d'haver passat mig segle del seu descobriment, són un motiu de debat entre la comunitat científica que les estudia.

Molts treballs han destacat la capacitat destoxicant de les MTs com una de les seves principals funcions, basant-se en: a) l'increment de la sensibilitat front a la contaminació amb cadmi dels organismes i cèl·lules que han estat modificats genèticament i que no poden expressar la MT<sup>23, 52, 53</sup> i en b) l'efecte inductor que tenen els metalls tòxics sobre els gens que codifiquen per aquestes proteïnes.<sup>54-57</sup>

Malgrat això, la contaminació per ions com el Cd<sup>2+</sup> no és habitual i és un fenomen recent, causat per l'acció de l'home. Per tant, aquestes propietats destoxicants observades per les metal·lotioneïnes semblen ser més una conseqüència del seu elevat contingut en cisteïnes que no pas de l'evolució dels organismes per adaptar-se a condicions de contaminació per metalls tòxics.<sup>23</sup>

El zinc i el coure són els metalls coordinats a aquestes proteïnes en condicions fisiològicament normals (absència de metalls tòxics), la qual cosa ha dut a proposar i investigar altres possibles funcions de les MTs. S'han atribuït, a trets generals, les següents funcions per a les metal·lotioneïnes:<sup>58-61</sup>

- ✓ homeòstasi de Zn i Cu
- ✓ control metabòlic de la producció d'energia
- ✓ propietats antioxidants i antiapoptòtiques<sup>†</sup>

Les MTs poden actuar com a reservori de zinc i coure, per tal de subministrar aquests metalls durant la biosíntesi de metal·loproteïnes. Alguns estudis *in vitro* han demostrat la viabilitat del procés de transferència de metalls de les MTs a altres metal·loproteïnes en la seva forma demetal·lada.<sup>3, 62</sup> Sovint, però, s'ha observat que aquest bescanvi de metalls no és possible si no va acompanyat de l'oxidació de la MT, ja que en la seva forma totalment reduïda aquesta proteïna presenta una major afinitat pels metalls que la que mostren altres metal·loproteïnes.<sup>20, 24, 61, 63</sup>

El paper de les MTs com a agent antioxidant està àmpliament estudiat.<sup>64</sup> S'ha proposat en diversos treballs una important participació d'aquestes proteïnes en el procés d'eliminació de radicals lliures,<sup>65-67</sup> reaccionant-hi directament i oxidant-se formant ponts disulfur, o bé, mitjançant una intervenció indirecta, cedint ions zinc o coure a enzims antioxidants, com la superòxid dismutasa.<sup>68</sup>

Els estudis amb cèl·lules i organismes genoanul·lats per a aquesta proteïna (MT *knockout* o MT-KO) aporten nous indicis de la participació de les MTs en l'homeòstasi de zinc i coure. Mitjançant aquesta metodologia s'han pogut detectar, en ratolins, alteracions en la distribució del zinc com a conseqüència de l'absència de MTs,<sup>69</sup> així com, un descens de la viabilitat de cultius cel·lulars MT-KO en condicions de deficiència de coure.<sup>70</sup>

Aquesta estratègia també ha estat utilitzada per avaluar altres funcions d'aquestes proteïnes. L'observació d'un increment en l'obesitat dels ratolins MT-KO ha dut a proposar la participació d'aquestes proteïnes en processos de regulació del balanç energètic.<sup>71</sup> La major susceptibilitat a la mort per apoptosi de les cèl·lules *knockout* en MT és indicatiu, al seu torn, d'unes propietats antiapoptòtiques per a aquestes proteïnes.<sup>72, 73</sup>

S'han esmerçat grans esforços per avaluar el paper de les MTs en el sistema nerviós central, CNS.<sup>74, 75</sup> L'estudi amb ratolins transgènics ha permès demostrar tant amb animals MT-KO com amb animals que sobreexpressen aquesta proteïna, que MT-1 i MT-2, en diferents models de dany cerebral, ajuden a disminuir l'estrès oxidatiu, la inflamació i l'apoptosi en el CNS.<sup>76</sup>

---

<sup>†</sup> Apoptosi: mort cel·lular programada.

El paper neuroprotector i neuroregenerador atribuït a les MTs s'ha associat a la seva capacitat per reaccionar amb radicals lliures, per actuar com a agent quelant de metalls pesants i per regular els nivells de zinc disponibles a l'interior de la cèl·lula.<sup>77</sup> Un estudi molt recent amplia la informació disponible sobre les possibles funcions extracel·lulars de les MTs, essent el motiu Cys-Lys-Cys-Lys essencial per les propietats neuroactives que es proposen.<sup>78</sup>

Tenint en compte aquest recull de propietats atribuïdes a les MTs, resulta interessant aturar-se a analitzar la relació que es pot establir entre elles. Com ja s'ha comentat, la transferència d'ions metàl·lics de les MTs cap a altres metal·loproteïnes és un procés sovint assistit per l'oxidació de la metal·lotioneïna. Les propietats redox dels tiolats cisteïnics de les MTs els permeten participar en l'eliminació d'espècies reactives d'oxigen (ROS) i d'altres radicals lliures. I al seu torn, és conegut que les espècies ROS són una de les causes més destacades de la mort cel·lular programada o apoptosi.<sup>79</sup> És clara doncs la interconnexió entre les diferents funcions proposades per a les MTs i, això fa que, en molts casos, no resulti evident establir quina d'aquestes propietats és la causa o quina la conseqüència de l'acció de les metal·lotioneïnes.

L'entorn en el qual es troba la proteïna és un condicionant del comportament que aquesta adoptarà en cada moment. Fins i tot s'ha proposat un cicle redox per a les MTs,<sup>65</sup> dins el qual es poden englobar diverses de les propietats atribuïdes a aquestes proteïnes.

La complexitat funcional d'aquestes proteïnes és tan gran que fins i tot s'ha arribat a proposar funcions totalment independents per a cadascun dels dominis d'una mateixa MT, segons les seves propietats químiques. Així, un estudi liderat per I. M. Armitage, proposa un paper detoxicador pel domini  $\alpha$  de les MTs de mamífer, ja que coordina més fortament els ions metàl·lics i, un paper relacionat amb la homeòstasi del zinc i del coure pel domini  $\beta$ , afavorit per la major labilitat en els enllaços M-SCys.<sup>80</sup>

### ***Estructura i funció en les MTs de mamífer***

Les MTs de mamífer més estudiades són les isoformes MT-1 i la MT-2, que es troben majoritàriament en el fetge i el ronyó, però també són presents en molts altres òrgans. En canvi MT-3 i MT-4 presenten expressions específiques, trobant-se la primera en el sistema nerviós i la segona en l'epiteli escamós estratificat.<sup>81, 82</sup> Aquesta especificitat en l'expressió permet preveure una funció també específica per a aquestes proteïnes. Així ha estat demostrat en el cas de la isoforma MT-3, també anomenada

factor inhibidor del creixement neuronal, GIF, després de que Uchida i col·laboradors observessin un increment de l'activitat neurotròfica com a conseqüència de la manca d'aquesta proteïna.<sup>82</sup>

Un exemple de com poden afectar petits canvis estructurals a la funció d'una proteïna el trobem també en la isoforma de mamífer MT-3. Aquesta MT mostra una estructura primària amb una elevada homologia respecte a la MT-1 i la MT-2: són equivalents en aproximadament un 70% dels residus aminoacídics, incloent les 20 cisteïnes, que es conserven en totes elles. La MT-3, però, inclou a més a més 2 inserts<sup>†</sup>: una treonina en la posició 5 i un hexapèptid ric en glutamat, situat en el domini C-terminal. Ambdós inserts han estat estudiats per tal d'avaluar la participació que tenen en les funcions d'aquesta proteïna. S'ha observat que l'eliminació del residu Thr5, així com la mutació d'aquest aminoàcid per una alanina provoca la desaparició de la bioactivitat de la proteïna. En canvi, la mutació de la treonina per una serina, en conserva l'activitat. Aquest resultat suggereix que la presència d'un hidroxil en la cadena lateral del cinquè aminoàcid, bé sigui el de la treonina o el de la serina, ajuda a establir la conformació biològicament activa. En canvi, els estudis referents a l'hexapèptid àcid no han permès assegurar una participació directa d'aquest en la bioactivitat de MT-3.<sup>83-85</sup> Aquesta isoforma també presenta un motiu absent en la resta de MTs de mamífer, format per 4 aminoàcids (Cys-Pro-Cys-Pro). Aquests residus presenten una relació directa en l'activitat biològica específica de MT-3,<sup>86,87</sup> actuant com a lloc d'interacció amb altres proteïnes. Finalment, estudis de RMN, que comparen les dades disponibles de les isoformes 1 i 2, han permès descriure per MT-3 una estructura més dinàmica,<sup>88</sup> fet que ha estat també relacionat en les funcions específiques que desenvolupa.<sup>38</sup>

En el cas de la MT-4 hi ha molts menys estudis que en permetin identificar l'especificitat funcional. En un estudi del 1994 es proposava la participació d'aquesta isoforma en la regulació del metabolisme del zinc durant la diferenciació de l'epiteli estratificat.<sup>81</sup> Altres treballs, en canvi, relacionen la MT-4 amb els processos que requereixen coure en teixits epitelials, classificant aquesta MT com a Cu-tioneïna.<sup>29</sup> Finalment, un estudi més recent,<sup>31</sup> aporta noves dades de la capacitat coordinant i les propietats estructurals de MT-4, mitjançant la caracterització de la proteïna amb Cd(II) i Co(II), per tal de facilitar la comprensió del paper biològic d'aquesta metal·lotioneïna.

---

<sup>†</sup> Inserir: aminoàcid o grup d'aminoàcids addicionals.

## INTRODUCCIÓ

---

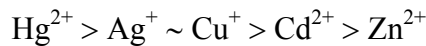
Conclouen que la MT-4 té un doble paper, relacionat tant amb el metabolisme del zinc com amb el del coure.

L'obtenció de dades estructurals de la isoforma MT-4 permetria la comparació amb MT-1 i MT-2, donant una inestimable informació per tal d'interpretar l'especificitat d'expressió d'aquesta MT. Fins al moment, però, es disposa de molt poques dades en aquest camp. La manca d'informació disponible de la MT-4 de mamífer és un clar exemple del camí que queda per recórrer per tal d'elucidar el paper biològic de les metal·lotioneïnes i les diferències entre les diverses isoformes.



### I.3. Preferències metàl·liques

Les MTs difereixen de la resta de metal·loproteïnes pel seu elevat contingut metàl·lic, la seva estructura tridimensional inusual en molècules bioinorgàniques i la seva remarcable labilitat cinètica,<sup>3</sup> propietats que les relacionen en processos de ràpida transferència metàl·lica i metal·loregulació. L'afinitat dels ions metàl·lics pels llocs de coordinació en les MTs segueix el mateix ordre que s'ha trobat pels tiolats inorgànics:<sup>11</sup>



Malgrat aquesta regla general, la composició metàl·lica de les MTs natives depèn, en darrer terme, de la font d'obtenció de la proteïna i de la prèvia exposició a metalls a la qual s'ha sotmès l'organisme del qual prové.<sup>30</sup> Així, una MT nativa només es trobarà coordinada a mercuri en casos de contaminació de l'organisme amb aquest metall, ja que, tot i que aquesta proteïna mostra una màxima afinitat per a aquest ió, el mercuri no es troba en els éssers vius en condicions fisiològiques.

La metodologia emprada per induir l'expressió de la MT també és determinant en el seu contingut metàl·lic. Una estratègia àmpliament utilitzada per sobreexpressar una metal·lotioneïna és sotmetre a un excés de metalls l'organisme del qual es vol obtenir la proteïna. L'ús d'aquesta estratègia fa que, en general, la MT s'obtingui coordinada al metall que s'ha emprat per induir la seva síntesi. Així, per exemple, la proteïna MT1 de *Callinectes sapidus* s'obté coordinada a cadmi quan s'han tractat els crancs amb aquest metall<sup>89</sup> i s'aïlla coordinada a coure si s'utilitza una sal d'aquest metall per sobreexpressar la proteïna.<sup>90</sup>

La funció de cada MT està relacionada amb els metalls que indueixen la seva expressió. Algunes metal·lotioneïnes són induïdes per més d'un metall, com és el cas de la proteïna MT1 de *Callinectes sapidus*, que pot ser induïda tant per cadmi com per coure. Però aquest no és el comportament que presenten totes les MTs. Sovint, en un mateix organisme, coexisteixen diverses isoformes de MT, essent cadascuna d'elles induïble específicament per un metall en concret, indicant una funció també específica per a cada isoforma. Així, s'han descrit, en el cargol *Helix pomatia*, dues isoformes de MT, una induïble específicament per coure, en el mantell, i l'altra per cadmi, en l'hepatopàncrees.<sup>91</sup> S'ha proposat per la isoforma específica de coure (induída específicament per coure) una funció relacionada amb la regulació del coure i en la síntesi de l'hemocianina, i per la isoforma específica de cadmi (induída específicament per cadmi) un paper destoxicador d'aquest metall tòxic.<sup>91</sup>

A diferència del que passa en les MTs de mamífer, que poden coordinar zinc, cadmi i coure simultàniament, les MTs de llevat i fong només s'han trobat contenint coure. En canvi, altres organismes com el cargol *Helix pomatia* o el cranc *Callinectes sapidus* presenten isoformes específiques de cadmi/zinc i isoformes específiques de coure, és a dir, induïbles específicament per cadmi/zinc i coure, respectivament.<sup>91-93</sup>

Tal i com proposa la darrera classificació de les MTs descrita en l'apartat I.1 (Característiques generals de les metal·lotioneïnes), en la qual es proposa la divisió de les MTs en zinc-tioneïnes i coure-tioneïnes, les propietats coordinants que mostra una metal·lotioneïna són un paràmetre cabdal a l'hora d'esbrinar la funció biològica de la proteïna. Per la qual cosa és molt important determinar tant el contingut metàl·lic de la proteïna nativa, com les propietats coordinants analitzades *in vitro*, fent estudis de bescanvi de metall, cinètiques de reacció, etc.

## I.4. Les cisteïnes en les metal·lotioneïnes: Triplets Cys-Cys-Cys

Una característica cabdal de les metal·lotioneïnes és el seu elevat contingut en cisteïnes, que en general es troba al voltant del 30 % del total d'aminoàcids. La importància d'aquestes cisteïnes en el plegament que adopta la proteïna al coordinar-se als diferents ions metàl·lics va posar-se de manifest després dels primers estudis estructurals de les metal·lotioneïnes. En comparar l'estructura de tres isoformes de Cd<sub>7</sub>MT-2 de diferents mamífers, que mantenen la posició de les 20 cisteïnes, s'observà que la seva distribució espacial era pràcticament superposable, tot i les evidents diferències en l'estructura primària (mostren 25 % de discrepància).<sup>94</sup> El fet de mantenir-se en totes elles la posició de les 20 cisteïnes, així com la connectivitat metall-cisteïna, suggeria, en un primer moment, que els residus no cisteïnics podien actuar únicament com a espaiadors flexibles que connectaven els residus de cisteïna.<sup>†</sup> En altres estudis esmentats anteriorment s'ha demostrat, però, que en alguns casos els residus no cisteïnics són de cabdal importància a l'hora de determinar les preferències coordinants i l'especificitat funcional de diferents isoformes, com és el cas de les MTs d'*Helix pomatia*<sup>91</sup> o la isoforma MT-3 de mamífer.<sup>87, 95</sup> Malauradament, en el cas de les isoformes d'*Helix pomatia* no es té informació estructural. Per MT-3 s'ha vist que el domini  $\alpha$  quan es troba coordinat a 4 ions Cd<sup>2+</sup>, presenta una estructura molt similar a les descrites per MT-1 (Figura I.6) i MT-2, mantenint-se l'agregat metàl·lic inalterat. En canvi, pel domini  $\beta$  s'ha suggerit que algunes diferències puntuals, com la presència de la prolina en la posició 9, poden provocar canvis estructurals suficients per conferir a la proteïna una especificitat funcional absent en les altres isoformes.<sup>38</sup>

L'anàlisi de les seqüències de les MTs, amb l'objectiu d'assignar un paper als diferents residus que les componen, va fer advertir que en les metal·lotioneïnes es repeteixen uns motius formats per uns pocs aminoàcids que inclouen dues o més cisteïnes. Aquests motius són: Cys-Cys, Cys-X-Cys i Cys-X-X-Cys, on X representa un aminoàcid diferent a la cisteïna.<sup>3</sup>

Diversos estudis sobre les preferències metàl·liques dels dominis constituents de les MTs de mamífer han conclòs que el coure es coordina preferentment al domini  $\beta$ .<sup>12,</sup>

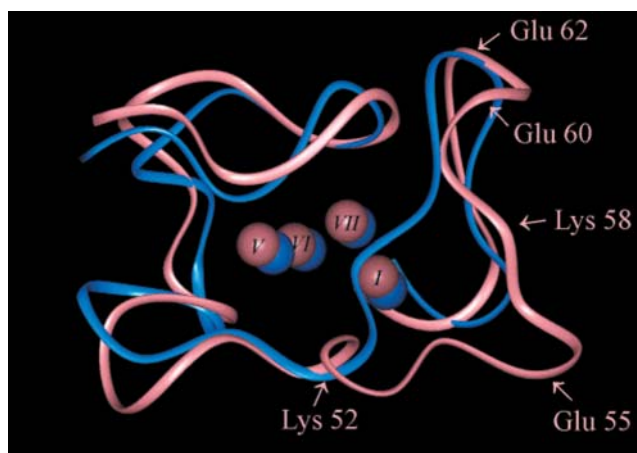
---

<sup>†</sup> Els àtoms de sofre dels tiolats cisteïnics, responsables de la coordinació dels metalls, s'han de trobar en una disposició espacial adient per tal de permetre conformacions no excessivament tensionades quan es formen els agregats metàl·lics.

## INTRODUCCIÓ

---

<sup>96</sup> Una justificació a aquestes dades experimentals ha estat la diferent distribució dels residus de cisteïna en ambdós dominis, destacant la presència del motiu Cys-X-Cys repetit 4 cops en el domini  $\beta$ , que sembla optimitzar l'estructuració de l'agregat metàl·lic que es forma amb el coure.<sup>94</sup>



**Figura I.6.-** Superposició de les estructures descrites pels dominis  $\alpha$  de MT-1 (blau) i MT-3 (rosa), segons Öz *et al.* (2001).<sup>38</sup>

Més recentment s'ha descrit en algunes isoformes de protist i de crustaci, entre altres organismes (veure Taula I.2), la presència d'un nou motiu en el qual intervenen les cisteïnes, constituït per tres residus consecutius d'aquest aminoàcid (Cys-Cys-Cys). L'estudi de com participa aquest nou motiu de cisteïnes en la capacitat coordinant, en el plegament de la proteïna i en la seva funció biològica, es troba encara en una fase molt preliminar. En alguna d'aquestes MTs s'ha determinat la relació total metall-proteïna, però en molts pocs casos s'ha aprofundit en l'estudi de les seves espècies metal·lades.<sup>22,</sup>  
97

En la Taula I.2 es pot observar la diversitat d'organismes que presenten aquest motiu en l'estructura primària de les seves MTs, els diferents metalls que n'indueixen la seva expressió i la heterogeneïtat en la mida de la proteïna i el contingut total en cisteïnes.

## Les cisteïnes en les metal·lotioneïnes: Triplets Cys-Cys-Cys

**Taula I.2.-** Metal·lotioneïnes amb triplets de cisteïnes en la seva estructura primària.

<b>Espècie / Isoforma</b>	<b>ID de la proteïna</b>	<b>Principal metall inductor</b>	<b>Nº d'aminoàcids; Nº de Cys (Nº de triplets)</b>	<b>Referència</b>
<i>Tetrahymena pigmentosa</i> <i>T. pyriformis</i> <i>T. thermophila</i> / <b>MT1</b>	P80394 O97388 Q8T6B3	Cd	107; 31 Cys (4)	98-102
<i>T. thermophila</i> / <b>MTT1</b>	Q8WSW3	Cd	162; 48 Cys (6)	103, 104
<i>T. pyriformis</i> / <b>GLMT/MT2</b>	Q5UBE6	Cd	181; 54 Cys (6)	98
<i>T. thermophila</i> / <b>MTT3</b>	Q5XQF5	Cd	162; 42 Cys (2)	2
<i>T. thermophila</i> / <b>MTT5</b>	Q5EGE0	Cd	99; 24 Cys (1)	2
<i>Crassostrea virginica</i> / <b>MT-IV</b> <b>(A, B i C)</b>	Q0H9V8 Q0H9V7 Q0H9V6	-	83; 25 Cys (3)	105
<i>Callinectes sapidus</i> / <b>MTCU</b>	<b>Q9U620</b>	<b>Cu</b>	<b>64; 21 Cys (2)</b>	106
<i>Portunus pelagicus</i> / <b>MT-I</b>	A2I5Y3	-	64; 21 Cys (2)	107
<i>Homo sapiens</i> / <b>MT-1B</b>	P07438	-	61; 21 Cys (1)	108
<i>Eisenia foetida</i> / <b>MT</b>	P81695	Cd	75; 21 Cys (1) (fragment)	97
<i>Panulirus argus</i> / <b>MT</b>	Q7YW25	Cd, Zn	59; 19 Cys (1)	55
<i>Yarrowia lipolytica</i> / <b>MT-1</b>	P41927	Cd, Zn, Cu	55; 9 Cys (1)	2, 109, 110
<i>Yarrowia lipolytica</i> / <b>MT-2</b>	P41928	Cd, Zn, Cu	54; 9 Cys (1)	2, 109, 110
<i>Yarrowia lipolytica</i> / <b>MT-3</b>	Q9HFD0	Cd, Zn, Cu	55; 9 Cys (1)	2, 109, 110
<i>Yarrowia lipolytica</i> / <b>MT-4</b>	Q9HFC9	Cd, Zn, Cu	54; 9 Cys (1)	2, 109, 110
<i>Laternula elliptica</i> / <b>MT 10a</b>	Q0PHS8	Cd	73; 22 Cys (1)	111
<i>Laternula elliptica</i> / <b>MT 10b</b>	Q0PHS7	Cd	73; 22 Cys (1)	111

La presència de triplets de cisteïna en l'estructura primària s'ha atribuït, en alguns casos, a una mutació accidental, sense clares implicacions evolutives, ja que sembla no alterar la capacitat coordinant ni l'estructura de la proteïna respecte a la d'altres isoformes properes. És el cas de la MT-1B humana, la MT d'*Eisenia foetida* i la MT de *Panulirus argus*, en les quals s'ha proposat que la cisteïna addicional no participa de forma significativa en la coordinació metàl·lica<sup>22, 97, 108</sup> i que probablement es troba com a tiol lliure.

En canvi, en altres MTs que presenten aquest motiu, com és el cas d'algunes isoformes de *Tetrahymena*<sup>102, 112, 113</sup> i de *Yarrowia lipolytica*,<sup>2</sup> s'observa la repetició dels triplets, en una mateixa isoforma, fins a 6 cops, i es conserva en diferents isoformes del mateix organisme, fet que sembla donar una especial importància a aquesta peculiar disposició de les cisteïnes. En el cas de la isoforma TpyMT1 de *Tetrahymena pyriformis*, s'ha determinat que aquesta metal·lotioneïna, que conté 31 cisteïnes, enllaça 11 metalls divalents, quan s'obté la proteïna recombinant en medis suplementats amb Zn(II) o Cd(II), mantenint la relació Cys:M(II) observada en les MTs de mamífer (20:7). Quan s'obté la proteïna en medis suplementats amb coure, TpyMT1 forma complexos heterometàl·lics  $Cu_xZn_yMT$  (amb  $x + y = 8 - 20$ ).<sup>102</sup>

En el cas de les MTs dels crancs *Callinectes sapidus* i *Portunus pelagicus* aquest motiu es mostra per duplicat al llarg de la seqüència d'aminoàcids i es conserva en dues isoformes de cranc (veure més detalls en l'apartat I.5). Ambdues característiques semblen apuntar a que, en aquestes MTs, la presència de triplets de cisteïnes sí té repercussions estructurals i funcionals pendents de resoldre.

## I.5. Metal·lotioneïnes de crustaci: Isoformes del cranc *Callinectes sapidus*

Les metal·lotioneïnes constitueixen una gran família de proteïnes amb una àmplia distribució filogenètica. Aquesta característica permet estudiar les MTs dels diversos organismes on s'expressen i comparar-ne les seves propietats coordinants i estructurals a fi d'extreure més informació sobre les seves possibles funcions.

Les MTs de mamífer han estat objectiu d'un elevadíssim nombre d'estudis i s'han pogut determinar amb molta precisió les propietats que les defineixen. Un segon grup taxonòmic també força estudiat és el dels crustacis, del qual s'han descrit diverses isoformes de MT de cranc, llagosta i llamàntol (veure Taula I.3).

L'any 1982 es descriu per primer cop l'estructura primària de dues isoformes de cranc, MT-1 i MT-2 de *Scylla serrata*, formades per 58 i 59 aminoàcids, respectivament, dels quals 18 són cisteïnes.<sup>114</sup> Aquestes MTs, que presenten una similitud de seqüència del 83 %, van ser l'objectiu dels primers estudis estructurals, per RMN de <sup>113</sup>Cd, de les MT de crustaci.<sup>115</sup> En base a aquests treballs es va poder descriure que les MTs d'aquest cranc inclouen 2 agregats metàl·lics amb estequiometria  $M^{II}_3(SCys)_9$ , anàloga a l'observada en el domini  $\beta$  de les MTs de mamífer. Aquests estudis, junt amb els d'altres metal·lotioneïnes de crustaci realitzats posteriorment,<sup>9, 55, 106, 116-118</sup> han donat pas a la descripció d'unes característiques comuns, que inclouen gairebé totes les MTs de crustaci:

- ✓ Cadenes peptídiques de 58-59 aminoàcids, dels quals 18-19 són cisteïnes.
- ✓ Estructuració de la proteïna en dos dominis, que inclouen, cadascun d'ells, un agregat d'estequiometria  $M^{II}_3(SCys)_9$ , amb 3 cisteïnes pontals i 6 terminals cadascun.
- ✓ Estequiometria global  $M^{II}_6$ -MT, amb metalls divalents, a diferència de la típica espècie  $M^{II}_7$ -MT que s'obté en les MTs de mamífer.

Taula I.3.- MTs de crustaci.

Organisme	Espècie	ID de la proteïna	Isoforma (Swiss Prot)	Referència	Estequiometria M-MT	Nº d'aa (Cys)
	<i>C. sapidus</i>			Veure Taula I.4		
	<i>S. serrata</i>	P02805	MT-1	114, 115, 119,	Cd <sub>6</sub> MT-1	59 (18)
		P02806	MT-2	120	Cd <sub>6</sub> MT-2	58 (18)
	<i>P. potamios</i>	P55952	MT	118	-	58 (18)
Cranc		A2I5Y3	-	-	-	64 (21), 2 triplets
	<i>P. pelagicus</i>	A2I5Y4	-	93	-	59 (18)
		Q95U93	-	-	-	58 (19)
	<i>E. sinensis</i>	Q95U92	-	57, 121	-	58 (19)
	<i>C. maenas</i>	P55948	MT	117, 122	-	58 (19)
		Q86M28	-	107	-	58 (18)
	<i>C. pagurus</i>	-	-	123-125	Cd <sub>6</sub> MT (Cd <sub>7</sub> -MT)	55 (19)
Llagosta	<i>P. leniusculus</i>	Q9U623	-	107	-	58 (18)
	<i>A. astacus</i>	P55951	MT	118	-	58 (18)
Llamàntol		P29499	CuMT-1	28, 40, 42, 126-	Cd <sub>3</sub> β <sub>N</sub> MT-1; Cd <sub>3</sub> β <sub>C</sub> MT-1	58 (18)
	<i>H. americanus</i>	Q95P38	-	133	M <sup>II</sup> <sub>6</sub> -+M <sup>II</sup> <sub>7</sub> -MTH (M=Zn, Cd)	58 (18)
	<i>P. argus</i>	Q7YW25	-	22, 55	Zn <sub>6</sub> MTPA	59 (19), 1 triplet



Malgrat la gran homogeneïtat que mostra el grup de les MTs de crustaci, hi ha alguna isoforma que destaca per presentar característiques molt diferents a les abans exposades. És el cas de la metal·lotioneïna CuMT-II del cranc *Callinectes sapidus*, MTC.<sup>†</sup> Aquesta MT conté un total de 64 aminoàcids, dels quals 21 són cisteïnes. Sis d'aquestes cisteïnes es troben com a triplets, mostrant el motiu Cys-Cys-Cys per duplicat. Fins al moment no s'ha pogut resoldre amb rigor quina estequiometria metall/MT presenta la proteïna MTC nativa, ni amb metalls divalents ni amb monovalents i tampoc es té informació sobre l'estructura tridimensional que adopta.

En la Figura I.7.a es mostra l'alineament de les seqüències de les MTs de crustaci. Es pot apreciar com les 15 primeres seqüències presenten un elevat grau de similitud, amb una conservació pràcticament total de la posició de les 18 – 19 cisteïnes que contenen. Les dues darreres seqüències de crustaci (números 16 i 17), una de les quals correspon a la MTC, mostren un 97 % d'analogia entre elles, però a l'hora de comparar-les amb les 15 restants s'observa una clara diferenciació, especialment en la posició d'algunes cisteïnes.

MTC ha estat comparada, en base a estudis filogenètics, amb la MT induïda específicament per coure del mol·lusc *Helix pomatia*.<sup>106</sup> En aquest cargol s'han aïllat dues isoformes de MT. Una d'elles, que s'indueix específicament per Cd, ha estat purificada de l'hepatopàncrees, on s'ha observat una important acumulació d'aquest metall no essencial. Aquest fet l'ha associat amb un paper destoxicador del cadmi.<sup>91</sup> La segona MT de cargol estudiada s'indueix específicament per coure i es concentra en el mantell. Aquesta isoforma s'ha aïllat coordinada només a coure, la qual cosa suggereix la participació d'aquesta MT en la regulació del coure, probablement relacionada amb el procés de síntesi de l'hemocianina,<sup>‡</sup> ja que el mantell és un òrgan amb una important producció d'aquesta proteïna.

Paral·lelament, *Callinectes sapidus* presenta dues isoformes induïbles per cadmi i una induïble per coure.<sup>106</sup> Però cal remarcar que existeix una important diferència a tenir en compte entre les MTs d'aquests organismes, *C. sapidus* i *H. pomatia*: les dues isoformes de cargol, tot i tenir unes especificitats coordinants i funcionals tan

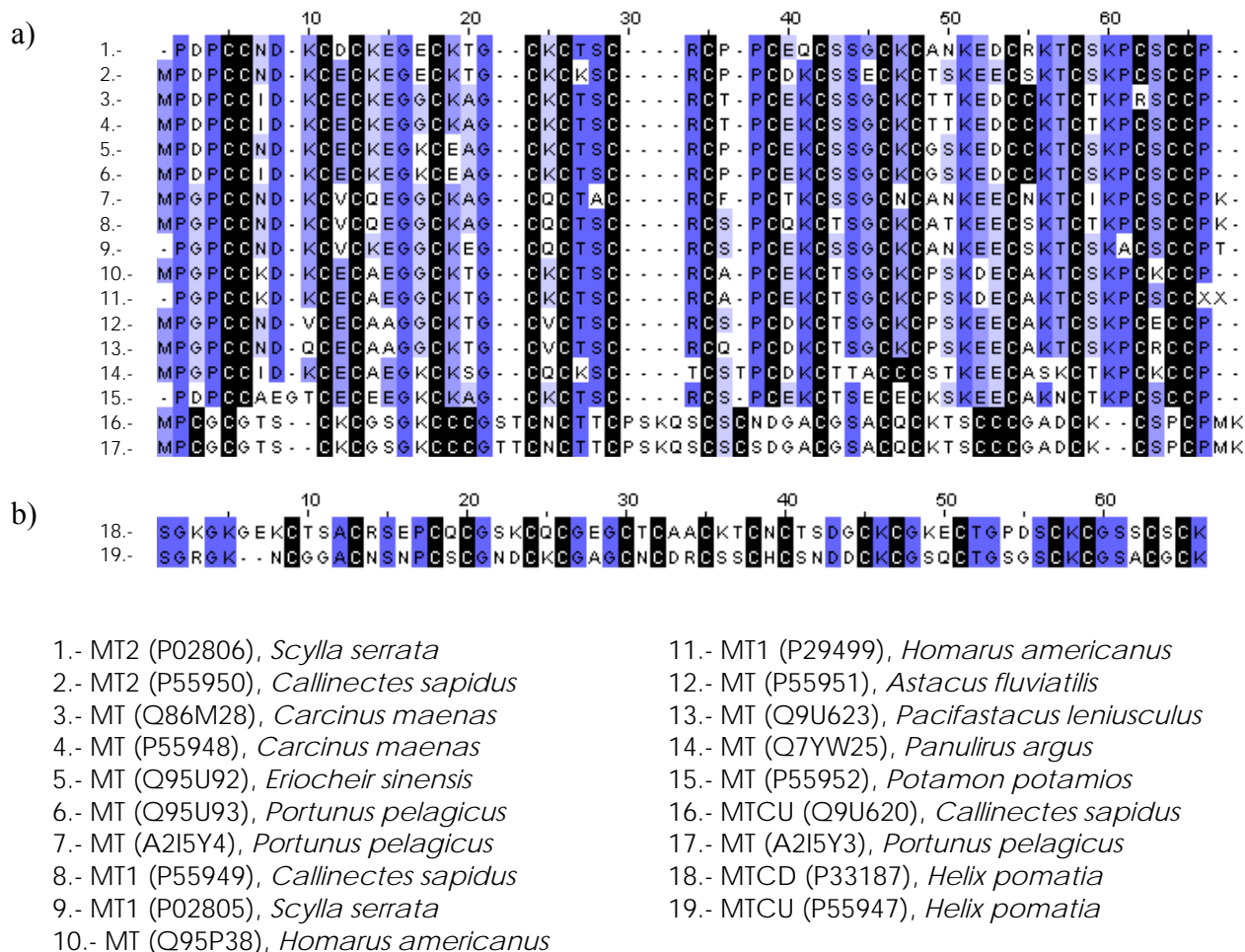
---

<sup>†</sup> Malgrat que el nom acceptat en la base de dades Swiss-Prot per a aquesta metal·lotioneïna, només induïble per coure, és CuMT-II, a partir d'ara, en aquest manuscrit, se l'anomenarà MTC per tal d'evitar confusions a l'hora de descriure les diferents formes metal·lades que pot adoptar aquesta proteïna.

<sup>‡</sup> Hemocianina: proteïna present en alguns crustacis, aràcnids i mol·luscs, encarregada del transport d'oxigen. La seva funció és equivalent a la que realitza l'hemoglobina en la sang d'altres animals. En lloc de ferro, però, presenta àtoms de coure en el seu centre actiu.

## INTRODUCCIÓ

diferenciades, conserven la posició de totes les seves cisteïnes, contràriament al que passa amb MTC i les altres dues isoformes del cranc *C. sapidus* (Figura I.7).



**Figura I.7.-** Alineació mitjançant l'aplicació ClustalW de les seqüències de MT de: a) crustaci; b) cargol, *Helix pomatia*, disponible a <http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>. La taula mostrada al peu de la figura conté la relació de metal·lotioneïnes corresponent a cada seqüència, amb la identificació, ID, utilitzada en la base de dades UniProtKB (<http://beta.uniprot.org/>) entre parèntesi. L'ordenació de les seqüències s'estableix per similitud de les mateixes.

El fet de mantenir la posició de totes les cisteïnes i, malgrat això, presentar unes propietats tan clarament diferenciades féu que, amb l'estudi de les MTs d'*Helix pomatia*, es posés ja de manifest al 1997 la importància dels residus no cisteïnics en la preferència metàl·lica d'aquestes proteïnes.<sup>91</sup> Aquesta apreciació ha estat posteriorment analitzada amb més detall en altres treballs, amb l'objectiu d'avaluar com poden afectar a les propietats d'una MT la modificació dels residus no cisteïnics. Un d'aquests treballs ha conclòs que l'estabilitat dels agregats metàl·lics que formen les MTs no només depèn de la posició de les cisteïnes, sinó també de les interaccions específiques que estableixen els aminoàcids pròxims a aquestes.<sup>129</sup>

***MTs de Callinectes sapidus***

Essent l'estudi de la MTC un dels objectius cabdals d'aquesta Tesi Doctoral, s'ha cregut adient aprofundir especialment en les dades disponibles sobre aquesta isoforma i les altre dues MTs presents en el mateix organisme.

Es coneixen, en l'actualitat, tres isoformes de MT del cranc *Callinectes sapidus*: MT1, MT2 i MTC (Taula I.4). Aquestes MTs han estat estudiades pel grup de recerca liderat pel Dr. Brouwer. La MT1 és induïble per cadmi, zinc i coure; la MT2 és induïble per cadmi i zinc; i la MTC només s'indueix per coure.<sup>92</sup>

**Taula I.4.-** MTs de *C. sapidus*.

<b>ID de la proteïna</b>	<b>Isoforma (Swiss Prot)</b>	<b>Referència</b>	<b>Estequiometria M-MT</b>	<b>Nº d'aa (Cys)</b>
P55949	MT1	48, 106, 134	Cd <sub>6</sub> MT1	59 (18)
P55950	MT2	106, 134	-	58 (18)
Q9U620	MTCU (MTC)	106, 134	-	64 (21)

La isoforma més estudiada ha estat MT1, de la qual s'ha resolt, fins i tot, l'estructura tridimensional per RMN,<sup>9</sup> tal com es mostra en la Figura I.3.b i en la Taula I.1. L'elevat grau de similitud entre MT1 i MT2 (Figura I.7) ha dut, en alguns casos, a estudiar-les conjuntament.<sup>134</sup>

Tant MT1 com MT2 segueixen el perfil general de les MTs de crustaci (Figura I.7). En canvi, MTC, es presenta com una metal·lotioneïna atípica dins aquesta família de MTs, amb una estructura primària molt allunyada a la de la resta. Un estudi filogenètic, que inclou aquesta proteïna, agrupa MTC amb les MTs de mol·lusc en lloc de fer-ho amb les de crustaci.<sup>106</sup> Aquesta marcada excepcionalitat a nivell de seqüència es podria veure reflectit en les seves propietats coordinants i funcionals, afirmació que es troba encara en vies d'estudi.

Els treballs realitzats pel Dr. Brouwer i col·laboradors sobre MTC van dirigits, en general, a comparar el comportament d'aquesta proteïna front la MT1 del mateix cranc. Ambdues isoformes són les úniques induïbles per coure en *C. sapidus*, essent aquest metall l'únic capaç d'induir l'expressió de MTC. Els estudis a partir de crancs que no han estat tractats amb metalls (crancs control), no han permès aïllar MTC degut a les baixes quantitats d'aquesta proteïna a nivell basal.<sup>90</sup>

D'acord amb els estudis del Dr. Brouwer, les isoformes MT1 i MTC presenten marcades diferències a nivell de coordinació, com ja es preveia amb l'anàlisi de les seqüències aminoacídiques. MTC mostra una afinitat superior que MT1 pels ions Cu(I),<sup>134</sup> i un major grau d'inducció quan s'exposa el cranc a coure de manera prolongada.<sup>135</sup>

És encara una incògnita quines repercussions biològiques tenen aquestes diferències observades, però estudis realitzats per M. Brouwer han permès establir diversos suggeriments. D'una banda, es proposa una participació específica de la isoforma MTC en els processos de síntesi i degradació de l'hemocianina, havent-se observat una certa correlació entre els nivells de mRNA i de proteïna entre MTC i hemocianina, en diferents estadis de la muda del cranc.<sup>92</sup> També es proposa que el procés de transferència de Cu<sup>+</sup> del complex Cu(I)-GSH a les MTs, en lloc de donar-se mitjançant el desplaçament del zinc de les ZnMTs endògenes, en aquest cas, té lloc directament amb la MTC novament sintetitzada.<sup>136</sup>

A nivell de coordinació, diversos experiments realitzats, com la determinació del contingut en grups SH i en coure, així com diverses valoracions de la proteïna,<sup>134, 136</sup> semblen apuntar a que l'estequiometria Cu/MTC és aproximadament 10:1. Malgrat haver arribat a un mateix valor en els diferents experiments realitzats, tots aquests experiments calculen l'estequiometria Cu/MTC fent una estimació errònia del nombre de Cys que conté la proteïna en la seva estructura primària. Cal tenir en compte que fins a la resolució de la seqüència de MTC l'any 2000,<sup>106</sup> es creia que el contingut en Cys d'aquesta proteïna era aproximadament 18, quan realment és 21. És per això que la determinació de l'estequiometria en les diferents referències esmentades partia d'una premissa incorrecta i caldria reajustar els resultats en funció del nombre real de cisteïnes.

En un estudi, en el qual s'indueix la síntesi de MTC tractant els crancs amb coure i cadmi simultàniament, s'observà que la proteïna aïllada podia contenir diferents relacions Cu/Cd, en funció del temps d'exposició als metalls esmentats.<sup>135</sup> Aquesta dada, a més a més de suggerir que els metalls es coordinen a aquesta MT de manera aleatòria, obre una porta a la possible participació dels ions divalents en l'estructura i/o funció de MTC.

# **Objectius**



## II. Objectius

L'objectiu principal d'aquesta tesi és l'estudi de les propietats coordinants i estructurals de la metal·lotioneïna del cranc *Callinectes sapidus*, MTC, que inclou triplets de cisteïna. Aquesta proteïna presenta, addicionalment, una estructura primària molt diferent a la de la resta de metal·lotioneïnes de crustaci. L'excel·lència de MTC ha fet que ens plantegem prendre-la com a model per determinar com influeixen en la seva capacitat coordinant i en la seva estructura aquestes peculiaritats en la seqüència aminoacídica. Per dur a terme aquest propòsit, els objectius específics que ens plantegem són:

1. Síntesi, aïllament i purificació de la metal·lotioneïna MTC mitjançant tècniques d'enginyeria genètica, introduint per primer cop aquestes metodologies en el grup de recerca de química bioinorgànica de la UAB.
2. Caracterització de les formes metal·lades de la proteïna recombinant mitjançant tècniques espectroscòpiques (CD i UV-Vis) i espectromètriques (ESI-MS), seguint la metodologia habitual en el grup de recerca, i estudis *in vitro* de la incorporació i de la substitució de metalls en MTC.
3. Posta a punt de la metodologia per obtenir formes metal·lades mitjançant reconstitució (a partir de la forma apoMTC), a fi d'evitar la coexistència de diferents estequiometries metall-MT, força habitual en aquestes metal·loproteïnes. Obtenció i caracterització de la forma totalment metal·lada amb Cd(II).
4. Anàlisi per RMN de les característiques estructurals de MTC totalment metal·lada amb  $^{113}\text{Cd(II)}$ . Estudi de la presència de dominis en la proteïna i determinació del nombre d'ions cadmi(II) presents en cadascun d'ells. Utilització, addicionalment, de pèptids sintètics, corresponents a fragments de MTC, per facilitar l'estudi estructural per RMN.

Un segon objectiu és aportar noves dades sobre la relació estructura-funció de les MTs. Per aprofundir en el mecanisme d'acció de les MTs, ens plantegem comparar el comportament de la MT-1 de mamífer amb el dels seus dominis independents, utilitzant un model de lesió traumàtica en ratolins. L'objectiu específic que ens plantegem és:

5. Anàlisi funcional de MT-1 de ratolí i dels seus fragments ( $\alpha$  i  $\beta$ ) en ratolins genoanul·lats per MT-1/MT-2, mitjançant estudis de conducta, histològics i d'expressió gènica.

### *Col·laboracions científiques*

Per dur a terme aquests objectius s'han establert un conjunt de col·laboracions, de les quals en volem fer un especial esment per la rellevància que han tingut a l'hora d'enriquir el contingut d'aquesta tesi.

Al Dr. Antonio Donaire, expert en RMN de metal·loproteïnes de la Universidad de Murcia, per dur a terme un excel·lent i exhaustiu treball que ens ha permès donar dades estructurals de la proteïna MTC a partir d'unes mostres de gran complexitat.

Al Dr. Juan Hidalgo i la Yasmina Manso, del departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia de la UAB, pels estudis funcionals dels dominis de la MT de mamífer, contribuint així a ampliar la informació sobre el paper fisiològic d'aquestes proteïnes.

Al Dr. Milan Vašák i l'Andrei Karotki del Departament de Bioquímica de la Universitat de Zürich, on vaig realitzar una estada de 15 dies per aprendre la metodologia de la reconstitució, per haver contribuït en la posta a punt d'aquestes tècniques al nostre laboratori i per la discussió dels resultats.

Els processos de síntesi i purificació de les proteïnes requereixen uns equipaments específics no disponibles en el nostre laboratori de química. Aquesta limitació s'ha resolt disposant dels equips d'altres laboratoris. Per aquest motiu volem agrair a la Dra. Roser González del departament de Genètica de la UB, al Dr. Jordi Barbé del departament de Genètica i Microbiologia de la UAB i al Dr. Juan Hidalgo del departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia de la UAB, que desinteressadament ens han permès utilitzar els seus equipaments, donant-nos tot tipus de facilitats.



# **Mètodes**



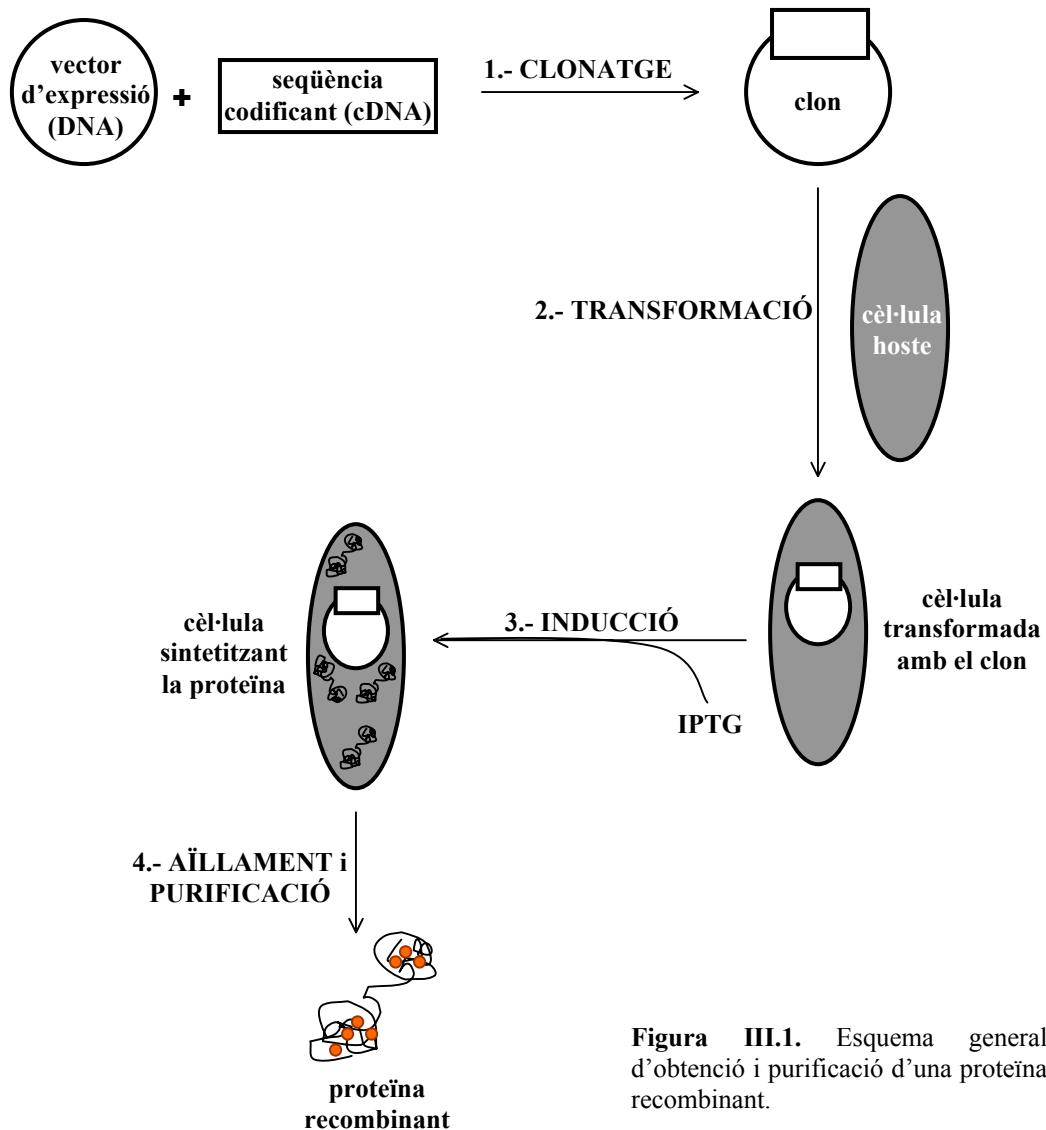
## III. Mètodes

### III.1. Tècniques d'enginyeria genètica

#### III.1.1. Terminologia i procediments generals

A fi de facilitar la comprensió de la metodologia que comporta la síntesi d'una proteïna, s'ha confeccionat l'esquema que es mostra en la Figura III.1 D'acord amb aquest esquema les etapes del procés s'han subdividit segons:

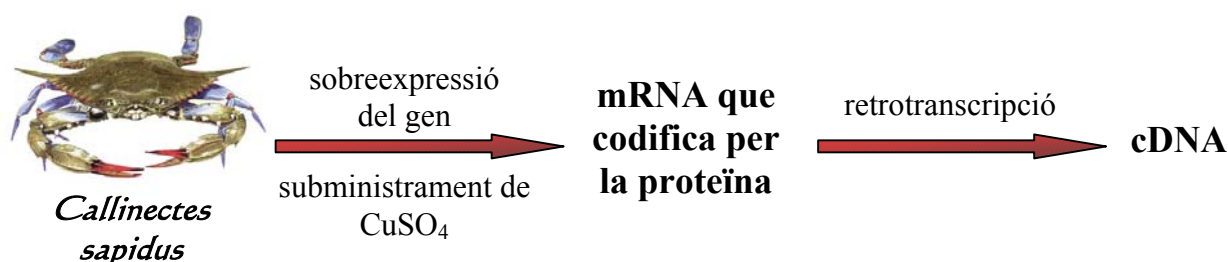
- 1.- Clonatge
- 2.- Transformació de bacteris
- 3.- Inducció de la síntesi de la proteïna
- 4.- Aïllament i purificació



**Figura III.1.** Esquema general d'obtenció i purificació d'una proteïna recombinant.

Per poder sintetitzar una proteïna recombinant és necessari disposar del seu cDNA, que n'és la regió codificant. El cDNA de la proteïna MTC es va obtenir a partir de crancs tractats amb coure, tal com s'indica en la Figura III.2, i ens va ser cedit pel Dr. M. Brouwer.

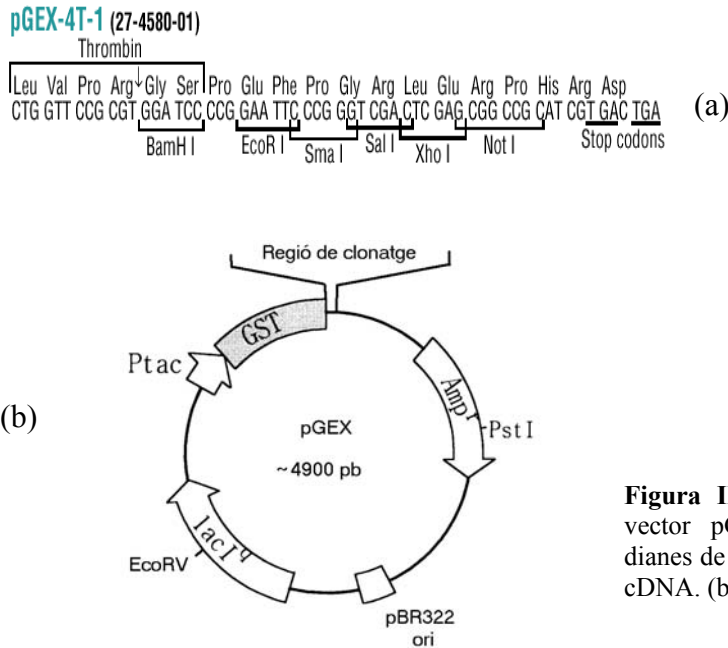
D'acord amb la Figura III.1, el primer pas en la síntesi d'una proteïna recombinant, el clonatge, consisteix en la inserció del cDNA en un vector d'expressió. Els vectors o plasmidis són molècules de DNA circular. Hi ha vectors de clonatge que s'utilitzen essencialment per manipular DNA (caracteritzar-lo i emmagatzemar-lo) i, vectors d'expressió que, en canvi, han estat dissenyats específicament per sintetitzar proteïnes.



**Figura III.2.** Esquema d'obtenció del cDNA de la proteïna MTC.

El nou clon (molècula formada pel vector més el fragment de DNA) serà introduït en les cèl·lules d'*E. coli*, mitjançant el procés anomenat transformació. Mitjançant l'addició d'un inductor específic al cultiu de les cèl·lules transformades, aquestes inicien la síntesi de proteïna. En la darrera etapa, la lisi de les cèl·lules permet l'obtenció de l'extracte proteic total, a partir del qual s'ha de procedir a la purificació de la proteïna d'interès.

Sovint els vectors d'expressió emprats són comercials i es pot escollir entre una àmplia varietat. En aquesta tesi el vector d'expressió utilitzat ha estat el vector pGEX-4T-1 (GE Healthcare), del qual es pot veure una representació gràfica en la Figura III.3.



**Figura III.3.** (a) Regió de clonatge del vector pGEX-4T-1, on es mostren les dianes de restricció, per on es pot inserir el cDNA. (b) Vector d'expressió pGEX.

Aquest vector conté un conjunt d'elements, alguns dels quals són comuns per a tots els vectors d'expressió. D'aquests elements que caracteritzen pGEX-4T-1 cal destacar:

- ✓ Un gen que confereix resistència a l'antibiòtic ampicil·lina ( $Amp^r$ ). Aquesta seqüència codifica per l'enzim  $\beta$ -lactamasa que degrada l'ampicil·lina hidrolitzant els seus anells  $\beta$ -lactàmics. Aquesta propietat ofereix un avantatge als bacteris que han incorporat el vector, ja que poden créixer de forma selectiva en un medi de cultiu on s'ha afegit aquest antibiòtic i on no es podran desenvolupar els bacteris que no continguin el vector.
- ✓ Un origen de replicació (ori, pBR322) que permet la replicació del plasmidi o vector de forma independent respecte al cromosoma de la cèl·lula hoste.
- ✓ Un promotor (Ptac), seqüència on s'unirà la RNA polimerasa per iniciar la transcripció del DNA a RNA, el qual serà traduït posteriorment a proteïna.
- ✓ Un gen ( $LacI^q$ ) que codifica per un inhibidor. Aquest inhibidor s'uneix al promotor evitant l'expressió de la proteïna en absència de l'inductor isopropil- $\beta$ -D-tio-galactòsid, IPTG. En condicions d'inducció, una molècula d'IPTG s'unirà a l'inhibidor deixant lliure el promotor i així s'iniciarà la transcripció dels gens que es troben a continuació.

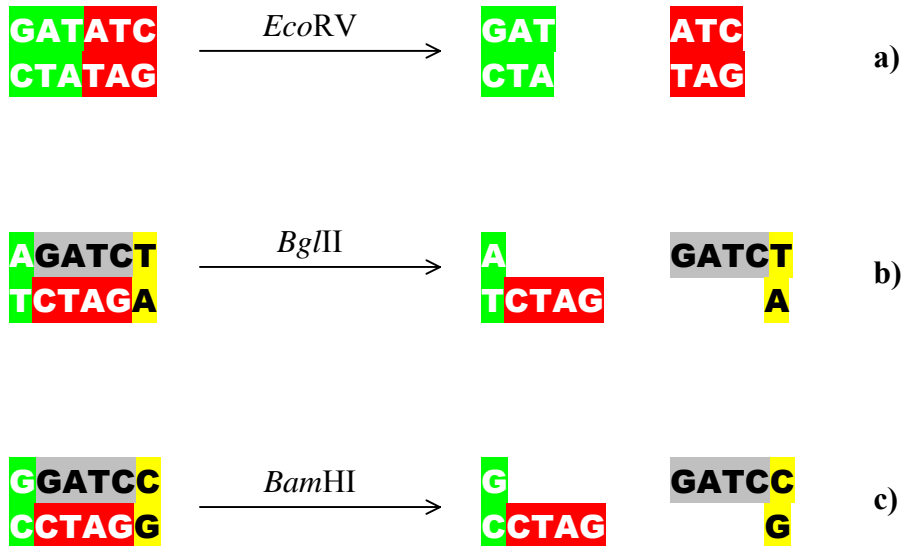
- ✓ Una seqüència que codifica per la proteïna glutatió S-transferasa (GST), situada entre la regió promotora i la de clonatge, la qual cosa permetrà que la GST sigui sintetitzada conjuntament amb la proteïna que es vol expressar, de manera que el polipèptid resultant sigui la proteïna de fusió formada per la GST i la proteïna d'interès. Aquesta síntesi conjunta de dues proteïnes confereix unes propietats a la proteïna recombinant que seran comentades posteriorment.
- ✓ Una regió de clonatge (Figura III.3.a). Aquesta regió del vector conté un conjunt de seqüències reconegudes específicament pels enzims de restricció (dianes de restricció) que permetran tallar el vector i clonar-hi el fragment de DNA que codifica per la proteïna.
- ✓ Una seqüència inclosa en la regió de clonatge, que codifica pels aminoàcids LVPRGS, hexapèptid que és reconegut específicament per la proteinasa trombina. L'enzim trombina talla la cadena polipeptídica en aquesta seqüència, situada entre les dues proteïnes que formen la proteïna de fusió. Això permet la separació de la GST i la proteïna en estudi, facilitant l'aïllament d'aquesta darrera.

En la Tesi de la Dra. Neus Cols <sup>137</sup> es van fer diversos intents per expressar metal·lotioneïnes a partir d'altres vectors d'expressió, els millors resultats, però, s'obtingueren pel vector pGEX-4T-1, que ofereix una sèrie d'avantatges:

- La proteïna a sintetitzar esdevé més estable. Hi ha casos en què la proteïna és molt petita, com és el cas de les MTs, i és fàcilment degradada per les proteases del bacteri. Sintetitzar-la com a proteïna de fusió li confereix major resistència a la hidròlisi.
- Simplificació de la purificació. Tot i que en la cèl·lula on s'obté la proteïna aquesta es veu significativament sobreexpressada, en el citoplasma hi ha presents totes les proteïnes pròpies del bacteri. Per tant, s'ha de dur a terme la purificació de la proteïna d'interès. Això es veu facilitat per l'afinitat de la GST pel seu substrat natural, el glutatió. Així, mitjançant cromatografia d'afinitat, es purificaran les molècules GST-MT.
- La posterior digestió mitjançant trombina permetrà la separació de la GST i s'obtindrà la MT independent.

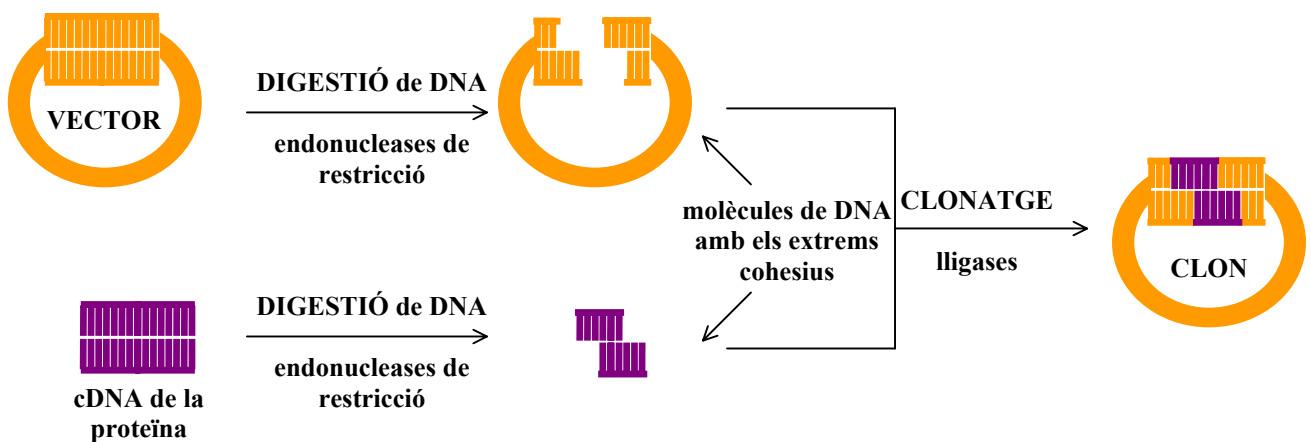
**1.- CLONATGE.** Per obtenir la construcció formada pel vector d'expressió i el cDNA, és necessari digerir ambdós mitjançant enzims de restricció. Aquests enzims són unes proteïnes que tallen el DNA en un punt en concret d'una seqüència, generalment d'entre 4 i 8 parells de bases, que reconeixen específicament (Figura III.4).

El descobriment de les endonucleases de restricció o enzims de restricció va esdevenir un dels més grans avenços en les tècniques del DNA recombinant. Els



**Figura III.4.** Representació del tall en el DNA que efectuen els enzims de restricció *EcoRV* (a), *BglII* (b) i *BamHI* (c). És pot observar com en el primer cas els fragments de restricció resultants tenen els extrems roms. En els altres dos casos els fragments resultants tenen els extrems protuberants. Els enzims *BglII* i *BamHI* produeixen extrems compatibles entre ells.

productes de digestió generats amb un mateix enzim poden unir-se encara que procedeixin de DNAs diferents. Fins i tot, en alguns casos, tallant amb enzims de restricció diferents, els fragments generats poden ser compatibles (Figura III.4.b i III.1.4.c). La digestió del cDNA i del vector d'expressió amb els mateixos enzims o amb enzims que generen fragments compatibles permet la unió d'aquests mitjançant lligases (Figura III.5), un tipus d'enzim responsable de realitzar l'enllaç fosfodièster.

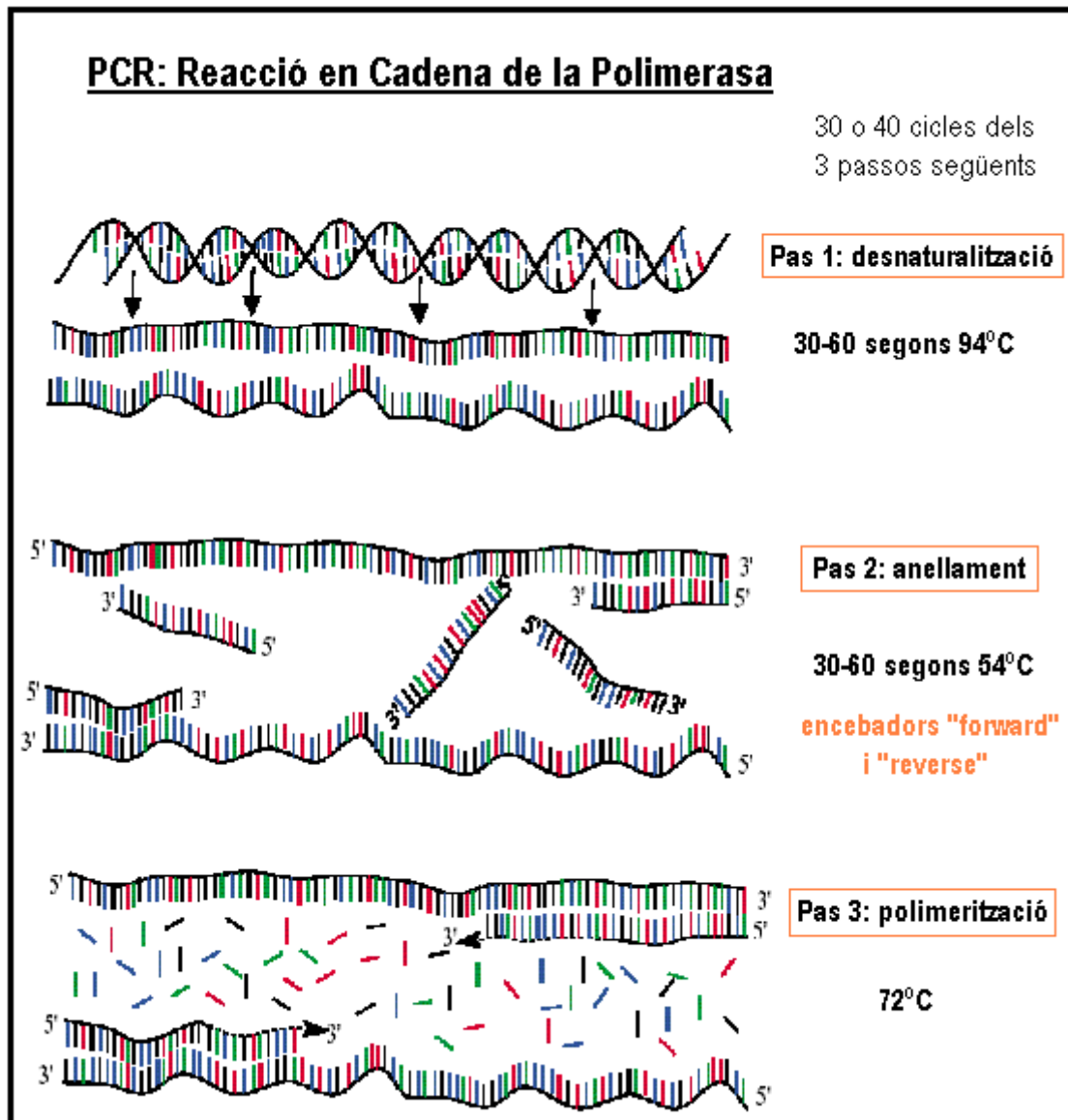


**Figura III.5.** Obtenció d'un clon a partir dels fragments de restricció resultants de la digestió d'un vector i el gen d'una proteïna. La molècula de DNA que en aquest esquema s'anomena com cDNA realment fa referència al cDNA modificat amb unes dianes de restricció afegides als seus extrems.

No sempre el fragment de DNA a clonar conté les dianes de restricció que permeten la lligació amb el vector. En aquests casos és necessari introduir al cDNA les dianes desitjades. Una tècnica molt utilitzada per tal de dur a terme aquest procés és l'anomenada reacció en cadena de la polimerasa, PCR.

Aquesta tècnica permet obtenir, en un tub d'assaig, un gran nombre de còpies d'un fragment específic de DNA. A partir de dues seqüències de nucleòtids (encebadors o *primers*) molt curtes, entre 20-25 bases, complementàries a cada extrem del fragment de DNA a amplificar, i mitjançant l'addició d'una barreja de nucleòtids i d'una polimerasa termoestable, es produeix la còpia de cada cadena (Figura III.6). Aprofitant aquesta tècnica, en les seqüències dels encebadors es poden introduir els nucleòtids corresponents a la diana de restricció que interressi, de manera que totes les noves còpies de DNA portaran les dianes de restricció a ambdós extrems del fragment de DNA.





**Figura III.6.** Esquema de la reacció en cadena de la polimerasa (PCR). Aquest procés s'ha utilitzat en aquest treball per tal d'obtenir un gran nombre de còpies del cDNA de la MTC, en els extrems del qual, es van introduir les dianes de restricció adjents que permeteren inserir-lo en el vector d'expressió.

La reacció en cadena de la polimerasa inclou els següents passos:

- ✓ Desnaturalització: A 94 °C el DNA es desnaturalitza, de manera que les dues cadenes se separen.
- ✓ Anellament: A una temperatura òptima, que sol oscil·lar entre els 45-55 °C, té lloc l'aparellament dels encebadors a la seqüència complementària de cada cadena a amplificar.
- ✓ Polimerització: A 72 °C la polimerasa va incorporant cada nucleòtid a la seqüència dels encebadors copiant la cadena motlle, introduint els nucleòtids complementaris.

Els dos primers passos es donen en un temps d'entre 30 i 60 segons, i el tercer depèn de la llargària del fragment a amplificar. Aquests tres processos es realitzen en uns aparells anomenats termocicladors que poden ser programats a diferents temperatures i temps de reacció, així com el nombre de cicles que es vol realitzar. Partint d'una doble cadena de DNA, després de 30 cicles, s'obtindrien  $21 \times 10^8$  còpies de DNA.

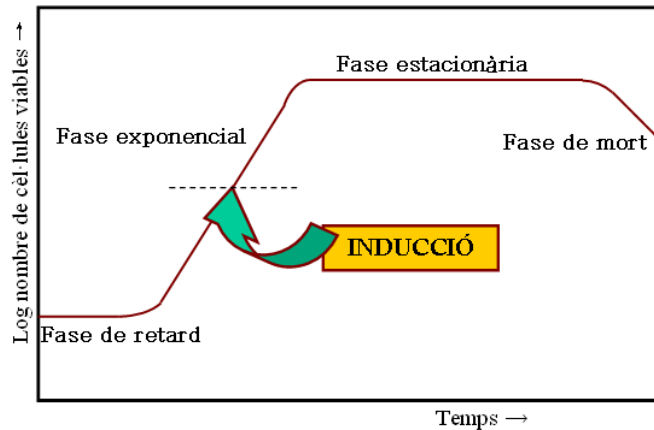
Un cop es disposa del cDNA amplificat amb les dianes adients, introduïdes als seus extrems, cal procedir a la digestió d'aquesta molècula i del vector d'expressió amb els esmentats enzims de restricció (Figura III.5), a fi de generar els extrems compatibles i, així, fer possible la seva lligació per generar el clon.

**2.- TRANSFORMACIÓ.** La transformació consisteix en la introducció de DNA exogen a l'interior d'una cèl·lula. En bacteris, el DNA ha de travessar la membrana i la paret, per tant s'ha de fer un tractament previ dels bacteris per minimitzar la barrera física que impedeix la seva entrada. Actualment és ben conegut que el tractament dels bacteris amb  $\text{CaCl}_2$  facilita la introducció de DNA exogen. Altres cations que també s'utilitzen amb aquest propòsit són  $\text{K}^+$ ,  $\text{Rb}^+$  o  $\text{Mn}^{2+}$ .<sup>138</sup>

Tot i que la metodologia és aparentment senzilla, el procés de transformació no és tant simple. Un gran nombre de les molècules inicials de DNA es perden en el procés, ja que no són introduïdes en els bacteris. Això fa que aquest sigui un procés poc eficient. Malgrat aquesta baixa eficiència, només amb una cèl·lula transformada ja es pot obtenir una colònia que contindrà un elevat nombre de cèl·lules transformades.

**3.- INDUCCIÓ.** En el procés d'obtenció de la proteïna recombinant cal preparar inicialment un cultiu de cèl·lules transformades, que no iniciaran la síntesi de la proteïna si no s'afegeix al medi de cultiu l'inductor precís. La naturalesa de l'inductor ve determinada pel tipus de promotor que conté el vector d'expressió.

Les cèl·lules s'indueixen quan el cultiu es troba en la fase de creixement exponencial, etapa en la qual la densitat òptica ( $\text{OD}_{550}$ ) es troba en l'interval 0.9-1.0 (Figura III.7). Aquest és el punt òptim per la inducció de la síntesi de la proteïna, ja que representa l'equilibri entre l'inici del creixement bacterià, on encara hi ha poques cèl·lules en el cultiu, i la fase estacionària, quan els nutrients en el medi de cultiu s'esgoten, els bacteris ja no es divideixen i es moren.



**Figura III.7.** Creixement exponencial d'un cultiu bacterià. S'indica amb una fletxa el moment òptim per induir la síntesi de la proteïna recombinant.

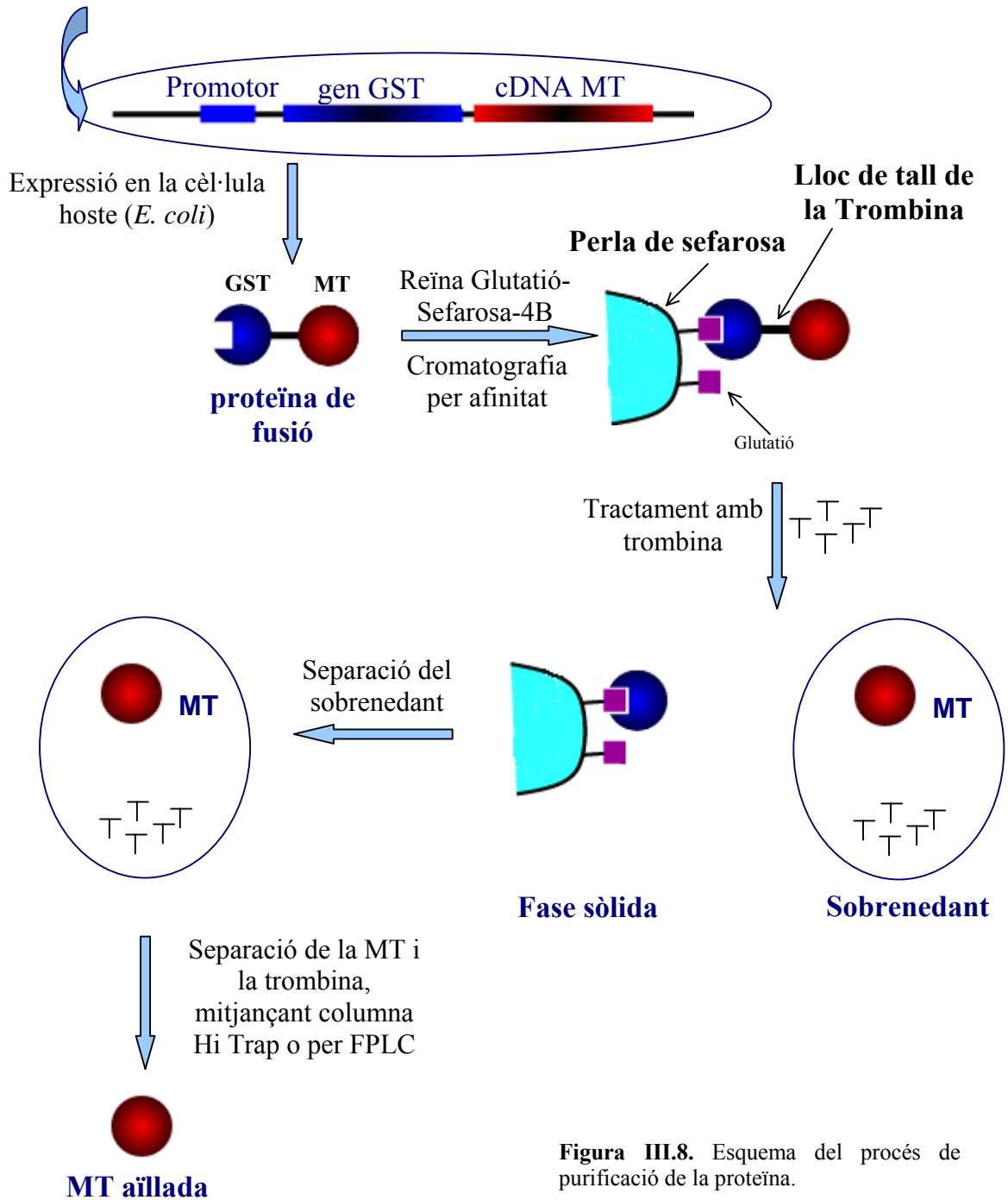
En la síntesi de MTs, l'addició d'un excés d'un determinat ió metàl·lic en el medi de cultiu facilita l'obtenció de la proteïna metal·lada, generalment, amb aquest metall. Aquesta addició no es fa a terme en el mateix moment d'afegir l'inductor, sinó que es deixa transcórrer un període de temps que permeti que s'iniciï la síntesi de la proteïna recombinant.

**4.- PURIFICACIÓ.** L'aïllament de la proteïna recombinant requereix la lisi de les cèl·lules, per a obtenir l'extracte proteic total. Habitualment aquest procés es realitza mitjançant freqüències d'ultrasons, generades amb un sonicador. Mitjançant centrifugació es separa l'extracte proteic soluble de les restes bacterianes. La proteïna recombinant sintetitzada per la cèl·lula hoste s'ha de purificar de la resta de proteïnes pròpies del bacteri. Si la proteïna recombinant s'ha obtingut en forma de proteïna de fusió amb GST, aleshores, l'extracte cel·lular es mescla amb una reïna que conté glutatió, molècula que té afinitat específica per la GST (Figura III.8). La reïna enllaça selectivament la proteïna de fusió i en permet la separació de la resta de proteïnes.

L'aïllament final d'una proteïna recombinant obtinguda com a proteïna de fusió amb la GST requereix d'un pas addicional, que consisteix en la separació de les dues proteïnes. L'addició de trombina permet trencar l'enllaç entre la GST i la proteïna d'interès. La GST es mantindrà unida a la reïna, mentre que la proteïna recombinant s'allibera i queda en solució.

El darrer pas de purificació consisteix en separar la trombina. Aquest procés es pot dur a terme mitjançant cromatografia per afinitat amb una reïna específica per la trombina o mitjançant cromatografia d'exclusió.

**REGIÓ DEL CLON**



**Figura III.8.** Esquema del procés de purificació de la proteïna.

### III.1.2. Protocols

En aquest apartat s'inclouen els procediments seguits en aquest treball, amb les modificacions que han estat necessàries per adaptar els protocols estàndards,<sup>139</sup> a aquest cas en concret.

#### *Transformació de bacteris competents*

- es descongela una alíquota de cèl·lules competents, en gel
- es barregen 40-100 ng de DNA i 40 µl de bacteris competents
- es manté la mescla en gel durant 20 minuts
- s'incuba a 42 °C durant 2.5 min
- s'hi afegeixen 200 µl de LB estèril, escalfat prèviament a 37 °C
- s'incuba el tub durant 1 hora a 37 °C
- es plaqueja tot el volum en plaques de Petri amb medi LB suplementat amb ampicil·lina<sup>†</sup> (1.2 % de bacto-agar, Difco)
- s'incuben les plaques tota la nit a 37 °C

El medi *Lauria Broth*, LB, s'obté mitjançant la dissolució en H<sub>2</sub>O destil·lada dels següents components:

- 1 % NaCl
- 0.5 % d'extracte de llevat
- 1 % de bactotripton

El pH de la solució final s'ajusta a 7.2 – 7.4 amb NaOH

#### *Transformació de cèl·lules BL21 CodonPlus*

El protocol seguit per transformar les cèl·lules *CodonPlus* és equivalent a l'exposat anteriorment, per bacteris competents, amb les modificacions indicades pel subministrador.

---

<sup>†</sup> El plasmidi utilitzat per transformar la soca d'*E. coli* li confereix resistència a l'antibiòtic ampicil·lina, d'aquesta manera s'aconsegueix dificultar el desenvolupament de colònies de bacteris que no continguin pGEX-MTC.

### ***Minipreparació de DNA plasmídic***

- es posa 1.5 ml del cultiu bacterià en un tub *Eppendorf* i es centrifuga durant 20 segons en una microcentrífuga
- es descarta totalment el sobrenedant i es resuspèn el precipitat bacterià, barrejant-ho amb l'ajuda del vòrtex
- s'afegeix 400 µl de tampó TENS, i es barreja amb el vòrtex (10 segons)
- s'afegeix 200 µl de NaOAc 3 M i pH 5.2, barrejant-ho bé mitjançant inversió dels tubs. Es centrifuga durant 10 minuts en una microcentrífuga
- es passa el sobrenedant a un tub nou i s'hi afegeix 1 ml d'etanol absolut. Es barreja amb vòrtex (10 segons)
- es centrifuga durant 5 minuts en una microcentrífuga. Es descarta el sobrenedant i s'afegeixen 500 µl d'etanol al 70 %. S'inverteix el tub un parell de cops. Es centrifuga 2 minuts. Es descarta el sobrenedant utilitzant una pipeta, de manera que no quedin restes d'etanol. Es deixa assecar el precipitat a 65 °C 10 minuts amb el tub obert
- es resuspèn el precipitat en 50 µl de TE + RNAsa A (5 µg/ml final). S'incuba 5 minuts a 65 °C amb el tub tancat

### **Solució TE, pH 8:**

- 10 mM Tris-HCl
- 1 mM EDTA

### **Solució TENS, pH 8:**

- Tampó TE
- 0.5 % SDS
- 0.1 N NaOH

### ***PCR (Reacció en Cadena de la Polimerasa)***

Les raccions s'han dut a terme en un volum final de 100 µl, enrassant amb H<sub>2</sub>O.

Els elements necessaris per aquesta reacció són:

- DNA motlle (2 µl)
- dNTPs a una concentració final de 200 µM
- tampó corresponent a l'enzim utilitzat

- MgCl<sub>2</sub> amb una concentració final de 1.5 mM
- DNA polimerasa termoestable (en aquest cas Pwo Pol, que presenta activitat correctora). 1 Unitat
- Encebadors (*forward* i *reverse*) 20 pmols de cada encebador

Les condicions d'amplificació van ser les següents:

- 2 minuts inicials a 94 °C
- 30 cicles que contenen les següents etapes:
  - etapa de desnaturalització (30 segons a 94 °C)
  - etapa d'anellament (60 segons a 54 °C)
  - etapa d'elongació de la cadena (30 segons a 72 °C)
- 3 minuts a la temperatura d'elongació (72 °C)
- aturada de la reacció (4 °C)

L'equip utilitzat per dur a terme aquest procés ha estat un termociclador MiniCycler de MJ Research (Ecogen).

#### ***Digestió d'un fragment de DNA amb enzims de restricció***

Les digestions del producte de PCR i del vector es van realitzar a un volum final de 50 i 20 µl. La mescla de reacció per cada cas constava de:

##### **Digestió del cDNA:**

- 40 µl DNA (producte de la PCR)
- 5 µl tampó (l'indicat pels enzims que s'utilitzen)
- 2.5 µl *Bgl*II
- 2.5 µl *Eco*RI

##### **Digestió del vector:**

- 1 µl DNA (vector pGEX)
- 2 µl tampó (l'indicat pels enzims que s'utilitzen)
- 15 µl d'H<sub>2</sub>O estèril
- 1 µl *Bam*HI
- 1 µl *Eco*RI

És important que el volum d'enzim de restricció no sigui superior al 10 % del volum final de la reacció, ja que un excés d'enzim pot fer que aquest reconegui unes seqüències de DNA que no són les específiques de la diana de restricció.

Per tal de dur a terme les digestions amb enzims de restricció es mescla el DNA a digerir amb els enzims de restricció i tampó corresponents, i es deixa incubar durant 1-1.5 hores, a 37 °C.

### ***Precipitació del DNA***

- s'afegeixen 0.1 volums de NaOAc 3 M i pH 5.2 i 2 volums d'etanol absolut, al DNA a precipitar
- es deixa 30 minuts a -20 °C i a continuació es centrifuga en una microcentrífuga durant 30 minuts
- es descarta amb pipeta les restes d'etanol i es deixa assecar el precipitat a 65 °C durant 10 minuts
- es resuspèn el DNA precipitat amb 5 µl de TE

### ***Lligació***

Es va utilitzar el kit de lligació de Takara.

- s'afegeixen 5 µl de solució que conté l'enzim lligasa als 5 µl corresponents al DNA precipitat. La reacció es du a terme a 16 °C durant unes 16 hores

### ***Expressió de la MTC***

S'ha utilitzat una metodologia equivalent, tant en els casos en els quals es pretenia confirmar la síntesi de la proteïna (cultius de 3 ml), com en els casos on l'objectiu era la purificació i caracterització de la proteïna recombinant (1 – 2 litres de cultiu), amb l'escalat necessari.

- es realitza un inòcul en LB estèril amb ampicil·lina (100 µg/ml) i es posa a créixer a 37 °C i en agitació a 250 rpm, durant tota la nit. El volum d'aquest precultiu dependrà del volum del cultiu final
- es fa una dilució 1/10 del precultiu en el volum final de LB estèril amb ampicil·lina (i 50 µg/ml de cloranfenicol si les cèl·lules són *CodonPlus*)
- es deixa créixer el cultius a 37 °C i en agitació fins que la densitat òptica sigui  $DO_{600} \sim 0.9$
- s'indueix el cultiu amb 0.1 mM d'IPTG i es deixa créixer 3 hores més
- en els casos en els que s'ha de suplementar el medi amb metalls, aquests s'han addicionat 30 minuts després de la inducció. Per una suplementació



amb zinc s'afegeix  $ZnCl_2$  fins a 0.3 mM i per una suplementació amb coure s'addiciona  $CuSO_4$  fins a 0.5 mM. Les síntesis destinades a obtenir apoMTC s'addiciona el zinc 60 – 90 minuts després de la inducció

- es centrifuga el cultiu durant 10 min a 7700 g i 4 °C
- es resuspen el sediment bacterià amb 50 µl de PBS fred (veure composició al final) per litre de cultiu, amb un 0.5 % de β-mercaptoetanol
- es sonica la suspensió, amb la sonda adequada, per tal de lisar les cèl·lules i així recuperar l'extracte proteic, que quedarà en dissolució. Es manté la suspensió en gel durant la sonicació, per evitar-ne l'escalfament i la conseqüent desnaturalització de la mostra. Pel mateix motiu, s'evita la formació d'escuma. Les condicions de sonicat s'han modificat en funció de la sonda, l'aparell emprat i el volum de mostra. La metodologia general ha estat sonicació per polsos curts (1 – 5 s), durant 1 – 4 minuts/25 ml de mostra
- per recuperar l'extracte proteic soluble es centrifuga la mostra sonicada durant 10 – 15 min a 12000 g i 4 °C i es recull el sobrenedant
- s'analitza l'extracte proteic mitjançant SDS-PAGE

### **PBS 10x:**

- 1.4 M NaCl
- 27 mM KCl
- 101 mM  $Na_2HPO_4$
- 18 mM  $KH_2PO_4$

El pH de la solució final, diluïda 10 cops és ~ 7.3.

### ***Purificació de la MTC***

- la reïna Glutatió-Sepharosa-4B (*Bulk GST purification modul*, GE Healthcare), preparada segons les indicacions del subministrador per a una purificació en suspensió, s'addiciona al sobrenedant recollit del procés de sonicació i es deixa durant 30 min a temperatura ambient i en agitació, per facilitar la interacció de la matriu amb la GST
- es centrifuga durant 5 min a 500 g i 4 °C, s'extreu el sobrenedant i es realitzen successius rentats de la reïna amb PBS per eliminar proteïnes inespecífiques que han quedat retingudes

- s'addicionen 50-100  $\mu\text{l}$  de trombina (1 unitat/ $\mu\text{l}$ ), preparada segons les indicacions del subministrador. Es deixa incubar aproximadament durant 12 hores a 23-25  $^{\circ}\text{C}$
- es centrifuga la mostra incubada amb la trombina, per tal de separar la proteïna en solució de la reïna, i es recupera el sobrenedant. Es realitzen diversos rentats amb 500-1000  $\mu\text{l}$  de PBS, per recollir totalment la proteïna alliberada en la digestió
- es purifica la proteïna per FPLC, en una columna Superdex-75 HR. L'equip utilitzat ha estat un *ÄKTA Purifier* de GE Healthcare
- Per reduir el número d'aplicacions en FPLC la solució de proteïna es concentra prèviament fins a obtenir un volum d'uns 500  $\mu\text{l}$  fent ús dels concentradors Centriprep (Amicon), amb un límit de membrana, NMWL, de 3000 Da. Les condicions de la purificació han estat: flux 0.5 ml/min, fase mòbil Tris-HCl 10 – 50 mM pH 7
- es recullen fraccions d'uns 500  $\mu\text{l}$  i s'analitza la seva absorbància a 254 nm, on es poden observar les bandes de transferència de càrrega del lligand metall, i a 215 nm, per tal de seguir la transició  $n \rightarrow \pi^*$ , corresponent al grup carbonil. També s'estudia el contingut de proteïna d'aquestes fraccions per electroforesi SDS-PAGE. S'ajunten aquelles fraccions que presenten un màxim contingut en proteïna, se'n fan alíquotes i es guarden a  $-80^{\circ}\text{C}$  per a la posterior quantificació i caracterització

### ***Electroforesi de proteïnes SDS-PAGE***

L'aparell d'electroforesi emprat ha estat el Mini-PROTEAN 3 Cell (BioRad). Les mostres han estat tractades amb tampó de càrrega *Zymogram Sample Buffer* (BioRad, 62.5 mM Tris-HCl, pH 6.8, 25% glycerol, 4% SDS, 0.01% Bromophenol Blue) amb 10 % de  $\beta$ -mercaptoetanol, i s'han incubat durant 5 minuts a 95  $^{\circ}\text{C}$ . El volum de mostra aplicat en els gels ha estat de 15 – 20  $\mu\text{l}$  i s'ha emprat el marcador de mida *Precision Plus Protein Unstained Standards* (BioRad). Les electroforesis s'han dut a terme en tampó Tris-glicina, a un voltatge constant de 200 V fins a la completa migració del front, i s'ha procedit a la seva tinció. Les solucions i gels emprats tenen la següent composició:

**GEL CONCENTRADOR (4 %)**

- 4 % acrilamida/bisacrilamida, 29:1 (BioRad)
- 25 % Tris-HCl 0.5 M, pH 6.8
- 63 % H<sub>2</sub>O miliQ
- 0.1 % SDS (BioRad)
- 0.1 % TEMED, N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina (BioRad)
- 0.1 % APS (BioRad)

**GEL SEPARADOR(12.5 %)**

- 12.5 % acrilamida/bisacrilamida, 29:1
- 25 % Tris-HCl 1.5 M, pH 8.8
- 41.6 % H<sub>2</sub>O miliQ
- 0.1 % SDS
- 0.1 % TEMED
- 0.1 % APS

**TAMPÓ D'ELECTROFORESI**

- Tampó Tris-glicina (Tris HCl 25 mM, glicina 192 mM) pH 8.3
- 0.1 % SDS

**SOLUCIÓ DE FIXACIÓ-TINCIÓ**

- 7 % d'àcid acètic (99,7 %, Aldrich)
- 50 % de metanol
- 0.1 % (w/v) de Blau de Coomassie R-250 (Fluka)
- 43 % H<sub>2</sub>O destil·lada

**SOLUCIÓ DE DESTINCIÓ**

- 7 % d'àcid acètic
- 20 % de metanol
- 73 % H<sub>2</sub>O destil·lada

### III.2. Tècniques de caracterització d'apoMT i dels agregats metall-MT

El primer pas a l'hora de caracteritzar la MT obtinguda per tècniques recombinants és comprovar la integritat de la cadena peptídica. L'enregistrament de l'espectre de masses de la proteïna per ESI-MS, a pH àcid, permet la determinació del pes molecular de l'apoMT i per tant ens confirma la seva integritat.

Els següents passos a realitzar són la determinació, mitjançant ESI-MS, del nombre i estequiometria de les diferents espècies metal·lades metall-MT; la mesura de la concentració de la proteïna i de la relació global metall/proteïna, via la determinació del sofre total, zinc, cadmi i coure per ICP-AES; l'estudi del plegament de la proteïna per dicromisme circular; la determinació de les absorcions en l'UV i l'avaluació del grau d'oxidació mitjançant la reacció amb 2,2'-ditiopiridina, DTP. A continuació es resumeixen els principis bàsics relatius a les tècniques utilitzades per la caracterització de la proteïna.

#### *Espectrometria de masses amb ionització per electroesprai (ESI-MS)*

L'espectrometria de masses amb ionització per electroesprai és una de les tècniques analítiques més utilitzades, i amb major expansió, en l'estudi de biomolècules. La característica que distingeix la ionització per electroesprai de les altres tècniques d'ionització consisteix en la formació d'ions amb càrrega múltiple a partir d'espècies de molt elevat pes molecular, sense provocar la seva fragmentació i aconseguint que la càrrega de l'espècie sigui proporcional a la seva grandària. Com a resultat, els ions moleculars altament carregats tenen una relació  $m/z$  adequada per la seva detecció en un espectròmetre convencional.

En ESI-MS, el primer pas consisteix en la creació d'un aerosol de microgotes en presència d'un camp elèctric fort (1-5 kV), en condicions de pressió i temperatura ambient, a partir del flux constant a través d'un tub capil·lar de la solució que conté l'analit. A continuació, les microgotes altament carregades perden les molècules de solvent i esdevenen encara més petites. Un conjunt de cons selectius (*skimmers*) i de lents permet orientar la trajectòria dels ions a l'entrada de l'espectròmetre de masses, dins del qual, freqüentment, la trajectòria dels ions es controla mitjançant un filtre de masses de tipus quadrupolar.<sup>140, 141</sup>

Els espectres de masses s'han realitzat en mode electroesprai positiu, en tres equips diferents:

- ✓ Espectròmetre de masses *Micromass Platform II*, amb ionització per electroesprai
- ✓ Espectròmetre de masses *ESI-Q-ToF Global* de Micromass
- ✓ Espectròmetre de masses *MicroToF-Q* de Bruker, amb ionització ESI

Tots tres equips s'han utilitzat amb acoblament a una bomba d'HPLC, amb injecció manual. Les condicions experimentals a les quals s'han enregistrat els espectres es detallen a continuació:

Volum de mostra:	10 – 20 µl
Tampó:	NH <sub>4</sub> Ac 15 mM, CH <sub>3</sub> CN (5 %)
Flux:	40 µl/min
Tub de <i>peek</i> :	1.5 m, 0.18 mm de diàmetre intern
Fase mòbil:	H <sub>2</sub> O/CH <sub>3</sub> CN (95/5)
Potencial de capil·lar:	5000 V
Temperatura de la font:	100 °C

El tractament dels espectres s'ha realitzat mitjançant el programa informàtic MassLynx 3.5, de Micromass, i Bruker Daltonics Data analysis 3.4.

### ***Espectroscòpia d'emissió atòmica de plasma acoblat per inducció, ICP-AES***

L'anàlisi per ICP-AES d'una MT permet determinar-ne simultàniament el contingut total de metalls (Zn, Cd i Cu, en el nostre cas) i de sofre. El contingut en sofre d'aquestes mostres inclou tant el S cisteínic (tiols reduïts, SH, i tiols en forma de disulfur, S-S), com el S de les metionines. La mesura del contingut total en sofre permet calcular la seva concentració total en solució, coneixent l'estructura primària de la proteïna, i el grau d'oxidació de la MT, tenint en compte les dades obtingudes en la reacció amb DTP relatives al nombre de tiols reduïts.

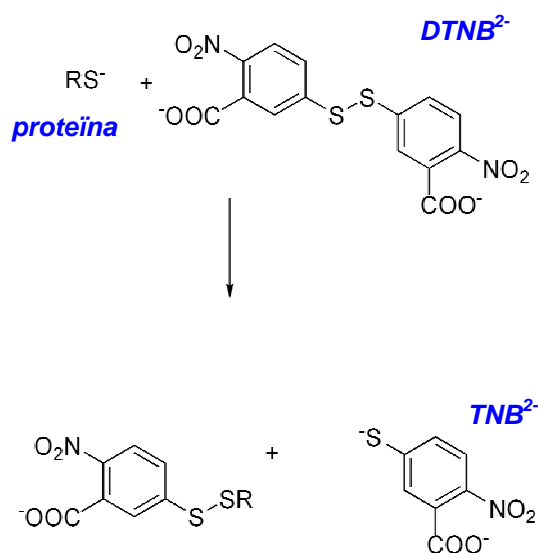
L'anàlisi del contingut en S, Zn, Cu i Cd de les mostres proteiques es realitza, com a mínim, per duplicat per a cada mostra. Totes les mostres es preparen prenent entre 100 i 500 µl de proteïna i s'enrasa amb aigua miliQ en matrassos aforats de 2 o 5 ml, amb un 2 % d'HNO<sub>3</sub> concentrat. Les rectes de calibrat dels quatre elements es realitzen mitjançant la preparació de patrons de diferent concentració a partir de patrons estandarditzats de concentració 1000 ppm.

L'equip utilitzat per realitzar aquests anàlisis ha estat un espectròmetre ICP, *Thermo Jarell Ash*, model *Polyscan 61E*.

### **Reacció de determinació de grups tiol reduïts**

La determinació del grau d'oxidació de les metal·lotioneïnes, excepte les que contenen Cu(I), es duu a terme, en general, mitjançant el mètode d'Ellman,<sup>142</sup> o bé mitjançant la reacció amb DTP.

El mètode d'Ellman es basa en la reacció de la metal·lotioneïna amb l'anió 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoat), DTNB<sup>2-</sup>, que permet determinar la concentració de grups tiolat (RS<sup>-</sup>) en proteïnes que contenen residus cisteïnics.



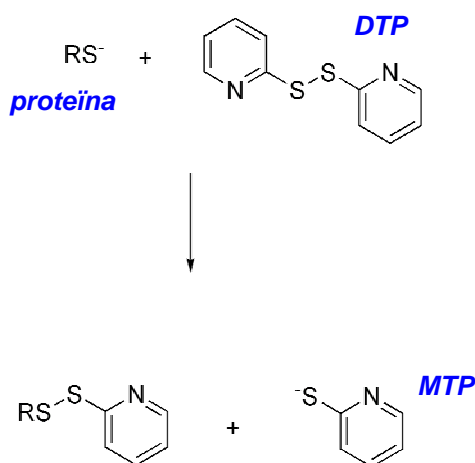
El DTNB<sup>2-</sup> es redueix en presència de les cisteïnes de la MT per donar lloc a l'anió 5-tio-2-nitrobenzoat, TNB<sup>2-</sup>, que presenta un màxim d'absorció a 412 nm (420 nm, en presència de clorur de guanidini), en una reacció 1:1 amb els grups RS<sup>-</sup>. La concentració dels grups tiolat ([RS<sup>-</sup>]<sub>0</sub>) es determina mitjançant l'expressió  $\Delta A_{420} = \epsilon_{\text{TNB}} [\text{RS}^-]_0$ ,<sup>143</sup> tenint en compte que  $\epsilon_{\text{TNB}} (420 \text{ nm}) = 13600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ , en el medi de reacció.<sup>144</sup>

Es prepara, fora de la caixa de guants, una solució de clorur de guanidini 3 M i EDTA 1 mM, tamponada amb Tris-HCl 0.3 M. Per obtenir aquesta solució es dissolen els mg necessaris de Tris amb H<sub>2</sub>O miliQ, s'hi addiciona 1/100 del volum final d'una solució d'EDTA 0.1 M (estandarditzada), s'ajusta el pH a 8 i s'enrassa al volum final en un matràs aforat. Seguidament es dissol la quantitat necessària de clorur de guanidini amb aquesta solució tampó per assolir una concentració de 3 M en clorur de guanidini.

Es desgasa la solució resultant en un *schlenk*, a la línia de buit, mitjançant 3 cicles de buit-congelació en nitrogen líquid.

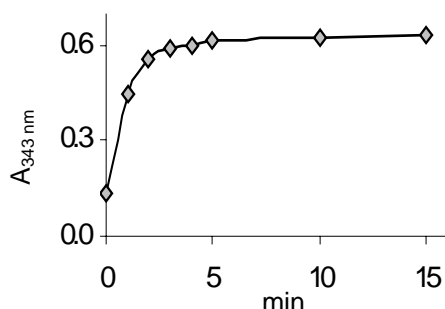
En recipients independents es pesen alíquotes de DTNB<sup>2-</sup> per preparar diverses solucions de 10 ml, 0.3 mM en DTNB<sup>2-</sup>. Aquestes solucions es preparen a l'interior de la caixa de guants, just abans de ser utilitzades, per minimitzar la degradació del DTNB<sup>2-</sup> amb la llum. Es dissol una alíquota de DTNB<sup>2-</sup> amb la solució de clorur de guanidini abans esmentada i es fa reaccionar amb 40 – 100 µl de proteïna, enrassant fins a 2 ml amb la solució de DTNB<sup>2-</sup>. Tots aquests passos es duen a terme a l'interior de la caixa de guants per evitar l'oxidació dels grups tiol de la proteïna i la reoxidació del TNB<sup>2-</sup> a DTNB<sup>2-</sup>, per l'efecte de l'oxigen atmosfèric.<sup>145</sup> La reacció s'ha de donar amb un gran excés de DTNB<sup>2-</sup> respecte els grups tiolats. La mostra de proteïna es dilueix amb la solució de DTNB<sup>2-</sup> unes 40 vegades.

La reacció amb DTP té lloc de manera anàloga a la descrita pel cas del DTNB<sup>2-</sup>. Els tiolats cisteïnics s'oxiden en presència de DTP, generant per cada cisteïna que reacciona un anió 2-piridinatiolat (MTP), que absorbeix a 343 nm amb un  $\epsilon_{MTP}(343 \text{ nm}) = 7600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .<sup>146</sup>



En aquest cas, per dur a terme la reacció, es mescla una solució d'acetat sòdic 0.2 M, EDTA 1 mM, ajustant el pH a 4 amb àcid acètic, amb un 5 – 10 % en volum d'una solució saturada de DTP (veure més endavant el procediment a seguir per preparar aquesta solució) directament en la cubeta on s'enregistrarà l'absorbància. Es mesura immediatament l'absorbància a 343 nm del blanc i s'addiciona la proteïna que es vol analitzar (aproximadament un 2 % del volum total). Es van fent mesures a

aquesta longitud d'ona fins que han transcorregut 15 minuts. L'estabilització de l'absorbància ens indica el final de la reacció:



En aquesta cas, la reacció amb els tiolats de la proteïna té una cinètica més lenta que en la reacció amb DTNB<sup>2-</sup> (mètode d'Ellman), permetent determinar la concentració de cisteïnes reduïdes.

Per obtenir la solució saturada de DTP es dissolen 7 mg de DTP (≥99 %, Sigma-Aldrich) en 2 ml d'HCl 0.1 M. S'addicionen a aquesta solució 2 ml de NaAc 1 M, pH 4, i 6 ml d'H<sub>2</sub>O. Totes les solucions han estat desgasades amb argó prèviament al seu ús. Es filtra la solució resultant, s'aliqota i es congela a - 80 °C fins que hagi de ser utilitzada.

### ***Espectroscòpia d'absorció ultraviolat-visible, UV-Vis***

És ben conegut que l'espectroscòpia d'absorció UV-Vis permet determinar l'estereoquímica de coordinació (naturalesa dels àtoms donadors i geometria de coordinació al voltant del metall) en els complexos de metalls de transició, exceptuant el cas de determinades configuracions electròniques, tals com  $d^{10}$ . Ara bé, en absència de bandes  $d-d$ , és possible que la naturalesa del lligand permeti la presència de bandes de transferència de càrrega (TC), com en el cas d'ions  $d^{10}$  enllaçats a lligands tipus tiolat. La relació de les bandes de TC, força amples i d'elevada energia, amb l'estereoquímica de coordinació esdevé, però, força més complexa.

A diferència d'altres proteïnes, la gran majoria de les MTs no contenen aminoàcids aromàtics. Per això la seva forma demetal·lada és totalment incolora i, en conseqüència, transparent a longituds d'ona superiors a 240 nm. D'altra banda, quan la proteïna es coordina a centres metàl·lics ho fa, en general, mitjançant els residus de Cys. Així, els agregats metall( $d^{10}$ )-MT són comparables a complexos polinuclears  $[M_y(SR)_x]$  i per tant capaços de presentar bandes de TC lligand → metall, o TCLM.



Una característica particular dels ions  $d^{10}$  és la diversitat de possibles geometries de coordinació, digonal, plano-trigonal o tetraèdrica, i la dificultat de poder fer prediccions respecte la seva preferència. Així, mentre que en els tiolats metàl·lics l'ió Zn(II) molt freqüentment és tetraèdric, en el cas del Cu(I) la geometria plano-trigonal és la més habitual, i la coexistència d'aquesta amb la digonal no és gens excepcional en els complexos polinuclears. Així doncs, en base a la capacitat de les MTs d'enllaçar un elevat nombre de metalls, per exemple  $\text{Cu}^I_{12}\text{-MT}$ , cal anticipar que fins i tot en el cas de tenir una única espècie metall-MT en solució, poden coexistir diverses geometries de coordinació en el si de cada molècula. La complexitat augmenta si hi ha espècies amb diferents graus de metal·lació, i encara més si les espècies metall-MT inclouen diferents metalls.

Per tot això, l'espectre UV-Vis d'una mostra metall-MT pot proporcionar informació sobre la naturalesa del cromòfor, però sovint requereix informació addicional per poder extreure'n alguna conclusió. En canvi, si es representa el conjunt d'espectres que s'obtenen al llarg d'una valoració, en la qual es van substituint progressivament els metalls inicialment enllaçats a la proteïna, mitjançant l'addició d'un altre ió metàl·lic, els espectres de diferència poden informar de la formació o desaparició de determinats cromòfors.

Els espectres d'absorció UV-Vis s'han dut a terme en un espectrofotòmetre *HP8452A* de *diode array* amb 15 segons de temps d'integració i emprant una cubeta de quars segellada d'1 cm de pas de llum. Juntament amb els espectres de CD, aquests s'han tractat amb el programa informàtic GRAMS/32.

### ***Dicroïsmes circulars***

L'espectroscòpia de CD es basa en l'absorció, per part d'un cromòfor òpticament actiu, d'una llum incident polaritzada en un pla.<sup>147</sup> En el cas de les MTs, els cromòfors  $[\text{M}(\text{SR})_x]$  esdevenen òpticament actius gràcies a la transferència de la quiralitat pròpia de la cadena peptídica (L-aminoàcids) als centres metàl·lics. D'aquesta manera el senyal de CD dona informació directa de l'entorn de coordinació del metall, essent la intensitat de les bandes dicroiques una mesura del grau de plegament o d'estructuració de l'espècie. Malgrat això, la presència de diferents entorns de coordinació en una mateixa espècie metall-MT, la possible coexistència de diferents graus de metal·lació per una mateixa proteïna, i la presència de més d'un metall són factors limitants en aquesta tècnica.

Es pot considerar que una llum polaritzada linealment està formada per dos feixos de llum polaritzats circularment en sentits oposats. L'absorció desigual dels dos feixos de llum per part d'un cromòfor òpticament actiu, es tradueix en l'existència de dos coeficients d'extinció molar,  $\epsilon_e$  i  $\epsilon_d$ , és a dir, la llum polaritzada circularment en el sentit esquerre (e) és absorbida amb diferent intensitat que la del sentit dret (d). La variació dels coeficients d'extinció molar,  $\Delta\epsilon = |\epsilon_e - \epsilon_d|$ , en funció de la longitud d'ona de la radiació incident constitueix la base dels espectres de dicroïsmo circular.

Les bandes dels espectres de CD són de dos tipus diferents, gaussianes o en forma de derivada. Una banda gaussiana indica l'existència de cromòfors idèntics però independents. En canvi, quan dos o més cromòfors idèntics, connectats per enllaços  $\sigma$ , s'orienten adequadament per establir interaccions mútues, apareix un acoblament anomenat d'*exciton coupling*, que transforma la banda gaussiana en una altra banda en forma de primera derivada. La longitud d'ona que caracteritza les bandes de CD correspon a màxims de bandes d'absorció en l'espectre UV-Vis, si bé no totes les transicions electròniques observades en l'espectre UV-Vis donen lloc a bandes en el de CD.

Els espectres de CD han estat realitzats mitjançant un espectropolarímetre *Jasco-715* a 50 nm/min, 0.5 nm de resolució i usant una cubeta de quars segellada d'1 cm de pas de llum.

### ***Detecció d'ions sulfur***

Un primer assaig qualitatiu per detectar la presència d'anions  $S^{2-}$  en les MTs consisteix en afegir uns  $\mu\text{l}$  de HCl concentrat a la mostra, disposada sota un paper xop amb una solució de  $\text{AgNO}_3$ . El sulfur d'hidrogen que es genera per l'acidificació de la mostra reacciona amb els cations plata del paper, formant-se  $\text{Ag}_2\text{S}$  (negre). L'enfosquiment del color del paper, com a conseqüència de la precipitació del sulfur de plata és indicatiu de la presència d'ions sulfur en la mostra analitzada.

Un segon procediment, desenvolupat per confirmar la presència dels ions sulfur, consisteix en la determinació per ICP-AES del contingut total en sofre, zinc, cadmi i coure en condicions normals i després de sotmetre la mostra a un tractament amb HCl 1 M, incubant a 60 °C durant 5 min. El tractament amb àcid permet la formació i evaporació del sulfur d'hidrogen, de manera que la relació metall-proteïna que és

determinada per ICP-AES es manté invariable en absència de sulfurs, però s'incrementa quan la proteïna conté aquests anions.

### ***Determinació del pKa d'apoMTC mitjançant el programa pHab2000***

Per determinar la constant d'acidesa mitjana dels tiolats cisteïnics de MTC s'han valorat alíquotes d'1 ml d'apoMTC 12  $\mu$ M, amb NaOH 1 M. S'ha enregistrat l'espectre UV de cada punt de la valoració entre 200 i 400 nm. Les mostres es preparen en una caixa de guants, sota atmosfera d'argó, en una cubeta amb fons adaptat per a l'agitació magnètica. El pH s'enregistra amb un electrode combinat Crison de 3 mm de diàmetre, especial per micromostres. L'espectre electrònic s'enregistra en una cubeta segellada per mantenir al màxim l'atmosfera inert.

Amb el programa pHab2000 s'ha calculat la constants d'acidesa a partir de les dades espectrofotomètriques obtingudes de la valoració. Aquest programa realitza un ajust numèric mitjançant mínims quadrats per determinar el pKa.

### ***Valoracions***

Totes les valoracions s'han dut a terme en una cubeta d'1 cm de pas de llum i amb tap. Les valoracions de ZnMTC amb cadmi o coure, seguides per CD i UV, s'han dut a terme bombollejant argó després de l'addició de cada equivalent de metall. Les valoracions d'apoMTC amb cadmi o coure i les valoracions amb àcid o base s'han efectuat a dins de la caixa de guants, sota atmosfera d'argó, ja que la proteïna és molt més susceptible a l'oxidació quan tenen lloc variacions del pH. Per valorar l'apoMTC amb coure o cadmi, l'addició del metall s'ha realitzat a pH 2 i, posteriorment, s'ha incrementat el pH fins 6.5 – 7, amb Tris 1 M.

### III.3. Obtenció d'apoMT i reconstitució

La proteïna obtinguda dels cultius d'*E. coli* enriquits amb zinc es sotmet a un tractament amb un agent reductor i es demetal·la per tal d'aïllar l'apoMT. La proteïna lliure de metalls es pot tornar a metal·lar mitjançant la reconstitució. El protocol emprat per dur a terme aquests processos es basa amb la metodologia descrita per M. Vašák,<sup>148</sup> amb algunes modificacions. A continuació es detallen els procediments utilitzats per obtenir la forma apoMTC i les diverses formes holoMTC mitjançant la reconstitució amb diferents metalls.

#### *Obtenció d'apoMTC*

Es pren 1 – 10 mg de ZnMTC, proteïna recombinant obtinguda en medis rics en zinc, i es dissol en Tris-HCl 20 mM, pH 7.5 – 8, a 4 °C. S'afegeixen 20 equivalents de l'agent reductor ditiotreitòl, DTT, respecte a la concentració de cisteïnes. S'addiciona clorur de guanidini fins a 4 M. Es deixa agitant amb Ar durant 45' de manera que la proteïna desnaturalitzada es redueixi totalment. Es disminueix el pH fins 1-1.5 amb HCl 6 M. Es concentra la mostra i es purifica per cromatografia amb un columna de Sephadex G-10 equilibrada amb HCl 10 mM, utilitzant com a fase mòbil aquesta mateixa solució, amb un flux d'aproximadament 1 ml per minut, mitjançant un bomba peristàltica connectada a l'extrem inferior de la columna. Es recullen fraccions d'1 ml i se'n mesura l'absorbància a 220 nm. S'agrupen les fraccions d'apoMTC, corresponents al primer pic del cromatograma.

Es calcula la concentració aproximada d'apoMTC a partir de l'absorbància de la mostra a 220 nm, tenint en compte que  $\epsilon_{220}(\text{MTC}) \approx 84 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ . Mitjançant ICP-AES es determina la concentració exacta d'apoMTC i es confirma que la proteïna es troba totalment demetal·lada. Es mesura el grau d'oxidació de la proteïna mitjançant el seguiment per UV-Vis, a 343 nm, de la reacció de la MT amb 2,2'-ditioldipiridina, DTP, sabent que el  $\epsilon_{343}$  de MTP és 7600. Si l'oxidació és inferior al 5 %, es congela la proteïna a -80 °C fins que hagi de ser utilitzada per a la reconstitució.

### ***Reconstitució d'apoMTC***

La reconstitució d'apoMTC amb els diferents metalls es va dur a terme en una caixa de guants, sota atmosfera d'argó, amb totes les solucions prèviament desgasades, ja que alguns passos d'aquest procés són molt susceptibles a l'oxidació de la proteïna i requereixen treballar en condicions totalment anaeròbies.

Per a la reconstitució amb coure s'utilitza una sal de Cu(I) que estabilitza el grau d'oxidació +1 del metall,  $[\text{Cu}(\text{CH}_3\text{CN})_4](\text{ClO}_4)$ . Aquesta sal s'obté a partir de la reacció de  $\text{Cu}_2\text{O}$ , dissolt en  $\text{CH}_3\text{CN}$ , amb àcid perclòric, a reflux i sota atmosfera de nitrogen. Es dissol la sal pura i seca amb acetonitril al 30 %, en aigua, desgasat amb argó. Aquesta solució es manté a  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  fins a la seva utilització. Les reconstitucions amb zinc i cadmi es realitzen a partir del clorur metàl·lic corresponent.

S'addicionen 8.5 equivalents de zinc/cadmi, o bé 12.5 equivalents de coure a la solució d'apoMTC, segons quin sigui el metall amb el qual es vol reconstituir la proteïna. Posteriorment, s'addiciona Tris 1 M fins a pH 7.0 – 7.5. Es deixa incubant durant 1 hora, en agitació, submergit en gel. Es concentra la mostra, mitjançant filtres concentradors, fora de la caixa de guants, i s'eliminen els ions metàl·lics lliures en solució mitjançant cromatografia per FPLC, amb una columna Superdex-75.

### III.4. Caracterització estructural

L'obtenció d'una mostra de MTC per estudis de ressonància magnètica nuclear consta de tres passos essencials:

- ✓ Obtenir uns 10 mg de ZnMTC, proteïna recombinant
- ✓ Demetal·lar la mostra anterior per obtenir apoMTC i reconstituir-la amb  $^{113}\text{Cd}$
- ✓ Concentrar la mostra fins a obtenir una molaritat d'entre  $1 - 5 \times 10^{-3}$  M.

Els dos primers processos es duen a terme mitjançant les metodologies descrites anteriorment. En el procés de concentrar la  $^{113}\text{CdMTC}$ , en canvi, ha estat necessari emprar noves tècniques.

L'obtenció de la proteïna a una elevada concentració ha estat el punt més crític per assolir una mostra adient per RMN, ja que aquestes proteïnes tenen tendència a dimeritzar o a agregar en aquestes condicions.

Els primers mètodes que es van utilitzar per concentrar  $^{113}\text{CdMTC}$  foren: filtres concentradors Millipore, cèl·lules d'ultrafiltració Amicon i membranes d'osmosi SpectrumLabs. Tots aquests dispositius actuen filtrant les molècules petites ( $\text{H}_2\text{O}$ , sals, etc.), aconseguint que les molècules amb un pes molecular major a la mida del porus del filtre es vagin concentrant. El tipus de força que es necessita per aconseguir filtrar l'aigua és el que diferencia els uns dels altres: força centrífuga (filtres concentradors), sobrepressió d'un gas inert, bé sigui argó o nitrogen (cèl·lules d'ultrafiltració) i osmosi (membranes d'osmosi).

Aquests procediments permeten concentrar la mostra, però en tots els casos s'observà la formació de precipitat blanc, que es disgregava parcialment amb l'addició d'un agent reductor ( $\beta$ -mercaptoetanol o DTT).

El mètode que permeté obtenir finalment una mostra concentrada de  $^{113}\text{CdMTC}$  sense la formació de precipitat fou la liofilització de la proteïna.

Les tres mostres, a partir de les quals es va poder dur a terme un anàlisi per RMN de les propietats estructurals de  $^{113}\text{CdMTC}$ , s'obtingueren segons es descriu a continuació:

- ✓ Mostra **MTC1**: s'obtingué  $^{113}\text{CdMTC}$  mitjançant la reconstitució d'apoMTC amb 8.5 equivalents de cadmi i s'eliminaren els metalls lliures en solució mitjançant cromatografia per FPLC, amb Tris-HCl 10 mM, pH 7, com a fase mòbil. Es bescanvià el tampó per Tris( $d_{11}$ )-HCl 10 mM, pH

6.5, mitjançant diversos cicles de rentats en filtres concentradors (Millipore). Finalment es concentrà amb els mateixos filtres fins a aproximadament 2 mM. S'afegí D<sub>2</sub>O fins a un 15 % i s'introduí en el tub de RMN. S'observà un inici d'agregació de la proteïna en forma de terbolesa blanca. S'addicionà β-mercaptoetanol, fins a una concentració de 0.5 – 1 mM<sup>†</sup>, per disgregar la mostra i s'aconseguí una solució gairebé nítida. S'enregistraren els espectres de RMN a partir d'aquesta mostra.

- ✓ Mostra **MTC2**: s'obtingué <sup>113</sup>CdMTC mitjançant la reconstitució d'apoMTC, en un medi 1 mM de β-mercaptoetanol, amb 8.5 equivalents de cadmi. Sense eliminar els metalls en solució es bescanvià el tampó per Tris(d<sub>11</sub>)-HCl 10 mM, pH 6.5, 0.5 mM de β-mercaptoetanol, amb els concentradors Millipore. Es concentrà la mostra fins que començà a precipitar la proteïna (aproximadament a 1 mM). Es recuperà el sobrenedant, s'hi addicionà D<sub>2</sub>O fins a un 15 % i s'introduí en el tub de RMN.
- ✓ Mostra **MTC3**: la reconstitució d'apoMTC, en un medi 10 mM de β-mercaptoetanol, es dugué a terme amb 8.5 equivalents de cadmi. S'eliminaren els metalls lliures en solució i el β-mercaptoetanol, i es bescanvià el tampó mitjançant cromatografia per FPLC, amb Tris(d<sub>11</sub>)-HCl 1 mM, pH 6.5, com a fase mòbil. Es liofilitzà la mostra eluïda i es resuspengué amb 500 µl de H<sub>2</sub>O miliQ, desgasada, amb 15 % de D<sub>2</sub>O i 0.02 % d'azida sòdica. S'introduí la mostra en el tub de RMN.

La mostra de <sup>113</sup>CdP10 s'obtingué com es detalla a continuació:

- ✓ Mostra **P10**: s'adquirí el pèptid amb seqüència:  
 PCGCG TSCKC GSGKC CCGST CNCTT CPSKQ-NH<sub>2</sub>,  
 corresponent a l'extrem N-terminal de la proteïna MTC (sense la metionina inicial), obtingut per síntesi en fase sòlida per EZBiolab. Se l'anomenà P10 pel seu contingut en cisteïnes, deu en total. Es dissolgué el pèptid liofilitzat amb HCl 10 mM, desgasat amb argó. S'obtingué la forma totalment reduïda de P10 segons el protocol descrit per MTC,

<sup>†</sup> És important que la mostra final no contingui una concentració de β-mercaptoetanol superior a 0.5 – 1 mM, per minimitzar les interferències de les senyals de <sup>1</sup>H RMN d'aquesta molècula amb les de la proteïna.

mitjançant la incubació del pèptid, durant 45' sota bombolleig d'argó, amb DTT i clorur de guanidini, addicionant-hi 4 equivalents de Zn(II) i Tris fins a pH 7.8. Es baixà el pH fins a 1.5 i es recuperà l'apoP10, totalment lliure de metalls, per cromatografia amb un columna de Sephadex G-10, equilibrada amb HCl 10 mM. Es reconstituí el pèptid amb 4.5 equivalents de  $^{113}\text{Cd(II)}$  i 10 mM de  $\beta$ -mercaptoetanol. Sense eliminar l'excés de metall es bescanvià el tampó per Tris( $d_{11}$ )-HCl 10 mM, pH 6.5, 0.5 mM de  $\beta$ -mercaptoetanol, amb els concentradors Millipore. Es concentrà la mostra fins a aproximadament 4 mM. S'hi addicionà  $\text{D}_2\text{O}$  fins a un 15 % i s'introduí en el tub de RMN, que es segellà a la flama.

### ***RMN homonuclear de protó***

Els espectres de RMN de  $^1\text{H}$  homonuclears es van adquirir en espectròmetres Bruker *Avance* 600 i Bruker *Avance* 800, operant a 11.74 i 18.78 T, respectivament. El primer estava equipat amb una sonda de triple ressonància TXI i el darrer amb una criosonda TCI, també de triple ressonància, ambdues amb gradients.

Els experiments de RMN de  $^1\text{H}$  unidimensional es van realitzar eliminant el senyal de l'aigua amb la seqüència *excitation sculpting*.<sup>149</sup> Finestres típiques de 9000 Hz a 11.74 T (12000 Hz a 18.78 T) centrades en el senyal de l'aigua comprenien la totalitat dels senyals de  $^1\text{H}$  de MTC. Els espectres de correlació homonuclear dipolar (NOESY) i de correlació escalar (TOCSY i dqf-COSY) es van realitzar amb finestres espectrals de 7184 Hz a 11.74 T (9615 Hz a 18.78) en ambdues dimensions. Els temps d'adquisició directa emprats foren de 142 ms (11.74 T) i 213 ms (18.78 T), per l'evolució s'utilitzaren temps de 35.6 ms (11.74 T) i 27 ms (18.78 T). Els temps de recycle eren de 1.5 s, realitzant-se, en general, 128 escombrats per increment. En els experiments NOESY es van utilitzar temps de mescla de 80, 200 i 400 ms. En els experiments TOCSY s'emprà la seqüència MLEV-17 com a *spin-lock*, aplicada durant temps de mescla de 70 i 120 ms. En tots els casos, s'eliminà el senyal de l'aigua mitjançant la seqüència *exciton sculpting*. Els senyals s'han referenciat respecte el DSS (2,2-dimetil-2-silapentà-5-sulfonat), assumint un desplaçament químic del senyal de l'aigua de 4.79 ppm (4.93 ppm) a 300 K (288 K).



Les FIDs adquirides en els espectres NOESY i TOCSY s'han ponderat, en ambdues dimensions, amb una funció sinus quadrat desplaçada ( $\pi/2$ ,  $\pi/3$  o  $\pi/4$ ), abans de realitzar la transformada de Fourier. Els espectres 2D finals per a l'anàlisi consistien en matrius de 2 K x 2 K punts.

### ***RMN de $^{113}\text{Cd}$ directe i heteronuclear $^1\text{H}$ - $^{113}\text{Cd}$***

Tant els espectres d'observació directa de  $^{113}\text{Cd}$ , com els de correlació heteronuclear  $^1\text{H}$ - $^{113}\text{Cd}$  es van adquirir en espectròmetres Bruker *Avance* 400 (9.4 T) i 600 (11.74 T). Les freqüències de  $^1\text{H}$  i  $^{113}\text{Cd}$  eren, respectivament, 400.13 (600.13) i 88.97 (133.19) MHz per al camp magnètic de 9.4 T (11.74 T). Pels espectres d'observació directa de  $^{113}\text{Cd}$  es van utilitzar sondes BBO, equipades amb gradients en ambdós equips. Els espectres de correlació heteronuclear  $^1\text{H}$ - $^{113}\text{Cd}$  es van realitzar amb una sonda BBO (en el cas de fer-se en l'espectròmetre *Avance* 600), o amb la sonda BBI, de detecció indirecta de banda ampla (en aquells espectres adquirits en l'espectròmetre *Avance* 400).

Els espectres unidimensionals de  $^{113}\text{Cd}$  es van realitzar en finestres espectrals de 400 ppm (53280 Hz en un camp de 11.74 T), 32 K punts d'adquisició (308 ms) i desacoblant el protó durant aquesta, mitjançant la seqüència WALT-16. El temps de recicle total per escombrat fou de 1 s. Els experiments es van adquirir en blocs de 4096 escombrats (1 hora i 10 minuts aproximadament per a cadascun) i amb un nombre de blocs de 30 – 40. Així doncs, per a cada adquisició directa de  $^{113}\text{Cd}$  es realitzaven un total de 120000 – 150000 escombrats, amb un temps aproximat d'un dia i mig per espectre.

Els espectres de correlació heteronuclear HMQC (*heteronuclear multiple quantum coherence*)  $^1\text{H}$ - $^{113}\text{Cd}$  es van realitzar amb finestres espectrals de 10 i 150 ppm per al  $^1\text{H}$  i per al  $^{113}\text{Cd}$ , respectivament, amb 2 K punts adquirits directament ( $^1\text{H}$ ) i 200 punts d'evolució indirecta ( $^{113}\text{Cd}$ ). El temps de recicle total fou d'1 s. El valor de la constant d'acoblament es va variar entre 40 i 60 Hz. El nucli de  $^{113}\text{Cd}$  es va desacoblar durant l'adquisició mitjançant la seqüència *garp*. L'aigua s'eliminà mitjançant la seqüència *watergate* acoblada a la transferència de magnetització  $^{113}\text{Cd}$ - $^1\text{H}$  en els darrers pulsos de la seqüència. Es realitzaven 512 escombrats per increment. El temps total de l'experiment oscil·lava entre 1 i 1.5 dies. Es prengué el senyal de  $^{113}\text{Cd}$  d'una mostra de 0.1 M de  $\text{Cd}(\text{ClO}_4)_2$  com a referència (0 ppm) en tots els experiments de  $^{113}\text{Cd}$ .

## MÈTODES

---

Les FIDs obtingudes dels espectres heteronuclears es multiplicaren per una funció sinus quadrat (desplaçada  $\pi/3$ ), per a l'adquisició directa ( $^1\text{H}$ ) i, sense desplaçar, per l'adquisició indirecta ( $^{113}\text{Cd}$ ). Les matrius bidimensionals obtingudes després de la transformada de Fourier eren, en general, de 2 K x 256 punts.

El processat dels espectres es dugué a terme amb el *software* de Bruker i els espectres s'analitzaren mitjançant el programa Sparky.

### III.5. Estudis funcionals dels dominis de MT-1 de mamífer

#### *Obtenció de MT-1 i els seus dominis*

La proteïna requerida per dur a terme aquests experiments, MT-1 i els seus dominis, es va obtenir per enginyeria genètica tal com s'ha descrit per la metal·lotioneïna de cranc, MTC, en l'apartat III.1 d'aquesta Tesi. El clon emprat per a la síntesi de MT-1 s'havia obtingut a partir del cDNA de MT-1 i el vector d'expressió pGEX-4T-1 (pGEX-MT-1). Anàlogament, els clons utilitzats per sintetitzar els dominis  $\alpha$  i  $\beta$  s'obtingueren a partir dels respectius cDNAs i del vector d'expressió pGEX-4T-1.<sup>150, 151</sup>

#### *Animals*

Per tal d'avaluar els efectes de MT-1 i dels seus dominis en ratolins criolesionats, evitant les interferències de la proteïna endògena, s'ha utilitzat la soca transgènica deficient en MT-1 i MT-2 (MTKO).<sup>52</sup> En l'experiment s'ha treballat amb un total de 74 animals, tots ells femelles adultes de 5 – 8 mesos d'edat i 20 – 35 g de pes.

#### *Disseny de l'experiment*

Els ratolins es van dividir en 6 grups, Taula III.1. Els animals dels diferents grups es diferencien entre sí per la proteïna que se'ls va subministrar, via injecció intraperitoneal, en 8 dosis, distribuïdes en 4 dies consecutius, a partir del dia de la criolesió. A cada ratolí se li van injectar dues dosis diàries de solució salina (NaCl 9 %) amb: 0.25  $\mu$ g de MT-1/g de ratolí (MT), 0.25  $\mu$ g de  $\alpha$ MT-1/g de ratolí ( $\alpha$ ), 0.25  $\mu$ g de  $\beta$ MT-1/g de ratolí ( $\beta$ ) o 0.125  $\mu$ g de  $\alpha$ MT-1/g de ratolí + 0.125  $\mu$ g de  $\beta$ MT-1/g de ratolí ( $\alpha + \beta$ ), segons el tractament que li corresponia. Als ratolins amb tractament salí i *sham*<sup>†</sup> se'ls injectà solució salina sense pèptid ni proteïna. El volum de cada injecció és de 150  $\mu$ l/30 g de ratolí<sup>‡</sup>.

Cal tenir en compte que l'experiment s'ha dissenyat de manera que tots els ratolins rebessin la mateixa quantitat de proteïna (en termes de  $\mu$ g totals de proteïna/pèptid). Sota aquestes condicions, els ratolins tractats amb la proteïna MT i els

---

<sup>†</sup> Els ratolins *sham* són aquells que han sofert tots els processos que s'han efectuat als altres ratolins excepte la criolesió (anestèsia i tractament quirúrgic). Aquests serveixen de control dels efectes produïts per la criolesió.

<sup>‡</sup> El pes mitjà d'aquesta soca de ratolins es troba al voltant dels 30 g.

ratolins amb tractament  $\alpha + \beta$  reben la meitat de mols de domini  $\alpha$  que els ratolins tractats exclusivament amb aquest domini, i la meitat de mols de domini  $\beta$  que els ratolins amb tractament  $\beta$ . Per aquest motiu, en el cas de que només un dels dos dominis mostri activitat fisiològica en l'experiment realitzat, l'efecte que s'ha d'observar en els animals amb tractament MT o tractament  $\alpha + \beta$  ha de ser menor que l'observat en els animals tractats amb el domini actiu.

**Taula III.1.** Tractament dels ratolins criolesionats amb pèptid, proteïna o solució salina.

Tractament	MT	$\alpha$	$\beta$	$\alpha + \beta$	salí	<i>sham</i>
<b>Nombre d'animals</b>	13	13	14	13	13	8

### ***Proves conductuals***

Es va sotmetre els animals a dues proves conductuals abans i després de la criolesió: escala horitzontal (*Horizontal Ladder Beam*, Columbus Instruments, OH) i barra giratòria (*Rotarod*, Ugo Basile). Abans de sotmetre els animals a aquestes proves és necessari habuitar-los a la manipulació i a la nova estança on es durà a terme el test, perquè aquests no siguin paràmetres addicionals a tenir en compte a l'hora d'avaluar la resposta dels ratolins a aquests experiments. Al procés d'habitució a la manipulació se l'anomena *handling* i s'efectua en la sala on es duran a terme les proves. Aquestes s'inicien 15 minuts després d'haver portat els animals a la nova sala.

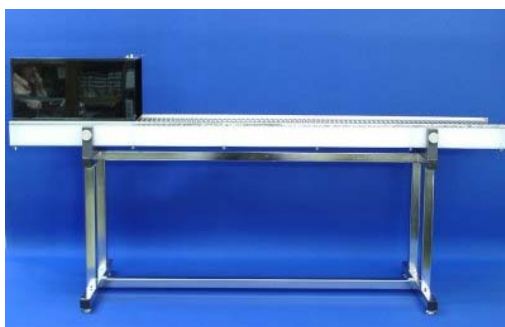
#### ✓ Escala horitzontal (*Horizontal Ladder Beam*)

La prova de l'escala horitzontal té com a objectiu avaluar els efectes de la lesió en la coordinació motora dels ratolins.

L'aparell utilitzat per dur a terme aquest test consisteix en una escala horitzontal elevada, a 125.5 cm del terra (Figura III.9). A un extrem es disposa una caixa negra de 30.5 cm de longitud, Figura III.10, amb serradures. Es connecta un dispositiu a l'escala, que pot efectuar una petita descàrrega de 3 mA (mode de *shock*, emprat durant l'aprenentatge) o comptabilitzar els errors comesos (mode sensor, emprat durant els tests).

Mitjançant diversos dies d'aprenentatge es pretén que els animals creuin la passarel·la, bé pels esglaons, que es troben separats entre ells a una distància de 2.5 cm,

o bé per la plataforma metàl·lica, situada a sota de l'escala. Els ratolins no han d'estar en contacte amb l'escala i la plataforma a la vegada, situació que es considera com a "error". Aquests errors es tradueixen en una petita descàrrega quan es treballa en mode de *shock*, durant l'etapa d'aprenentatge, per tal d'aconseguir que els animals ho reconeguin com una posició errònia i canviïn la manera de creuar la passarel·la.



**Figura III.9.** Imatge de l'escala horitzontal elevada.

La sala on es realitza la prova està totalment a les fosques, exceptuant un llum que es disposa enfocant l'extrem contrari on està situada la caixa negra. Entre animal i animal es neteja la passarel·la amb una solució d'etanol al 5 % per eliminar les olors dels ratolins que han passat prèviament.

Durant els tests que s'efectuen abans i després de la lesió es treballa en mode sensor, en el qual no s'efectua una descàrrega cada cop que es comet un error, sinó que el dispositiu connectat a l'escala, actuant com a sensor, únicament comptabilitza els errors. Aquesta prova es du a terme situant els ratolins a l'extrem il·luminat pel llum, i es calcula el temps que tarden en creuar la passarel·la i els errors comesos. Si després d'haver passat 2 min el ratolí no ha creuat la passarel·la se'ls posa directament a la caixa negra.



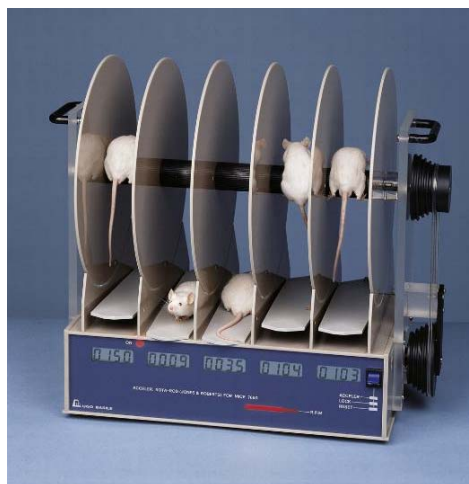
**Figura III.10.** Imatge d'una rata just abans d'entrar a la caixa negra de l'escala horitzontal.

La disposició d'una làmpada que enfoca l'inici de la passarel·la crea un gradient de llum d'un extrem a l'altre, que acaba amb la foscor, gairebé total, de la caixa negra. La diferència de llum i el canvi de passar d'un espai obert a una caixa més resguardada estimula els ratolins a creuar la passarel·la, com a resposta a l'instint de protecció que senten aquests animals en receptacles foscos i tancats.

✓ Barra giratòria (*RotaRod*)

Aquesta prova consisteix en fer caminar els ratolins per una barra giratòria, avaluant també la seva coordinació motora.

L'aparell utilitzat consta d'una barra que gira a diferents velocitats (les emprades en aquest experiment són 16 i 32 rpm). Aquesta barra està dividida en 5 seccions, separades entre elles per una peça de plàstic circular, que permet fer el test a 5 ratolins simultàniament, sense que aquests es vegin entre ells, Figura III.11.



**Figura III.11.** Imatge de la barra giratòria.

La prova s'inicia disposant els ratolins a la barra giratòria, perquè comencin a caminar, i es comptabilitza el temps que tarden en caure per primer cop i les vegades que cauen en total durant els 5 minuts d'experiment. Es neteja el sistema després de cada torn de 5 ratolins, amb etanol al 5 %. Les proves d'aprenentatge es realitzen a 16 rpm i els testos a 16 i 32 rpm.

### *Criolesió*

Els ratolins s'anestesien amb isofluorà (anestèsia gasosa), se'ls efectua una petita incisió a la pell del cap i se'ls lesiona mitjançant l'exposició del crani a una porció de neu carbònica, durant 30 segons, sobre el còrtex motor de l'hemisferi dret del cervell. Finalment, se'ls sutura la ferida. Després de la lesió es deixen uns minuts sota l'escalfor d'un llum per evitar que sofreixin hipotèrmia i facilitar el procés de recuperació.

### *Sacrifici dels animals*

Quatre dies després de la criolesió es sacrifiquen tots els ratolins per tal d'analitzar-ne el cervell. S'empren dues metodologies per avaluar els efectes de la criolesió i el tractament efectuat a cada ratolí: determinació de l'expressió gènica de marcadors inflamatoris mitjançant l'assaig de protecció de la ribonucleasa, RPA, i detecció de micròglia i astròcits activats mitjançant histoquímica i immunohistoquímica, respectivament. El procediment per sacrificar els ratolins varia en funció de l'estudi que s'hagi de realitzar a continuació.

Els animals dels quals se n'ha d'estudiar el cervell per RPA són sacrificats per decapitació, se n'extreu el cervell, es dissecciona, en gel, la part lesionada de l'hemisferi dret i es congela ràpidament amb nitrogen líquid. Posteriorment es conserva a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Els ratolins dels quals se n'estudiarà el cervell per histoquímica se sotmeten a una dosi letal d'anestèsic (0.2 ml de lidocaïna 2 %) i abans de que morin se'ls fa una perfusió intracardíaca, injectant en primer lloc una solució de PBS i després paraformaldehid per fixar els teixits. S'extreuen els cervells i se submergeixen en paraformaldehid durant 4 hores a  $4^{\circ}\text{C}$ . Es renten amb PBS i finalment es deshidraten amb una solució de sacarosa al 30 % en PBS, per assegurar-ne la seva criopreservació. Finalment es congelen gradualment amb neu carbònica i es deixen a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Aquests procediments estan aprovats pel Comitè Ètic en Experimentació Animal i Humana de la Universitat Autònoma de Barcelona.

### *Processat de les mostres*

- ✓ Determinació de mRNA de diferents gens mitjançant RPA

L'assaig de protecció de la ribonucleasa, RPA, és una tècnica que permet determinar de manera semi-quantitativa els nivells de mRNA de diferents gens. Aquest procediment es basa en l'ús d'unes sondes de RNA prèviament dissenyades i marcades amb nucleòtids radiactius ( $(^{32}\text{P})\alpha\text{-UTP}$ ), obtinguts *in vitro*, que s'hibriden amb el mRNA corresponent al gen que es vol estudiar. El protocol emprat és el descrit en Hobbs *et al.* (1993).<sup>152</sup>

L'extracció del RNA a partir de la part lesionada del cervell de ratolí es realitza mitjançant el reactiu TriPure, que solubilitza el RNA inactivant les RNases. Es comprova que la relació RNA/proteïnes sigui l'adequada per dur a terme el RPA, mitjançant la determinació del quocient  $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ , que ha de prendre un valor entre 1.8 – 2.

Per marcar el mRNA s'usen sondes d'entre 72 i 300 parells de bases (RNA), la mida de les quals està dissenyada per obtenir una correcta separació per electroforesi en gel d'acrilamida. El conjunt de sondes utilitzat en aquest treball s'anomena mescla d'inflamació ja que pretén estudiar l'expressió gènica d'unes proteïnes relacionades amb la resposta inflamatòria (Mac1 –receptor de superfície de macròfags i micròglia-, ICAM –molècula d'adhesió intercel·lular, induïble per citoquines-, EB22 –proteïna de fase aguda-, A20 –proteïna citoplasmàtica antiapoptòtica, induïda per citoquines- i GFAP –proteïna àcida glial fibrilar-, amb L32 –gen ribosòmic- com a patró intern, ja que és un gen que no es veu modificat pel tractament).

Es tracten les mostres amb una mescla de RNases per tal de digerir tot el RNA no hibridat i, amb una solució proteolítica. Les mostres es carreguen en un gel d'urea-acrilamida. Com a control s'utilitza una mostra amb les diferents sondes, però sense RNA. Un cop acabada l'electroforesi, el gel s'asseca, després d'adherir-lo en un paper *Whatmann*, i s'exposa a una pel·lícula autoradiogràfica. Finalment es quantifiquen les bandes radioactives mitjançant el *Molecular Imager System*® (BioRad), en el Servei de fotodocumentació i anàlisi d'imatges, de la Universitat Autònoma de Barcelona.

- ✓ Quantificació de l'activació de cèl·lules glijals (astròcits i micròglia)

Com a resposta a la lesió produïda en el cervell es dona una activació dels astròcits i la micròglia, anomenada astrogliosi i microgliosi, respectivament. En el



procés d'activació, aquestes cèl·lules sofreixen uns canvis morfològics, necessaris per dur a terme les funcions que realitzaran, relacionades amb la resposta inflamatòria.

El reconeixement dels nivells d'activació d'astròcits i de micròglia es du a terme per immunohistoquímica i histoquímica, a partir de les seccions tallades amb criostat (20 – 30 µm), dels cervells fixats amb paraformaldehid.

La GFAP (proteïna glial fibrilar acídica) actua com a marcador cel·lular dels astròcits. Aquesta proteïna és reconeguda per un anticòs primari (anti-GFAP), i aquest, al seu torn, és reconegut per un anticòs secundari marcat amb una peroxidasa, que permet la detecció dels nivells d'astròcits en els teixits estudiats mitjançant la reacció de la peroxidasa amb DAB (clorur de 3,3',4,4'-bifeniltetraamoni).

La detecció de micròglia activada es du a terme mitjançant el tractament amb lectina, glicoproteïna amb afinitat específica per la glucosamina, que s'uneix a les cèl·lules endotelials i a la micròglia.

Les quantificacions d'ambdós tipus de cèl·lules es realitzen a partir de fotografies analitzades amb el programa *Scion Image*.

### ***Tractament estadístic***

Les dades s'han analitzat mitjançant el programa SPSS. S'ha utilitzat el test estadístic ANOVA unifactorial i bifactorial i la prova t-Student. L'homogeneïtat de variàncies es va determinar mitjançant el mètode de Levene. En els casos en els que no es van obtenir variàncies homogènies els valors es van transformar logarítmicament, i si un cop transformats continuaven essent no homogenis es va utilitzar la prova no paramètrica de Kruskal-Wallis. Perquè unes dades es considerin significativament diferents s'ha pres com a grau de significació  $p \leq 0.05$ .

En el tractament estadístic no es té en compte el grup *sham*, ja que aquests animals no han estat criolesionat. Malgrat això, aquest grup es mostra en les gràfiques per poder visualitzar els efectes de la lesió.



# **Resultats i discussió**



## **IV. Síntesi de les formes metal·lades de MTC mitjançant tècniques d'enginyeria genètica**

L'eix central d'aquesta tesi doctoral ha estat l'estudi de la metal·lotioneïna MTC, del cranc *Callinectes sapidus*. Tots els treballs realitzats prèviament sobre aquesta proteïna s'havien dut a terme en el grup de recerca del Dr. M. Brouwer, a partir de la MT aïllada del cranc. Aquests estudis van permetre establir que MTC s'expressa essencialment en l'hepatopàncrees del cranc i, que en tractar l'animal amb un excés de coure, el nivell d'expressió d'aquesta proteïna s'incrementa significativament. Per obtenir suficient quantitat de la proteïna per la seva anàlisi induïren la seva expressió amb sals de coure, que subministraven als crancs a través de l'alimentació. Seguint aquest procediment, la proteïna es recuperava sempre coordinada a Cu(I).

Amb l'objectiu de caracteritzar el comportament de MTC en front diversos ions metàl·lics i fent ús d'una metodologia actualment força utilitzada per la comunitat científica que treballa amb MTs, ens vam plantejar obtenir MTC mitjançant tècniques d'enginyeria genètica.

### **IV.1. L'enginyeria genètica en la síntesi de metal·lotioneïnes**

L'obtenció d'una proteïna pot assolir-se mitjançant tres estratègies diferents. Una primera opció consisteix en la purificació del pèptid a partir d'òrgans o d'organismes sencers. Aquesta és una tasca difícil i llarga, que implica nombrosos passos per l'aïllament i purificació de la proteïna, i que, en conseqüència, no sempre du a mostres de la puresa necessària pel seu estudi posterior. La quantitat relativa de proteïna en la mostra inicial, la presència d'enzims proteolítics en l'òrgan de procedència, així com de potencials contaminants biològics, són paràmetres essencials a tenir en compte, ja que poden ser determinants a l'hora d'avaluar l'èxit de l'experiment. Els avantatges que ofereix aquesta metodologia són essencialment dos. La proteïna aïllada manté, en general, l'estructura nativa, servint així de model a l'hora d'avaluar altres mètodes d'obtenció. A més a més, la purificació directa de la proteïna a partir de l'organisme d'origen permet fer estudis a nivell fisiològic, com pot ser la

detecció de diferents isoformes o el reconeixement de quins òrgans mostren el grau màxim d'expressió.

Una alternativa a aquest procediment és la síntesi en fase sòlida. Aquesta és una bona opció per a pèptids de mida petita (~ 3000 Da) i amb aminoàcids estables front l'oxidació. Un avantatge addicional d'aquesta metodologia és que permet obtenir formes mutants de la proteïna o dominis constituents de la mateixa. A l'hora d'utilitzar aquesta estratègia en el cas de les MTs, un obstacle important és la presència d'un gran nombre de residus cisteïnics en la seva estructura primària, que presenten una elevada susceptibilitat a l'oxidació.

Una darrera opció a considerar és la síntesi recombinant de la proteïna, fent ús de l'enginyeria genètica. Aquesta tècnica ha arribat, al llarg de les dues darreres dècades, a un grau de maduració suficient perquè avui sigui teòricament possible la síntesi d'una proteïna de qualsevol ésser viu a partir de cultius de bacteris o de llevat, d'ús més habitual, o de cèl·lules d'insecte o mamífer, en casos més puntuals. Aquesta metodologia aprofita els mecanismes transcripcionals i traduccionals propis d'aquestes cèl·lules, que actuen com a cèl·lules hoste, per sintetitzar la proteïna recombinant, obtenint-se elevats nivells de puresa.

L'enginyeria genètica s'ha establert avui com la metodologia més adient per obtenir MTs en la major part de treballs que estudien aquestes proteïnes. Aquesta tècnica permet, suplementant el medi de cultiu amb una sal del metall desitjat, obtenir la metal·lotioneïna complexada a un ió metàl·lic en concret, si bé, en alguns casos, aquesta pot coordinar-se a altres metalls, inevitablement presents en els medis de cultiu.

La metal·lació de la proteïna en l'interior de la cèl·lula, abans d'ésser aïllada, és una característica important en l'obtenció de MTs, ja que estabilitza en gran mesura el seu elevat contingut en cisteïnes, molt més sensibles a l'oxidació quan es troben en la forma demetal·lada, apoMT, a pH fisiològic.

En els inicis de l'estudi de les metal·lotioneïnes en el sí del nostre grup de recerca, es va establir una col·laboració amb el grup liderat per la Dra. Roser González-Duarte, del Departament de Genètica de la UB, per tal de disposar de les proteïnes que es volien caracteritzar. Per obtenir les diverses MTs fou necessari posar a punt una metodologia que permetés sintetitzar-les, escollint-se les tècniques del DNA recombinant, entre les tres opcions abans detallades. Aquest treball es va desenvolupar en la Tesi de la Dra. Neus Cols Coll. En la present tesi doctoral s'ha emprat, en el

## L'enginyeria genètica en la síntesi de metal·lotioneïnes

Departament de Química de la UAB, la metodologia desenvolupada en la UB, per tal de sintetitzar les proteïnes i pèptids en estudi.

### IV.2. Preparació del sistema d'expressió de MTC

#### IV.2.1. Clonació del cDNA de MTC en un vector d'expressió

Per expressar la proteïna MTC es va haver de clonar el seu cDNA en un vector d'expressió. Dins de l'ampli ventall de vectors d'expressió disponibles, es va escollir el vector pGEX-4T-1, Figura III.3, pel conjunt d'avantatges que ofereix i que s'esmenten en l'apartat de Mètodes.

Aquest vector havia estat utilitzat prèviament en l'obtenció d'altres MTs, de manera que s'havia comprovat la seva eficàcia en l'expressió d'aquest tipus de proteïnes.<sup>22, 151, 153</sup> El desenvolupament de la metodologia necessària per obtenir una MT fent ús del vector d'expressió pGEX-4T-1, en la Tesi Doctoral d'una de les directores d'aquest treball, va facilitar la posta a punt d'aquest sistema en el nostre grup de recerca.

El cDNA de la MTC es va clonar en el vector pGEX-4T-1, procedint de manera que aquest fragment s'inserís el més pròxim possible a la regió de reconeixement de la trombina. Això permetia minimitzar el nombre d'aminoàcids addicionals que restarien enllaçats a l'extrem N-terminal de MTC un cop es digerís la proteïna de fusió amb la proteasa. Per tal d'analitzar les possibles posicions del vector per on es podia clonar el cDNA es van tenir en compte les dianes de restricció presents en la regió de clonatge (Figura III.3.a). La diana de restricció que permetia el nombre mínim d'aminoàcids addicionals era *Bam*HI, ja que inserint el cDNA per aquesta diana els únics residus que romandrien enllaçats a la MT després del tall amb la trombina serien Gly i Ser. Aquesta mateixa opció, havia estat escollida anteriorment en altres síntesis de MTs recombinants i s'havia comprovat que aquests dos aminoàcids no interferien en la capacitat coordinant de la proteïna.<sup>137, 151, 154</sup>

Per tal d'assegurar que el fragment de DNA a clonar només ho pogués fer en el sentit desitjat calia digerir el vector per una segona diana de restricció. L'elecció d'aquesta diana no estava sotmesa a cap limitació, per tant es va escollir *Eco*RI, ja que aquest enzim es un dels més utilitzats i presenta una elevada eficàcia de tall.

Determinades les dianes de restricció per on era convenient tallar pGEX-4T-1, calia comprovar si el clon subministrat pel Dr. Brouwer contenia aquestes dianes, per tal d'extreure l'esmentat cDNA del vector de clonatge i inserir-lo en el vector d'expressió.



El clon subministrat no incloïa les dianes escollides. En canvi, però, sí apareixia una diana *Bam*HI en l'interior del cDNA (Figura IV.1). Això va obligar a plantejar-se un canvi en l'estratègia a seguir. En primer lloc calia escollir una diana de restricció diferent a *Bam*HI per introduir al cDNA, però que fos, al seu torn, compatible amb aquesta, per poder dur a terme la posterior lligació amb el vector d'expressió.

```

Met                                diana BamHI
5' atg cct tgt gga tgc gga acg tca tgt aag tgt gga tcc ggc aag
tgc tgc tgc ggc tcc acc tgt aat tgc act acc tgt ccc agc aag
cag tcg tgt tcc tgt aac gat gga gca tgc gga tcc gcg tgc cag
tgc aaa acc tcc tgt tgc tgc ggc gcg gac tgt aag tgc agc cca
tgc cca atg aag taa 3'
Stop

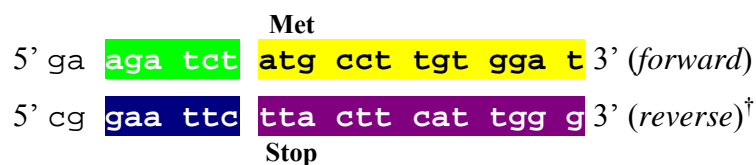
```

**Figura IV.1-** Seqüència del cDNA de la MTC.

Si bé és cert que la digestió amb un mateix enzim de restricció permet la unió posterior de dos fragments de DNA, en alguns casos també existeixen altres opcions. Per exemple, la digestió amb l'enzim *Bgl*III genera uns extrems compatibles amb els produïts per la digestió amb l'enzim *Bam*HI i fou, per tant, aquesta diana la que es va escollir per digerir el cDNA.

En segon lloc era necessari introduir al cDNA les dianes *Bgl*III a l'extrem 5' i *Eco*RI a l'extrem 3'. Aquest procés es va realitzar mitjançant la reacció en cadena de la polimerasa, PCR, reacció que permet l'obtenció de moltes rèpliques d'un fragment específic de DNA a partir d'uns encebadors que s'hi anellen, permetent la posterior elongació per l'acció d'una DNA polimerasa. Gràcies a aquests encebadors, degudament dissenyats, les rèpliques de DNA obtingudes poden incloure una determinada seqüència de nucleòtids als seus extrems, permetent la introducció de les dianes d'interès (veure l'apartat de Mètodes per més detalls).

Els encebadors utilitzats foren:



Aquests encebadors permetien introduir la diana *Bgl*II, **aga tct** i la diana *Eco*RI, **gaa ttc**, en els extrems corresponents del cDNA, per així poder inserir el fragment resultant en el vector d'expressió.

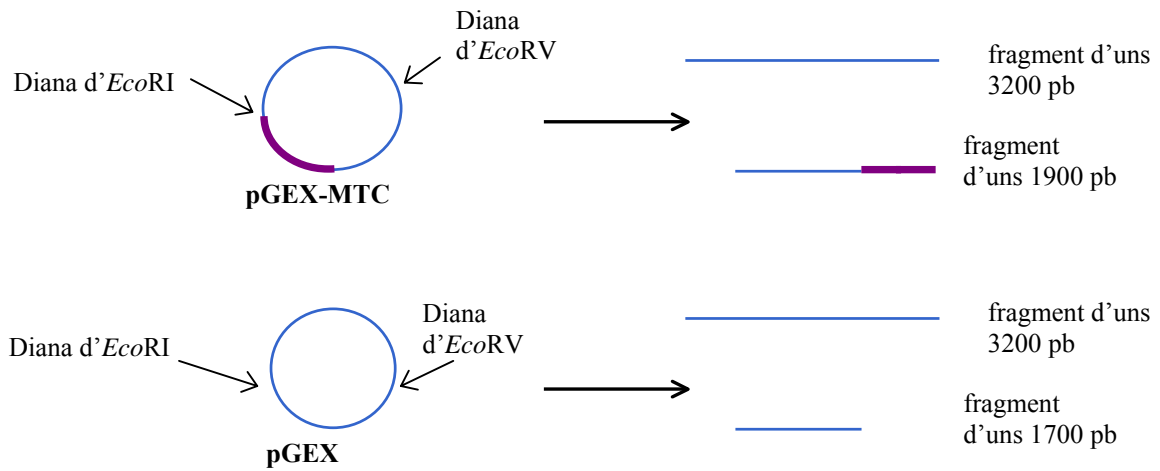
Tot seguit es va separar, mitjançant electroforesi en gel d'agarosa, el producte de l'amplificació, és a dir, el cDNA amb les dianes de restricció incorporades als extrems. Aquest fragment, es va purificar del gel i es va digerir amb els enzims *Bgl*II i *Eco*RI. Paral·lelament, es va dur a terme la digestió del vector pGEX-4T-1 amb els enzims *Bam*HI i *Eco*RI.

Es va realitzar la lligació dels productes resultants d'ambdues digestions, per tal d'obtenir el clon pGEX-MTC. Es van transformar cèl·lules d'*Escherichia coli* (soca DH5 $\alpha$ ) amb la barreja de lligació i es van sembrar els bacteris transformats en plaques amb medi de cultiu sòlid, amb ampicil·lina. Donat que el vector pGEX inclou el gen de resistència a l'ampicil·lina, només els bacteris que haguessin incorporat el vector podrien créixer en aquest medi.

Per tal de comprovar que es disposava del clon pGEX-MTC, es van fer cultius d'algunes de les colònies obtingudes en placa i se'n va aïllar el DNA plasmídic. El DNA corresponent al clon havia de tenir una mida més gran que la del vector pGEX sol. Per això, es van dissenyar unes digestions que permetessin observar aquesta diferència de mida. Així, realitzant les digestions de DNA plasmídic amb els enzims *Eco*RI i *Eco*RV (Figura IV.2) es podia distingir entre el DNA corresponent al clon pGEX-MTC i el DNA corresponent al vector pGEX sense el cDNA.

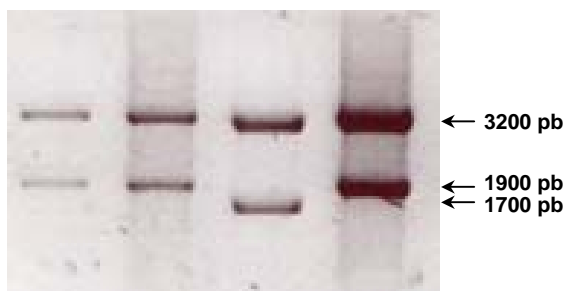
---

<sup>†</sup> Els nucleòtids indicats amb lletres sense subratllat representen les cues de nucleòtids addicionades per facilitar la digestió amb els enzims de restricció. Els nucleòtids indicats amb lletres subratllades en color verd i blau corresponen a les seqüències diana pels enzims *Bgl*II i *Eco*RI, respectivament. Els nucleòtids indicats amb lletres subratllades en color groc i violeta són les seqüències complementàries al cDNA, Figura IV.1.



**Figura IV.2.-** Digestió dels plasmidis pGEX-MTC i pGEX amb els enzims de restricció *EcoRI* i *EcoRV*.

A partir de l'anàlisi de la digestió de pGEX-MTC mitjançant electroforesi en gel d'agarosa (Figura IV.3) s'observaren dos fragments: un d'uns 3200 parells de bases (pb) i un altre, que contenia el cDNA, d'uns 1900 pb (Figura IV.3). Es tractà el DNA corresponent a pGEX amb els mateixos enzims. En aquests cas, també s'obtingueren dos fragments, però el més petit contenia únicament 1700 pb, Figura IV.3 (c), degut a que no contenia el cDNA de la MT. La mida de cada fragment es dedueix en compararlo amb un marcador que es carrega en el mateix gel, que conté uns fragments de DNA de mida coneguda.



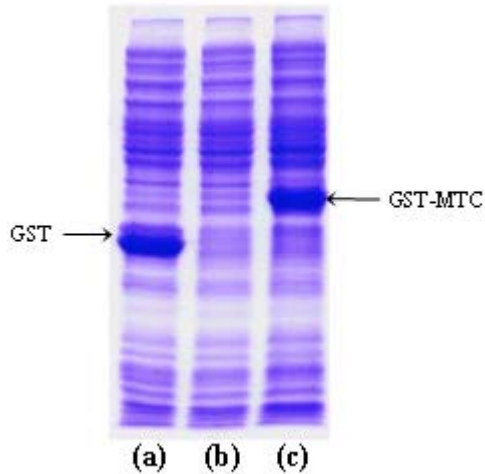
**Figura IV.3.-** Gel de DNA dels fragments de restricció resultants de la digestió amb *EcoRI* i *EcoRV* dels plasmidis pGEX-MTC (a, b i d) i pGEX (c). Les bandes que apareixen a ~ 1900 pb representen el fragment de pGEX-MTC que conté el cDNA.

Es van seleccionar dues colònies que contenen el clon pGEX-MTC i, es va seqüenciar el seu DNA plasmídic en el Servei de Seqüenciació dels Serveis Científicotècnics de la Universitat de Barcelona, per tal de comprovar que no s'havien introduït errors durant l'amplificació per PCR. Es va assajar la síntesi de proteïna mitjançant cultius d'*E. coli* a petita escala.

### **IV.2.2. Cultius a petita escala d'*E. coli* amb el clon pGEX-MTC**

Tot i que el vector d'expressió emprat en aquest treball ja s'havia utilitzat per expressar altres MTs caracteritzades pel nostre grup, això no implicava l'èxit en l'expressió de MTC, ja que aquest ve condicionat per les característiques de cada proteïna. Així doncs, fou necessari fer un assaig a petita escala per tal de comprovar que es produïa proteïna de fusió GST-MTC. Per aquest motiu es va transformar novament el clon pGEX-MTC en cèl·lules d'*E. coli*, però en aquest cas es va utilitzar una soca deficient en proteases (soca BL21), per tal de minimitzar la degradació de la proteïna recombinant i incrementar el rendiment.

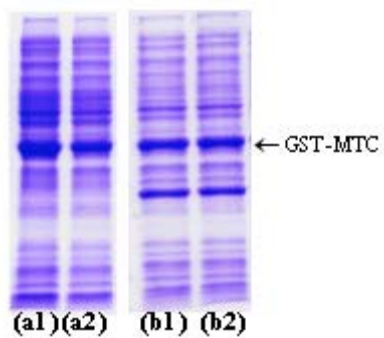
Es van preparar cultius a petita escala (veure Mètodes) de bacteris transformats amb el vector pGEX i de bacteris transformats amb el clon pGEX-MTC. De cada cultiu es van realitzar dues rèpliques, una s'induí amb IPTG després d'una hora de creixement i l'altre no s'induí. Després de tres hores de creixement, es van recollir les cèl·lules bacterianes i se'n va analitzar l'extracte proteic per electroforesi, en un gel desnaturalitzant de poliacrilamida (SDS-PAGE). La tinció amb Blau de Coomassie mostrà el patró de bandes que es presenta en la Figura IV.4, on s'observen els extractes proteics dels cultius d'*E. coli* amb pGEX, induït (a); i el cultiu d'*E. coli* amb pGEX-MTC, no induït (b) i induït (c). Es va utilitzar la mostra (a) com a control positiu, ja que, com s'ha indicat a Mètodes, el vector pGEX conté la seqüència que codifica per la proteïna GST, per tant, després de la inducció, i si les condicions són les idònies, s'hauria d'observar la síntesi de GST (d'una mida d'aproximadament 29 kDa). Aquesta proteïna apareix en la mostra (a) representada per la banda més intensa. El cultiu (b), no induït, només presenta les proteïnes pròpies del bacteri. En comparar el cultiu patró (a) amb (c), s'observa, en aquest últim, l'absència de GST i l'aparició d'una banda més intensa que correspon a la proteïna de fusió GST-MT, en una posició més endarrerida que la GST degut al seu major pes molecular (aproximadament 32 kDa).



**Figura IV.4.-** Gel de poliacrilamida de l'extracte total de les cèl·lules que (a) contenen el plasmidi pGEX i han estat induïdes amb IPTG, (b) contenen el plasmidi pGEX-MTC i no han estat induïdes amb IPTG i (c) contenen el plasmidi pGEX-MTC i han estat induïdes amb IPTG.

Tot i que aquests experiments indicaven que s'aconseguia la síntesi de proteïna recombinant amb aquest sistema, es va realitzar un nou assaig per tal de determinar si era possible incrementar la quantitat de proteïna, fent ús d'una soca d'*E. coli* amb algunes modificacions respecte a l'emprada en treballs anteriors.

Malgrat que el codi genètic és universal, és a dir, un codó codifica pel mateix aminoàcid en tots els organismes, aquest és també degenerat, ja que, un aminoàcid pot ésser codificat per diferents codons. Cada organisme presenta una preferència per uns codons determinats, de manera que un cDNA de mamífer, per exemple, pot tenir en la seva seqüència codons que no són utilitzats freqüentment pels bacteris. Per aquest motiu, s'han desenvolupat soques d'*E. coli*, modificades genèticament, amb còpies addicionals dels gens que codifiquen pels tRNAs que més freqüentment limiten la transcripció de proteïnes heteròlogues en aquests bacteris. Per determinar si es podia incrementar el rendiment de la síntesi de MTC mitjançant l'ús d'aquestes cèl·lules, es van realitzar assaigs amb la soca BL21 CodonPlus-RP, amb gens addicionals de tRNAs pels aminoàcids arginina i prolina, que podrien afavorir la transcripció de MTC, ja que aquesta proteïna conté 4 prolines en la seva estructura primària. L'anàlisi de l'extracte proteic, mitjançant SDS-PAGE (Figura IV.5), mostrà, però, que no hi havia un increment en la síntesi de proteïna recombinant en la nova soca d'*E. coli*. En base a aquests resultats, en els posteriors experiments es va utilitzar la soca BL21 convencional per dur a terme les síntesis de la proteïna.



**Figura IV.5.-** Gel de poliacrilamida de l'extracte total de les cèl·lules amb pGEX-MTC induïdes amb IPTG. **a1** i **a2** són cèl·lules de la soca BL21 i **b1** i **b2** són cèl·lules de la soca BL21 CodonPlus. Les bandes més intenses, que s'indiquen amb la fletxa, corresponen a la proteïna de fusió GST-MTC.

### IV.3. Obtenció de MTC en medis enriquits amb zinc

En els éssers vius, en condicions fisiològiques, les metal·lotioneïnes es troben complexades als metalls essencials zinc i coure. Tal com s'indica en la Introducció, la proteïna MTC no s'ha pogut aïllar directament de crancs "control" (crancs que no han estat tractats amb un suplement metàl·lic) i ha estat necessari obtenir-la a partir de crancs als quals se'ls ha subministrat una sal de coure, únic metall inductor. Aquests requeriments no han permès determinar quin és el contingut metàl·lic de la proteïna en condicions fisiològiques.<sup>90</sup>

L'estudi de les metal·lotioneïnes obtingudes mitjançant tècniques recombinants és, actualment, un dels procediments més estesos, pels avantatges que aquesta metodologia ofereix i que s'han comentat àmpliament en els apartats anteriors. Aquesta metodologia permet, addicionalment, dirigir el contingut metàl·lic de la proteïna que s'expressarà. Essent la caracterització de les metal·lotioneïnes enllaçades a metalls divalents una de les primeres estratègies a seguir per qualsevol MT, exceptuant algun cas puntual com la CUP1, es va iniciar l'estudi de la MTC expressant-la en medis rics en zinc. Cal destacar que les MTs coordinades a zinc són proteïnes, en general, més estables front l'oxidació que les que es troben coordinades a coure<sup>155-157</sup> i mostren una menor dificultat a l'hora de ser analitzades per tècniques com l'espectrometria de masses. L'estudi de les ZnMTs per UV també es veu simplificat respecte a l'estudi de les CuMTs, ja que els ions  $Zn^{2+}$  sempre es coordinen a les metal·lotioneïnes amb un entorn tetraèdric i, en canvi, el  $Cu^+$  presenta una major versatilitat en les seves geometries de coordinació, fent així que els corresponents espectres UV siguin més complexos.

L'obtenció d'una MT coordinada a zinc permet, a més a més, realitzar experiments de bescanvi per altres metalls que presentin una major afinitat pels tiolats cisteïnics, com el cadmi i el coure, i determinar així com es formen els diferents agregats metàl·lics mitjançant l'estudi de les espècies que es van generant durant les valoracions de les ZnMTs.

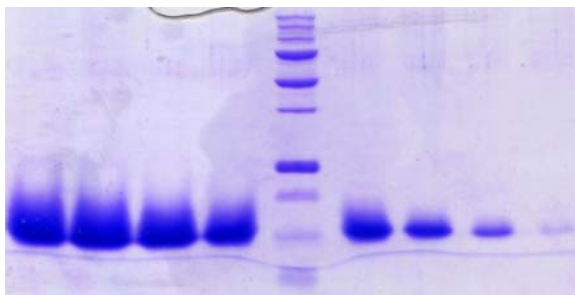
Com ja s'ha comentat anteriorment, la proteïna MTC pertany a la família de MTs de crustaci. La seva excepcional estructura primària i l'especificitat pel coure que presenta fan, però, que aquesta metal·lotioneïna mereixi una consideració diferencial, dins d'aquest grup. Per poder acotar al màxim en què consisteixen aquestes diferències, que fan tant peculiar MTC, semblava imprescindible comparar el seu comportament

front als metalls divalents, amb el de la resta de metal·lotioneïnes de crustaci, ja que la majoria d'aquestes s'han estudiat contenint zinc o cadmi.

### IV.3.1. Expressió i purificació de MTC obtinguda en medis rics en zinc

Es van dur a terme diverses síntesis de la proteïna MTC en medis rics en zinc. L'obtenció de la proteïna es va realitzar mitjançant cultius d'*E. coli* transformat amb el clon pGEX-MTC, induint la seva expressió amb IPTG i afavorint el plegament d'aquesta al voltant d'ions zinc, suplementant el medi amb  $ZnCl_2$  després de la inducció.

Es va recuperar la proteïna mitjançant els diferents passos de purificació descrits a Mètodes. En la Figura IV.6 es mostra com el pas final de la purificació, mitjançant cromatografia de filtració en gel, permeté recuperar la MTC pura.



**Figura IV.6.-** Gel de poliacrilamida de les fraccions de la cromatografia de filtració en gel que contenen proteïna, corresponent al darrer pas de la purificació de MTC. En la posició central s'observa el marcador de pes molecular.

L'addició dels ions metàl·lics en el medi de cultiu, per tal de facilitar el plegament de la proteïna al voltant d'aquests, és un paràmetre que pot influenciar en el rendiment de la síntesi, ja que l'elevada concentració de metall a la qual se sotmet el bacteri li pot resultar tòxica, interferint així en l'obtenció de la proteïna. Malgrat això, és un procediment molt habitual afegir les sals metàl·liques 30 minuts després de la inducció de la proteïna,<sup>38, 88, 151</sup> ja que, d'aquesta manera es permet al bacteri que iniciï l'expressió de la MT i poc després d'haver-se format el pèptid, en l'interior de la cèl·lula, aquest ja té disponibles els metalls en el citoplasma per poder-s'hi coordinar.

En aquesta tesi doctoral es va observar que, deixant un interval de temps superior entre la inducció i l'addició dels metalls (entre 60 i 90 minuts), s'incrementava el rendiment de la síntesi, obtenint-se una major quantitat de proteïna. Cal tenir en



compte, però, que aquest procediment pot afectar al contingut metàl·lic total de la proteïna recuperada, tot i que no es va avaluar en aquest treball si realment aquesta modificació del protocol de síntesi comportava canvis en la coordinació de la MT. Per aquest motiu, només es va allargar el temps entre la inducció i l'addició dels metalls quan l'objectiu era obtenir una elevada quantitat de proteïna per formar apoMTC, on el contingut inicial en metalls i l'estat de reducció de la proteïna no afectaven als estudis que es volien realitzar posteriorment.

Els rendiments obtinguts en aquestes expressions de ZnMTC oscil·laven entre 0.5 i 1.5 mg de MTC per litre de cultiu, assolint-se els màxims en aquelles síntesis en les quals s'havia addicionat el zinc entre 60 i 90 minuts després de la inducció. Aquests resultats incrementen significativament els rendiments aconseguits en les síntesis d'altres ZnMTs en les que s'utilitzava el mateix sistema d'expressió.<sup>28, 151</sup>

Les tècniques que s'utilitzen habitualment per estudiar la capacitat coordinant d'una metal·lotioneïna (essencialment UV, CD i ESI-MS) precisen de mostres a concentracions de l'ordre de  $\mu\text{M}$ . En canvi, la caracterització estructural d'una MT requereix disposar d'una elevada quantitat de proteïna (de l'ordre de mM). L'obtenció de grans quantitats de MTC, per obtenir dades estructurals d'aquesta proteïna, es va assolir mitjançant síntesis a més gran escala (en alguns casos es van realitzar síntesis de 50 litres de medi de cultiu en la Planta Pilot de Fermentació de la UAB).

### **IV.3.2. Caracterització de ZnMTC**

Les mostres de ZnMTC obtingudes en aquestes síntesis es van caracteritzar mitjançant un conjunt de tècniques per tal d'avaluar el rendiment, la integritat de la proteïna recuperada, el grau d'oxidació, l'estequiometria Zn/MT total, l'estequiometria de les diferents espècies en solució i les propietats espectroscòpiques. Del total de síntesis realitzades, s'han pres a mode d'exemple les tres expressions més representatives per tal de descriure les característiques de la proteïna MTC obtinguda per enginyeria genètica en medis rics en zinc. Un recull d'aquestes dades es representa en la Taula IV.1.

## SÍNTESI DE LES FORMES METAL·LADES DE MTC

**Taula IV.1.-** Dades analítiques, espectromètriques i espectroscòpiques de tres síntesis de MTC en medi ric en Zn(II).

Síntesi	ICP-AES		ESI-MS <sup>a</sup>	CD
	(Contingut metàl·lic)			
Síntesi 1 <b>SZn1</b>	5 Zn/MT 0 Cu/MT		<b>Zn<sub>4</sub>MTC</b> <b>Zn<sub>5</sub>MTC</b> Zn <sub>6</sub> MTC	
Síntesi 2 <b>SZn2</b>	5.5 Zn/MT 0 Cu/MT		Zn <sub>6</sub> MTC <b>Zn<sub>7</sub>MTC</b> Zn <sub>8</sub> MTC	
Síntesi 3 <b>SZn3</b>	4 Zn/MT 0 Cu/MT		<b>Zn<sub>6</sub>MTC</b> <b>Zn<sub>7</sub>MTC</b>	

<sup>a</sup> Les espècies que predominen en la mostra analitzada, d'acord amb les dades d'espectrometria de masses, s'indiquen en negreta.

Abans d'analitzar les dades de la Taula IV.1, cal remarcar que en l'obtenció d'algunes metal·lotioneïnes recombinants, especialment les expressades en medis rics en cadmi, s'ha observat la participació d'ions sulfur en la coordinació dels metalls de la proteïna.<sup>158</sup> La presència d'aquests ions formant part dels agregats CdMT comporta:

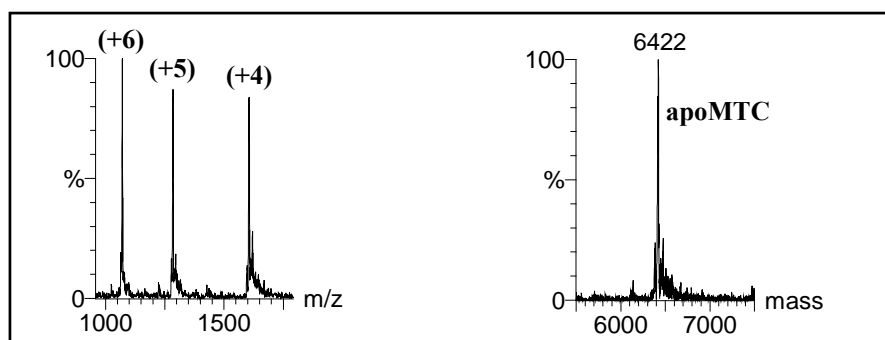
- ✓ l'aparició de pics en els espectres ESI-MS que no es corresponen amb la massa de cap espècie metall-MT possible
- ✓ absorcions en dicroïsm circular en el rang comprès entre 260 i 280 nm, que no corresponen als cromòfors EZ, els quals apareixen a longituds d'ona inferiors a 260 nm
- ✓ discrepàncies en els resultats obtinguts per ICP-AES referents al contingut total d'ions Cd<sup>2+</sup> per molècula de proteïna
- ✓ valors negatius del grau d'oxidació de la proteïna, quan es determina aquest paràmetre mitjançant la reacció amb l'àcid 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoic), DTNB (mètode d'Ellman)

En algunes de les síntesis de MTC es van obtenir valors d'oxidació negatius, amb una concentració de tiols reduïts major que la concentració total de tiols, determinades mitjançant la reacció amb DTNB i per ICP-AES, respectivament. Per tal d'avaluar si la proteïna MTC incorporava ions sulfur durant la seva obtenció, es van realitzar els dos assaigs descrits a Mètodes, que permeten detectar aquest ió. En cap cas no es va observar la presència de  $S^{2-}$ , amb la qual cosa es va descartar la participació d'aquests anions en els agregats metàl·lics obtinguts en el nostre treball.

Les metal·lotioneïnes, mostren una gran susceptibilitat a l'oxidació com a conseqüència del seu elevat contingut en cisteïnes i a la labilitat dels enllaços que mantenen amb els metalls. Les dades obtingudes per MTC, Taula IV.1, respecte el contingut total en metall, no sempre concorden amb les espècies observades per espectrometria de masses, denotant que, en alguns casos, les mostres de ZnMTC recuperades presentaven un cert grau d'oxidació.

La reacció entre MTC i el DTNB, emprada per determinar el grau d'oxidació de la proteïna (segons el mètode d'Ellman <sup>142</sup>), mostra una cinètica molt ràpida, indicant que les cisteïnes d'aquesta MT presenten una elevada reactivitat. Aquesta propietat ha dificultat l'ús d'aquest procediment per calcular el nombre de tiols reduïts. En processos posteriors es va assajar l'ús d'una altra metodologia per determinar el grau d'oxidació, fent reaccionar la proteïna amb la molècula 2,2'-ditiodipiridina, DTP.<sup>146</sup> Aquest mètode va permetre determinar els valors d'oxidació de les noves mostres analitzades.

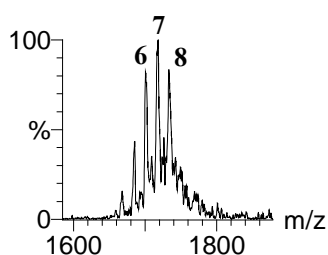
Per tal d'avaluar la integritat de la proteïna es va realitzar l'estudi per ESI-MS de les mostres de MTC, sota condicions àcides (pH 1.5). En tots els casos, el resultat d'aquesta anàlisi mostrava un espectre on l'espècie clarament majoritària tenia la massa corresponent a l'apo-MTC, 6422 Da de massa molecular experimental, Figura IV.7, que concorda amb el valor teòric, 6421.5 Da.



**Figura IV.7.-** A l'esquerra es mostra l'espectre d'ESI-MS de ZnMTC, enregistrat a pH 1.5. Els senyals a 1071, 1284 i 1606 corresponen a la mateixa espècie amb diferent càrrega (indicada entre parèntesi). A la dreta està representat l'espectre que s'obté de la deconvolució de l'anterior.

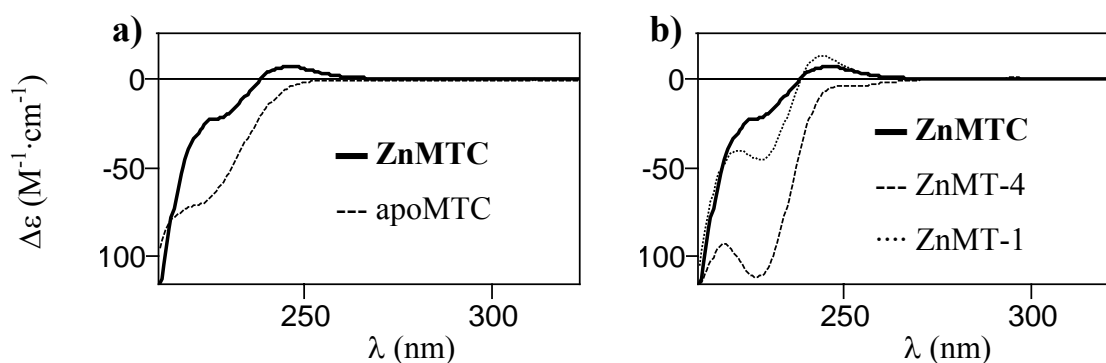
Les dades analítiques del contingut total en Zn, Cu i S, obtingudes per ICP-AES, indicaven que la proteïna es trobava coordinada a zinc, amb una relació estequiomètrica de  $Zn_{4.5.5}$ -MTC (Taula IV.1).

Per tal d'estudiar la distribució d'espècies ZnMTC presents en solució es va enregistrar l'espectre d'ESI-MS a pH neutre (Figura IV.8). Es va observar per a totes les síntesis la coexistència de diverses espècies ZnMTC, ja descrit per altres MTs.<sup>4</sup> L'anàlisi detallada de les dades de la Taula IV.1 mostra que les estequiometries  $Zn_6$ MTC i  $Zn_7$ MTC són les predominants, i suggereix una capacitat coordinant de la proteïna que permet enllaçar un vuitè equivalent de zinc.



**Figura IV.8.-** Espectre d'ESI-MS de la mostra corresponent a SZn2. Els pics assenyalats com a 6, 7 i 8 representen les espècies  $Zn_6$ MTC,  $Zn_7$ MTC i  $Zn_8$ MTC, respectivament.

Mitjançant l'estudi dels espectres de diroïsmes circulars, CD, de les diferents mostres es va analitzar el grau de plegament de la proteïna. Com s'observa en la Taula IV.1, en tots els casos l'espectre de CD es caracteritza per una banda poc intensa, centrada al voltant de 247 nm i, una esquena a 225 nm, degudes a les transicions LMCT  $Zn(II)$ -SCys.<sup>159</sup> Aquestes bandes són indicatives de l'estructuració que adopta la proteïna quan es coordina als ions zinc. En la Figura IV.9.a es compara l'espectre de CD de la ZnMTC amb el de l'apoMTC. La superposició d'aquests dos espectres mostra les diferències entre la proteïna demetal·lada, sense plegament i que, per tant, presenta únicament bandes per sota dels 240 nm, corresponents a l'enllaç peptídic,<sup>160</sup> i la proteïna enllaçada a zinc, que ha adoptat una estructura tridimensional definida com a conseqüència de la coordinació al zinc.



**Figura IV.9.- a)** Espectre de CD de les formes ZnMTC i apoMTC; **b)** Espectre de CD de ZnMT-1 i ZnMT-4, de mamífer, i ZnMTC, de crustaci.

Cada isoforma de MT presenta un plegament característic quan s'enllaça a un metall determinat. Veiem, per exemple, en la Figura IV.9.b, com la coordinació a zinc en el cas de MT-1 de mamífer comporta un grau d'estructuració molt superior al que presenta MT-4.<sup>29</sup> En el cas de MTC s'observa una situació intermèdia entre les dues MTs de mamífer presentades. Aquesta dada dóna un primer indicatiu de la importància que poden tenir els ions divalents en aquesta proteïna, malgrat la condició de MT induïda específicament per coure, que se li ha atribuït a l'induir-se la seva expressió únicament per aquest metall.

També es va enregistrar l'espectre UV de les ZnMTC per tal de comprovar que aquestes presentessin les absorpcions descrites per una metal·lotioneïna coordinada a zinc. L'espectre UV d'una apoMT es caracteritza per la manca d'absorpcions per sobre dels 240 nm, degut a l'absència d'aminoàcids aromàtics i, per la intensa absorció al voltant de 190 nm, que correspon, essencialment, a transicions del grup amida de la cadena polipeptídica.<sup>161</sup> La coordinació d'una MT a ions  $\text{Zn}^{2+}$  provoca l'aparició d'una nova banda no resolta, que s'observa com una esquena entre 200 i 240 nm, corresponent a les transicions electròniques de transferència de càrrega zinc-tiolat.<sup>156</sup> L'espectre de ZnMTC comparat amb el de la proteïna demetal·lada reflecteix la coordinació dels ions de zinc a la MT (Figura IV.10).

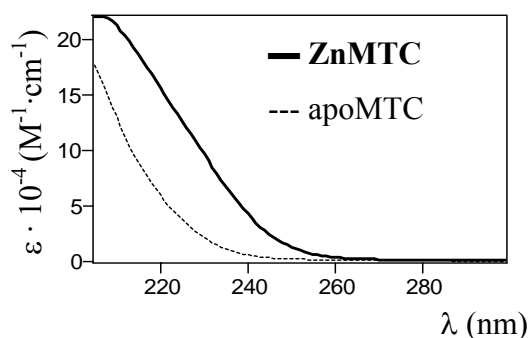


Figura IV.10.- Espectre UV d'apoMTC i ZnMTC.

L'estudi per dicroïsmes de MTC enllaçada a zinc també permet afirmar que, l'estructura tridimensional que adopta aquesta proteïna amb aquest metall és apreciablement diferent a la que mostren altres MTs de crustaci, com s'observa comparant els corresponents espectres de MTC i de MTH, metal·lotioneïna del llamàntol *Homarus americanus*, quan estan coordinades a zinc (Figura IV.11). Possiblement això s'explica pel fet que la proteïna MTC, tot i pertànyer a la família de metal·lotioneïnes de crustaci, presenta una estructura primària significativament diferent a la de les MTs d'aquest grup (Figura I.7) i un contingut en residus cisteïnics clarament superior, 21 en lloc dels 18 – 19 habituals, a més a més de contenir dos triplets de cisteïna.

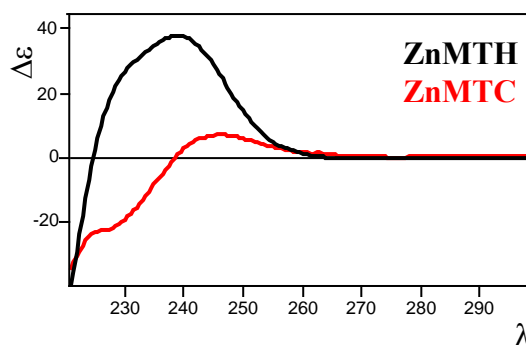


Figura IV.11.- Espectres de CD de MTC i MTH (*d'Homarus americanus*),<sup>28</sup> enllaçades a zinc, ZnMTC i ZnMTH respectivament.

Les MTs de crustaci descrites fins ara presenten un clar predomini de l'espècie  $Zn_6MT$ ,<sup>22, 28, 123</sup> o  $Cd_6MT$ , en el cas que s'hagi aïllat la proteïna amb aquest ió divalent.<sup>162</sup> Tenint en compte que el nombre de cisteïnes és un paràmetre decisiu a l'hora de definir la capacitat coordinant d'una MT, és probable que MTC presenti una major capacitat d'enllaçar metalls que les restants metal·lotioneïnes de crustaci.

Les dades experimentals observades per MTC mostren la presència de diferents espècies, amb un important predomini de  $Zn_6MTC$  i  $Zn_7MTC$ . La formació, en alguns

casos, d'espècies amb estequiometria  $Zn_8MTC$  denota la presència d'una o més posicions de coordinació més febles, que permeten a la proteïna ampliar el nombre d'ions enllaçats.

Aquestes dades indiquen que el comportament de MTC front els metalls divalents és singular, mostrant com el seu major nombre de cisteïnes i la presència de triplets en la seva estructura primària es tradueix en un increment de la capacitat coordinant. Aquests primers indicis requerien d'un estudi més profund que permetés definir amb més exactitud les propietats de les diverses espècies  $ZnMTC$  observades. La reconstitució de la proteïna, a partir de la forma apoMTC, fou una de les metodologies escollides per aprofundir en els coneixements de  $ZnMTC$ , com es detalla més endavant.

### **IV.4. Obtenció de MTC en medis enriquits amb coure**

La proteïna MTC, com s'ha esmentat anteriorment, només s'ha aïllat de *C. sapidus* com a CuMTC, després d'un tractament del cranc amb coure. L'obtenció de MTC recombinant en medis enriquits amb coure permetrà aportar dades complementàries als resultats descrits per M. Brouwer<sup>134, 136</sup> sobre el comportament d'aquesta proteïna front al coure.

Hi ha diversos precedents en la bibliografia en els quals s'ha expressat una MT mitjançant cultius d'*E. coli* suplementats amb sals de Cu(II), metall que s'incorpora en la proteïna després d'haver-se reduït a Cu(I). Amb aquesta metodologia s'han obtingut, en alguns casos, espècies homometàl·liques de coure<sup>163</sup> i en altres, espècies heterometàl·liques, que contenen zinc i coure.<sup>12</sup>

#### **IV.4.1. Expressió i purificació de MTC en presència de coure**

Aquestes síntesis s'efectuaren seguint el mateix protocol utilitzat en les expressions de MTC en medis rics en zinc, addicionant CuSO<sub>4</sub> per aconseguir que el medi d'expressió de la proteïna estigués enriquït amb aquest metall. En aquest cas, seguint el protocol estàndard, l'addició de les sals metàl·liques es va realitzar 30 minuts després de la inducció.

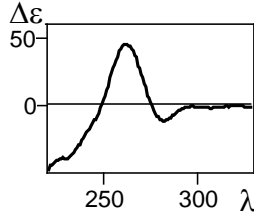
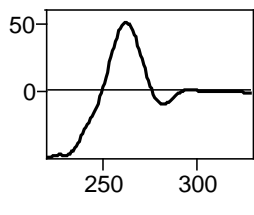
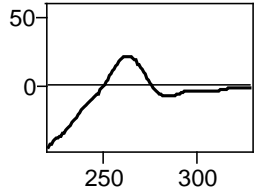
#### **IV.4.2. Caracterització de les espècies obtingudes en medis rics en coure**

Les mostres obtingudes en les tres síntesis de MTC en medis suplementats amb coure presenten el conjunt de característiques analítiques i espectroscòpiques que es recullen en la Taula IV.2.

El grau d'oxidació en les MTs que contenen ions coure no es pot determinar mitjançant el mètode d'Ellman<sup>164</sup> o la reacció amb ditiopiridina (DTP),<sup>146</sup> procediments que es duen a terme sota unes condicions que no permeten assegurar que tots els enllaços Cu(I)-SCys s'hagin trencat,<sup>165</sup> requisit indispensable per tal d'analitzar el contingut total en cisteïnes reduïdes.



**Taula IV.2.-** Dades analítiques, espectromètriques i espectroscòpiques de les tres síntesis de MTC en medi ric en Cu(II).

Síntesi	ICP-AES		ESI-MS <sup>a</sup>	CD
	(Contingut metà·lic)			
Síntesi 1 <b>SCu1</b>	6 Cu/MT 2 Zn/MT		<b>M<sub>8-13</sub>MTC</b> <b>M<sub>12</sub>MTC</b>	
Síntesi 2 <b>SCu2</b>	6 Cu/MT 3 Zn/MT		<b>M<sub>8-12</sub>MTC</b>	
Síntesi 3 <b>SCu3</b>	11 Cu/MT 0 Zn/MT		<b>Cu<sub>12</sub>MTC</b> <b>Cu<sub>13</sub>MTC</b> Cu <sub>14</sub> MTC	

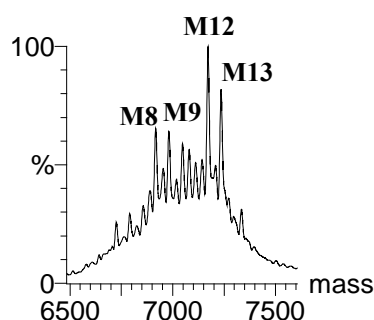
<sup>a</sup> Les espècies que predominen en la mostra analitzada s'indiquen en negreta.

Mitjançant l'anàlisi per ICP-AES (Taula IV.2), s'avaluà el contingut total en zinc i coure de les mostres de MTC obtingudes. En alguns casos, SCu1 i SCu2, s'observà que, tot i no haver suplementat el medi de cultiu amb zinc, la proteïna incorporava aquest metall en els seus agregats metà·lics, ja que és un ió que es troba entre els components del medi de cultiu. En canvi, en altres casos, la proteïna MTC es va estructurar coordinant únicament ions coure (SCu3).

L'obtenció, en algunes síntesis, d'espècies homometà·liques de coure i, en d'altres, espècies heterometà·liques, per una mateixa MT, havia estat ja descrit anteriorment per MT-4 de ratolí i per la metal·lotioneïna de *Saccharomyces cerevisiae* Crs5.<sup>29, 166</sup> En aquest darrer treball es proposa que el grau d'oxigenació del cultiu en el qual s'està expressant la proteïna és determinant en els agregats metà·lics que presentarà la proteïna recuperada, ja que aquest paràmetre altera els nivells de coure intracel·lulars en *E. coli*.

Les síntesis de la proteïna MTC a petita i mitjana escala<sup>†</sup> no permeten controlar el grau d'oxigenació, únicament es pot dur terme aquest control en síntesis a gran escala, realitzades en fermentadors. Totes les síntesis de MTC en medis enriquits amb coure s'efectuaren a mitjana escala, per aquest motiu no es pot descartar que aquest sigui el paràmetre que hagi provocat el diferent comportament de la proteïna front unes condicions aparentment anàlogues.

L'estudi per ESI-MS de les espècies en solució presents en aquestes mostres indicà que, en el cas d'haver-hi zinc coordinat a la proteïna, les estequiometries que adopta MTC es troben en el rang entre  $M_{8-13}MTC$ , essent  $M_x$  la suma d'ions  $Zn^{2+}$  i  $Cu^+$  coordinats a la proteïna. Aquests dos metalls són pràcticament indistingibles per aquesta tècnica degut a la proximitat de les seves masses. Tant en SCu1 (amb 6 Cu/MTC i 2 Zn/MTC, segons dades d'ICP, Taula IV.2) com en SCu2 (amb 6 Cu/MTC i 3 Zn/MTC, segons dades d'ICP, Taula IV.2) s'observa una prevalença de l'espècie  $M_{12}MTC$  (Figura IV.12).



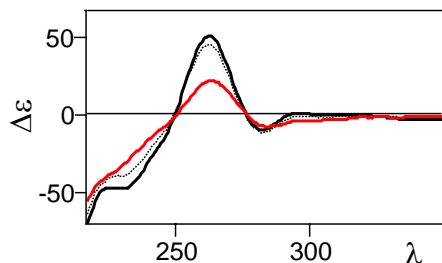
**Figura IV.12.-** Espectre d'ESI-MS de la mostra corresponent a SCu1.

La síntesi en la qual s'ha obtingut una mostra de MTC homometal·lica de coure, SCu3 (amb 11 Cu/MTC i 0 Zn/MTC, segons dades d'ICP, Taula IV.2), presenta un espectre de masses en el qual es pot observar una barreja de diferents espècies CuMTC, entre les quals destaquen  $Cu_{12}MTC$ ,  $Cu_{13}MTC$  i  $Cu_{14}MTC$ , essent  $Cu_{13}MTC$  l'espècie majoritària.

L'anàlisi del plegament de la proteïna en les mostres de CuMTC i Cu,ZnMTC per CD indica un grau de quiralitat especialment elevat per les espècies heterometal·liques i, en canvi, una important disminució i eixamplament del senyal en la mostra que no conté ions zinc, Figura IV.13, suggerint un paper estructural d'aquest ió

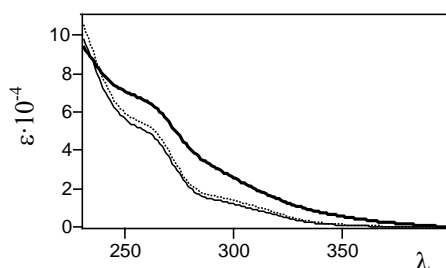
<sup>†</sup> Les síntesis a petita i mitjana escala s'efectuen en tubs d'assaig o erlenmeyers i el volum màxim del cultiu es troba aproximadament entre 1 i 2 l.

en MTC. Els espectres enregistrats per totes tres síntesis mostren dues bandes principals a (+) 263 nm i a (-) 283 nm (Taula IV.2), característiques de les CuMTs.<sup>21, 45</sup>



**Figura IV.13.-** Espectres de CD de la SCu1 (···), SCu2 (—) i SCu3 (—).

Els espectres electrònics mostren les típiques absorcions descrites per les CuMTs,<sup>21</sup> que apareixen per sota dels 400 nm i presenten dues importants bandes, no resoltes, al voltant de 263 i 300 nm. En el cas de SCu3 (11 Cu/MTC i 0 Zn/MTC, Taula IV.2), la intensitat de les bandes és clarament superior a la de les altres dues mostres (Figura IV.14), fet que, si s'assumeix que els coeficients d'extinció molar d'aquestes absorcions es mantenen constants, estaria reflexant el nombre d'ions coure que es troben coordinats a la proteïna, que és gairebé el doble en SCu3 (Taula IV.2). Les contribucions dels ions zinc en les absorcions que s'observen queden emmascarades sota les bandes corresponents a la cadena peptídica i als enllaços Cu-tiolat.



**Figura IV.14.-** Espectre UV de SCu1 (—), SCu2 (···) i SCu3 (—).

### **IV.4.3. Caracterització de les espècies obtingudes en medis rics en coure i zinc**

L'obtenció d'espècies heterometal·liques Cu,ZnMTC en algunes de les síntesis de la proteïna, en medis enriquits únicament amb coure i, el major grau de quiralitat que mostraven aquestes, suggeria un cert paper dels ions Zn(II) en el plegament d'aquesta MT. Per tal d'avaluar aquesta hipòtesi, es dugueren a terme diverses síntesis de MTC en medis enriquits amb coure i zinc, facilitant a la proteïna l'accés a aquest ió divalent.

Per les mostres obtingudes en les cinc síntesis de MTC en medis suplementats amb aquests dos metalls també s'ha confeccionat una taula resum amb les dades més representatives (Taula IV.3).

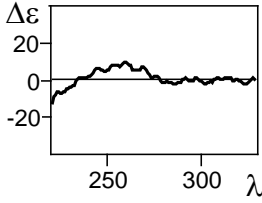
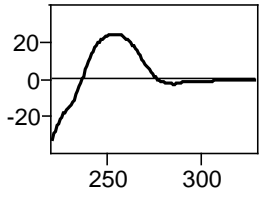
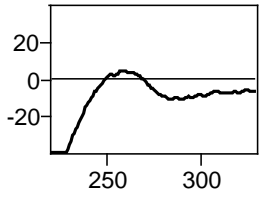
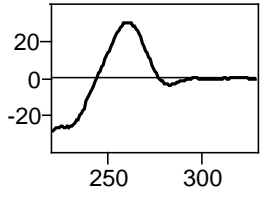
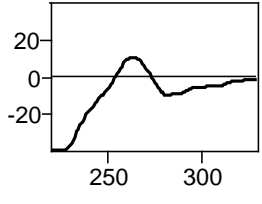
Amb l'objectiu d'extreure el màxim d'informació dels resultats obtinguts sota aquestes condicions s'ha optat per dividir-los en dos grups, en funció de si les espècies resultants de la síntesi eren homometal·liques de coure o si eren heterometal·liques de zinc i coure:

a) Les síntesis en les quals es va recuperar la proteïna com un complex homometal·lic de coure són SCuZn1, SCuZn3 i SCuZn5. Les dues primeres mostres gairebé no es van poder caracteritzar ja que, degut a la baixa concentració de proteïna, no es va poder enregistrar el seu espectre ESI-MS, i els respectius espectres de CD presentaven gairebé absència de senyal (Taula IV.3). En el cas de la mostra SCuZn5, de la qual sí es va aconseguir enregistrar l'espectre ESI-MS, s'observava un ampli rang d'espècies CuMTC amb relacions estequiomètriques que anaven des de 9 fins a 14. El seu espectre de CD era similar al que s'havia obtingut per la mostra SCu3 (11 Cu/MTC i 0 Zn/MTC, segons dades d'ICP, Taula IV.2), mostrant les bandes típiques de CuMT, però amb una intensitat clarament inferior a la que presentaven les mostres corresponents a SCu1 i SCu2 (SCu1: 6 Cu/MTC i 2 Zn/MTC, i SCu2: 6 Cu/MTC i 3 Zn/MTC, Taula IV.2), Figura IV.15.

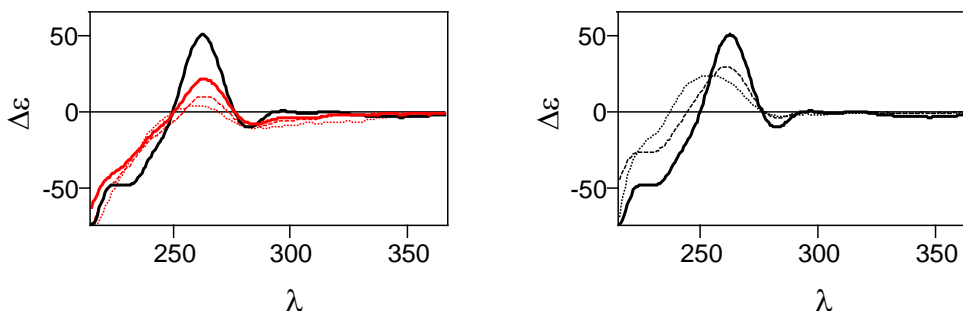
b) Les dues síntesis en les quals s'observava la incorporació de zinc a la proteïna, SCuZn2 i SCuZn4, presentaven diferents continguts metàl·lics (en el cas de SCuZn2 el contingut en coure era gairebé la meitat de l'enregistrat per SCuZn4). Aquesta gradació en el contingut en zinc de la proteïna purificada fou de gran ajuda per entendre l'evolució espectral de les diferents espècies aïllades de MTC amb coure. En els espectres de CD d'aquestes mostres s'observà que, si el contingut en coure era inferior al de zinc, com passa en SCuZn2, la corba que s'obtenia era més ampla i gairebé no es

distingia la banda a (-) 283 nm. En canvi, en la mostra SCuZn4, on el contingut metàl·lic era pràcticament anàleg al de SCu1 i SCu2 (SCu1: 6 Cu/MTC i 2 Zn/MTC, i SCu2: 6 Cu/MTC i 3 Zn/MTC, Taula IV.2), la corba que s'obtingué mostrava un perfil més característic d'una CuMT, Figura IV.15. Aquestes dades indiquen que MTC s'estructura millor si conté algun ió Zn(II) i, si la relació Cu/Zn es troba entre 2 – 3.

**Taula IV.3.-** Dades analítiques, espectromètriques i espectroscòpiques de les cinc síntesis de MTC en medi ric en Cu(II) i Zn(II).

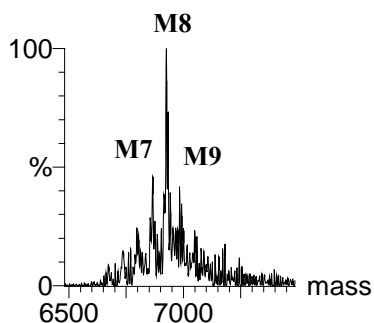
Síntesi	ICP-AES (Contingut metàl·lic)	ESI-MS <sup>a</sup>	CD
Síntesi 1 <b>SCuZn1</b>	11 Cu/MT 0.5 Zn/MT	-	
Síntesi 2 <b>SCuZn2</b>	3 Cu/MT 5 Zn/MT	<b>M<sub>8</sub>MTC</b>	
Síntesi 3 <b>SCuZn3</b>	12 Cu/MT 0 Zn/MT	-	
Síntesi 4 <b>SCuZn4</b>	5 Cu/MT 3 Zn/MT	<b>M<sub>8</sub>MTC</b> <b>M<sub>9</sub>MTC</b> <b>M<sub>12</sub>MTC</b>	
Síntesi 5 <b>SCuZn5</b>	11 Cu/MT 0.5 Zn/MT	<b>Cu<sub>9-14</sub>MTC</b>	

<sup>a</sup> Les espècies que predominen en la mostra analitzada s'indiquen en negreta. En el cas de les SCuZn1 i SCuZn3 no s'ha pogut determinar mitjançant ESI-MS les espècies presents en solució, degut a la baixa concentració de les mostres.



**Figura IV.15.-** Espectres de CD de la SCu2 (—), amb 6 Cu/MTC i 3 Zn/MTC, SCu3 (—), amb 11 Cu/MTC i 0 Zn/MTC, SCuZn3 (···), amb 12 Cu/MTC i 0 Zn/MTC, i SCuZn5 (---), amb 11 Cu/MTC i 0.5 Zn/MTC, a l'esquerra i, SCu2 (—), SCuZn2 (···), amb 3 Cu/MTC i 5 Zn/MTC i SCuZn4 (---), amb 5 Cu/MTC i 3 Zn/MTC, a la dreta.

La distribució d'espècies en solució que s'obté per ESI-MS corrobora les conclusions extretes dels espectres de CD. En primer lloc, la mostra SCuZn2 presenta una espècie clarament majoritària amb estequiometria  $M_8MTC$  (Figura IV.16). Tenint en compte les dades obtingudes per ICP-AES del contingut total en zinc i coure ( $Zn/MTC = 3$  i  $Cu/MTC = 5$ , Taula IV.3) s'observa que la suma d'ambdós metalls és exactament 8, amb la qual cosa sembla probable que  $M_8MTC$  correspongui a  $Zn_5Cu_3MTC$ .



**Figura IV.16.-** Espectre d'ESI-MS de SCuZn2. El contingut total en metalls d'aquesta proteïna és de 3 Cu/MT i 5 Zn/MT.

En segon lloc, la mostra SCuZn4 presenta una distribució de les espècies metall-MTC gairebé equivalent a les descrites per SCu1 i SCu2, la qual cosa explica la similitud en els espectres de CD, tot i que no s'assoleix la intensitat de les bandes observada per les mostres que s'havien obtingut en medis enriquits únicament amb coure.

#### **IV.4.4. Paper del zinc en la MTC quan s'expressa en medis rics en coure**

L'obtenció d'una MT en medis enriquits amb coure i en medis enriquits amb coure i zinc és una estratègia que havia estat utilitzada anteriorment amb la MT del llamàntol *Homarus americanus*, per tal d'avaluar el paper del zinc en aquesta proteïna quan es coordina a coure.<sup>28</sup> En aquest estudi es va observar que l'addició de zinc en el medi de cultiu facilitava la formació dels agregats Cu,ZnMTH, obtenint-se continguts metàl·lics superiors als recuperats quan el medi únicament s'havia suplementat amb coure. En base a aquests resultats, es proposava que MTH inicialment es formava com un complex de zinc i, posteriorment, aquest zinc es substituïa parcialment per ions Cu(I).

En MTC, obtinguda en medis rics en coure, s'ha observat que, independentment de si el medi s'ha enriquit o no amb ions zinc, la proteïna pot formar complexos homometàl·lics CuMTC, o heterometàl·lics Cu,ZnMTC. No és, per tant, el suplement en zinc, un paràmetre limitant en aquestes síntesis.

Tenint en compte els diversos resultats obtinguts en medis suplementats amb coure, s'ha pogut determinar que, en els casos en els quals la proteïna ha incorporat dos o tres equivalents de zinc i 6 equivalents de coure, els graus de quiralitat assolits són màxims. Denotant així una certa importància del zinc en el plegament d'aquesta proteïna.

L'obtenció, en alguns casos, de complexos homometàl·lics de coure, CuMTC, permeten afirmar que, aquesta proteïna és capaç d'enllaçar únicament aquest metall, sense precisar dels ions Zn(II), si les condicions són les adequades, però els agregats resultants no presenten el grau de quiralitat assolit en els casos en els que la proteïna incorpora també zinc en la seva estructura.

En els estudis de la proteïna MTC nativa, realitzats pel grup del Dr. Brouwer, ja s'havia observat que, en els crancs tractats amb coure i cadmi simultàniament, la proteïna recuperada contenia una certa proporció de cadmi coordinada a MTC, suggerint la participació de metalls divalents en l'estructura de la proteïna.<sup>135</sup> Malauradament, no es disposen de dades de masses d'aquestes mostres, que permetin establir una comparació més exhaustiva entre els nostres resultats i els obtinguts en el laboratori del Dr. Brouwer.









## **V. Obtenció de les formes holoMTC per reconstitució d'apoMTC amb diferents metalls**

### **V.1. Avantatges i requisits de la metodologia de la reconstitució**

La primera metodologia desenvolupada per obtenir MTs fou la purificació a partir d'organismes sencers o d'òrgans aïllats. Seguint aquest procediment, el contingut metàl·lic amb el qual es recupera la proteïna està altament condicionat al tipus d'inducció utilitzada per sobreexpressar la MT i a l'entorn en el que es troba aquesta quan es sintetitza.<sup>148</sup>

L'obtenció de la MT per enginyeria genètica, metodologia desenvolupada posteriorment, permet un major control dels metalls que es coordinaran a la proteïna, mitjançant l'enriquiment del medi de cultiu amb els ions desitjats. Aquesta característica és possible, ja que el sistema que indueix l'expressió de la proteïna no depèn, en aquest cas, dels metalls que s'addicionen en el medi. Malgrat això, els requeriments nutricionals de les cèl·lules on s'expressarà la proteïna fan que sempre hi hagi en el medi de cultiu diversos ions metàl·lics àvids d'ésser coordinats per la MT, obtenint-se, per exemple, espècies heterometàl·liques Cu,ZnMT en cultius que només s'han suplementat amb coure.

La necessitat de substituir els metalls coordinats a les MTs natives per altres ions metàl·lics va sorgir essencialment per dos motius:

- ✓ generar noves formes homometàl·liques que permetessin establir comparacions amb les espècies natives
- ✓ introduir metalls que aportessin més informació estructural mitjançant tècniques espectroscòpiques, com el  $\text{Co}^{2+}$ ,<sup>31, 167</sup> el  $\text{Fe}^{2+}$ <sup>168, 169</sup> i el  $^{113}\text{Cd}^{2+}$ ,<sup>39, 170</sup> que serveixen com a model del  $\text{Zn}^{2+}$ , donat que tots aquests ions tenen preferència per la geometria tetraèdrica.

Els mètodes utilitzats per bescanviar els metalls d'una MT són el desplaçament directe d'un ió per un altre o bé a partir de la forma demetal·lada, apoMT, reconstituir la proteïna amb el nou metall. Per dur a terme el desplaçament directe d'un ió per un altre cal tenir en compte: a) les constants d'afinitat dels metalls pels tiolats cisteïnics de les

MTs i b) l'estructura de la pròpia proteïna que, en alguns casos, dificulta l'accés a alguna posició de coordinació, obstaculitzant així la substitució de l'ió,<sup>171</sup> malgrat que el metall que es vulgui incorporar presenti una major afinitat pels tiols. Per aquests motius, sovint és necessari el previ aïllament de la forma apoMT, procedint posteriorment a la reconstitució per obtenir la nova forma metal·lada desitjada.<sup>148</sup>

Actualment l'ús de la reconstitució s'ha estès considerablement, degut a tot un conjunt d'avantatges addicionals que comporta, si bé requereix una manipulació curiosa per evitar l'oxidació de la proteïna al llarg del procés. La reconstitució és una metodologia que facilita l'obtenció de mostres homogènies de metall-MT, a partir de la forma apoMT, que ha d'estar totalment reduïda i lliure de metalls, a la qual s'addicionen els ions metàl·lics a pH àcid i es basifica per permetre la coordinació dels metalls.<sup>148</sup>

L'estudi de les propietats coordinants i estructurals d'una metal·lotioneïna es fa, en molts casos, partint de la proteïna reconstituïda amb el metall d'interès. L'aïllament de la proteïna en forma homometàl·lica simplifica l'estudi d'una proteïna, ja que, quan aquesta es troba coordinada a diferents metalls la interpretació dels resultats espectroscòpics i espectromètrics pot esdevenir una tasca de gran complexitat. Els avantatges que ofereix aquesta metodologia són també indispensables en treballs de determinació estructural. La reconstitució d'una MT amb ions metàl·lics actius en ressonància magnètica nuclear, com el <sup>113</sup>Cd, permet una millor caracterització de la proteïna mitjançant l'ús d'aquesta tècnica.<sup>10, 34</sup>

L'obtenció d'algunes MTs per síntesi en fase sòlida precisa també de la reconstitució de la proteïna amb el metall desitjat, ja que aquest mètode d'obtenció recupera la MT en forma demetal·lada, fent indispensable un segon pas en el qual s'han d'incorporar els ions metàl·lics.<sup>13, 50, 172</sup>

La proteïna MTC sintetitzada mitjançant enginyeria genètica sempre s'ha recuperat com una mescla d'espècies, tant si s'ha obtingut en medis enriquits amb zinc com s'ha obtingut en medis enriquits amb coure. La presència d'aquest equilibri entre diverses espècies metall-MTC es pot atribuir, en uns casos, a una parcial oxidació de la mostra i, en altres casos, a l'existència de posicions de coordinació més febles. També s'ha observat que, quan el medi de cultiu es suplementa amb coure, sovint s'obtenen espècies heterometàl·liques Cu,ZnMTC. Per tal de realitzar un estudi més a fons de les propietats coordinants de MTC, treballant amb mostres el més homogènies possibles, es va plantejar posar a punt la metodologia de la reconstitució de MTs, desenvolupada pel Dr. M. Vašák.<sup>148</sup>

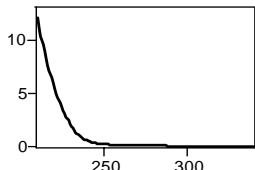
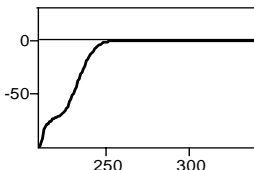
## V.2. Preparació i caracterització d'apoMTC

L'obtenció de la proteïna MTC reduïda i lliure de metalls es va dur a terme a partir de la ZnMTC recombinant, aïllada dels cultius d'*E. coli* enriquits amb zinc. Per realitzar aquest procés es va fer una estada a la Universitat de Zúrich, per aprendre la metodologia desenvolupada pel Dr. M. Vašák,<sup>148</sup> la qual va requerir d'alguna modificació (veure Mètodes).

L'acidificació de ZnMTC fins a desplaçar totalment els ions metàl·lics coordinats a la proteïna i la purificació mitjançant cromatografia d'exclusió per mida, permeté recuperar la proteïna en forma d'apoMTC. A valors de pH baixos la proteïna demetal·lada és més estable front a l'oxidació,<sup>160</sup> per la qual cosa aquesta es mantingué a un pH àcid fins que es requerí per dur a terme la seva reconstitució.

Per tal de comprovar la puresa i la qualitat de l'apoMTC, aquesta es va analitzar mitjançant diferents tècniques, com es mostra en la Taula V.1.

**Taula V.1.-** Dades analítiques, espectromètriques i espectroscòpiques de l'apoMTC.

ICP-AES	DTP	UV	CD
Zn/MTC < 0.1 Cu/MTC < 0.1	grau d'oxidació < 5 %		

L'anàlisi mitjançant ICP-AES del contingut en zinc, coure i sofre va confirmar que la proteïna estava lliure de metalls. En tots els casos s'obtingué una relació Zn/MTC i Cu/MTC inferior a 0.1.

Es va avaluar el grau d'oxidació mitjançant la reacció de la proteïna amb 2,2'-ditiopiridina, DTP. Aquesta reacció permet calcular la concentració de tiols reduïts. Juntament amb les dades del contingut en sofre, obtingudes per ICP-AES, es va determinar el grau d'oxidació de la mostra. S'ha considerat que la proteïna estava totalment reduïda quan el grau d'oxidació calculat a partir d'aquestes dues tècniques ha estat inferior al 5 %.

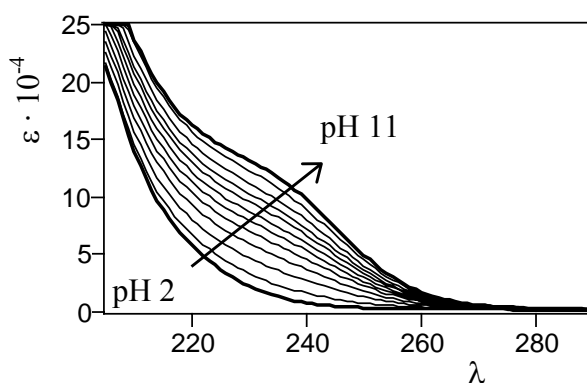
La puresa de la mostra també es va analitzar mitjançant tècniques espectroscòpiques. L'absència de residus aromàtics en MTC fa que l'espectre UV de la proteïna demetal·lada presenti una absorció nul·la a longituds d'ona superiors a 240 nm

(Taula V.1). L'espectre de CD de l'apoMTC és el típic d'una proteïna sense estructura, mostrant únicament les transicions corresponents a l'enllaç peptídic, en la regió situada per sota dels 240 nm.<sup>173</sup>

### *Determinació de la constant d'acidesa dels grups tiol i del coeficient d'extinció molar dels respectius tiolats de les cisteïnes de MTC*

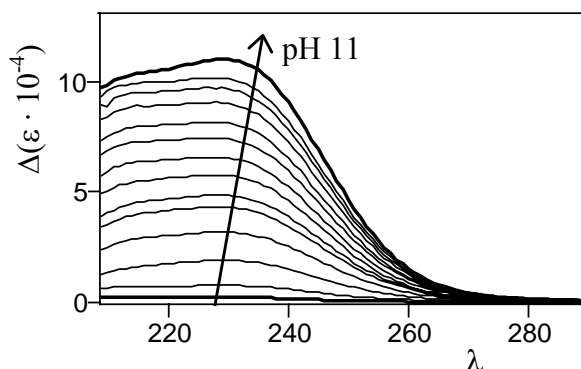
La caracterització de l'apoMTC mitjançant la valoració d'aquesta amb una base, seguida per espectroscòpia electrònica, permet determinar simultàniament la constant d'acidesa dels grups tiol i el coeficient d'extinció molar dels respectius tiolats. Aquestes dades seran utilitzades posteriorment per determinar la constant aparent de coordinació de MTC vers el cadmi (apartat V.5) i la possible existència de cisteïnes lliures en les diferents espècies metal·lades que forma aquesta proteïna (apartat V.6).

Els tiolats cisteïnics lliures presenten una intensa absorció característica, amb un màxim situat entre 230 i 240 nm, que apareix en els espectres electrònics de les apoMTs quan es basifica la solució fins a desprotonar els seus tiols,<sup>160</sup> Figura V.1. Tots els espectres electrònics que es mostren a partir d'ara representen el coeficient d'extinció molar en funció de la longitud d'ona. El coeficient d'extinció molar s'ha obtingut de dividir l'absorbància mesurada per la concentració de la proteïna (M) i el pas de llum de la cubeta (1 cm).



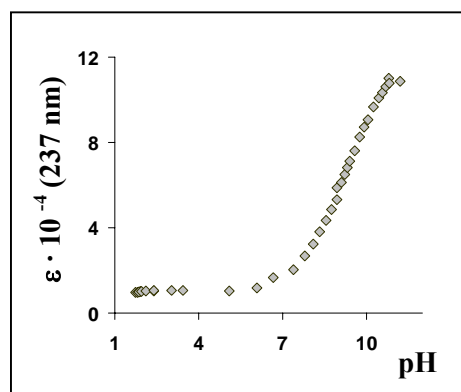
**Figura V.1.-** Espectres d'absorció obtinguts de la valoració d'apoMTC amb NaOH.

Aquesta absorció s'aprecia més clarament si es transforma la figura anterior, representant els espectres de diferència. Per obtenir aquests nous espectres es resta de cada espectre original el corresponent a la proteïna de partida, a pH 2, totalment protonada (Figura V.2).



**Figura V.2.-** Espectres electrònics de diferència obtinguts de restar l'espectre de l'apoMTC a pH 2 als espectre d'apoMTC als diferents valors de pH.

En el gràfic representat en la Figura V.3, confeccionat a partir de la valoració d'apoMTC amb NaOH, es mostren els diferents coeficients d'extinció que presenta la proteïna a 237 nm, en funció del pH. El punt d'inflexió d'aquesta corba, a un pH de 8.9, correspon al valor de  $pK_a$  mig de les 21 cisteïnes de la MTC, determinat gràficament. El programa pHab2000 també permet obtenir un valor de  $pK_a$ , utilitzant els 26 espectres que s'han enregistrat en el rang de longituds d'ona comprès entre 230 i 300 nm, a diferents valors de pH, compresos entre 2.4 i 10.7. Fent ús d'aquest programa es trobà, després de 6 iteracions, un valor de  $pK_a$  de  $9.05 \pm 0.01$ . Aquest valor concorda amb els trobats en la bibliografia per a altres MTs: 8.9 per a les isoformes MT-1 i MT-2 de conill<sup>160</sup> i 9.25 per a la MT d'eriçó de mar.<sup>174</sup>



**Figura V.3.-** Representació del valor de  $\epsilon$  en funció del pH, a 237 nm, en la valoració d'apoMTC amb NaOH.

La valoració d'apoMTC amb NaOH també permeté determinar el coeficient d'extinció molar del grup tiol desprotonat ( $5 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1} / \text{Cys}$ ), dividint el valor màxim de  $\epsilon$  a 237 nm ( $1.1 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ) pel nombre total de cisteïnes (21). El valor obtingut és coherent amb els descrits per a altres pèptids i proteïnes.<sup>129, 174, 175</sup>

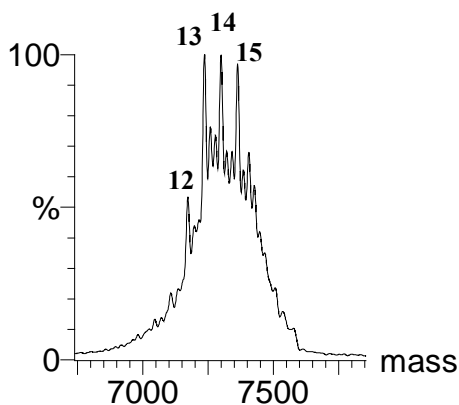
### V.3. Reconstitució d'apoMTC amb Cu(I)

L'obtenció d'una espècie homometàl·lica de coure de la proteïna MTC mitjançant reconstitució de la forma apo era un projecte que es plantejà per poder comparar la mostra resultant amb les dades de la proteïna recombinant, exposades en l'apartat IV.

Existeixen pocs precedents en la bibliografia on s'hagi aconseguit satisfactòriament la reconstitució d'una MT amb coure. Destaquen entre ells l'obtenció de l'agregat  $\text{Cu}_4\beta\text{MT-3}$ , de mamífer,<sup>45</sup> molt estable front l'oxidació, i la reconstitució d'un pèptid obtingut per síntesi en fase sòlida, corresponent a una forma truncada de la MT de *Saccharomyces cerevisiae*, CUP1.<sup>13</sup> Aquest fet avança ja les dificultats que presenta aquest procediment.

Es va realitzar la reconstitució d'apoMTC amb ions  $\text{Cu}^+$ , segons es descriu a Mètodes. Es realitzà l'experiment en absència de  $\beta$ -mercaptoetanol, per evitar possibles interaccions d'aquest agent reductor amb el coure, com a efecte del seu caràcter coordinant. L'espectre d'ESI-MS enregistrat per aquesta mostra es representa en la Figura V.4, on s'observa la formació de diverses espècies, entre les que destaquen  $\text{Cu}_{12}\text{MTC}$ ,  $\text{Cu}_{13}\text{MTC}$ ,  $\text{Cu}_{14}\text{MTC}$  i  $\text{Cu}_{15}\text{MTC}$ . El contingut total en coure d'aquesta mostra, determinat per ICP-AES, era de  $13 \pm 2$  Cu/MTC.

S'observa que mitjançant la reconstitució s'obtenen complexos CuMTC d'estequiometria superior als assolits per la proteïna recombinant, en les síntesis  $\text{SCu}_3$  (Taula IV.2) i  $\text{SCuZn}_5$  (Taula IV.3), realitzades en medis enriquits amb coure, en les quals no s'observa la formació d'espècies amb estequiometria superior a  $\text{Cu}_{14}\text{MTC}$ .



**Figura V.4.-** Espectre d'ESI-MS resultant de la deconvolució de l'espectre original enregistrat per la mostra obtinguda de la reconstitució d'apoMTC amb coure. El número indicat sobre els pics més importants representen l'estequiometria Cu/MTC de l'espècie corresponent.



Aquests resultats permeten proposar, per aquesta MT, una elevada capacitat coordinant en vers al coure, mostrant unes estequiometries Cu/proteïna superiors a les previstes en base al seu contingut en cisteïnes i a les dades disponibles en la bibliografia. Els resultats obtinguts en els estudis del Dr. Brouwer, a partir de la proteïna nativa, indicaven que el contingut en coure que assoliria MTC en els crancs tractats amb aquest metall era de 10 equivalents,<sup>†,134, 136</sup> valor lleugerament inferior als observats per la proteïna recombinant i, significativament inferior als assolits amb la reconstitució. Cal tenir en compte que l'accessibilitat del coure a la MT en l'interior d'una cèl·lula, en l'estat d'oxidació adequat ( $\text{Cu}^+$ ), depèn de moltes variables i no és tant fàcilment controlable com un procés *in vitro*, on s'addiciona el metall, en l'estat d'oxidació desitjat, directament a una solució que únicament conté la proteïna.

La major part dels treballs que estudien les MTs amb coure només avaluen el contingut metàl·lic global de la proteïna, sovint determinant-lo mitjançant tècniques espectroscòpiques. Es troben pocs estudis que analitzin l'estequiometria de les diferents espècies CuMT fent ús de l'espectrometria de masses,<sup>29, 176, 177</sup> sovint per les dificultats que presenta aquesta tècnica a l'hora d'estudiar els complexos de MTs amb coure (ionització de les molècules deficient...)<sup>176</sup>. Això, ha dificultat la comparació dels nostres resultats amb els d'altres MTs.

Malgrat s'hagi pogut extreure alguna conclusió de les dades obtingudes de la reconstitució d'apoMTC amb coure, la finalitat d'aquest experiment era l'obtenció de mostres homogènies. No havent assolit, doncs, aquest objectiu, degut essencialment a la complexitat inherent de treballar amb Cu(I), ió amb una important activitat redox, els nous assaigs de reconstitució es dugueren a terme amb Zn(II) i Cd(II).

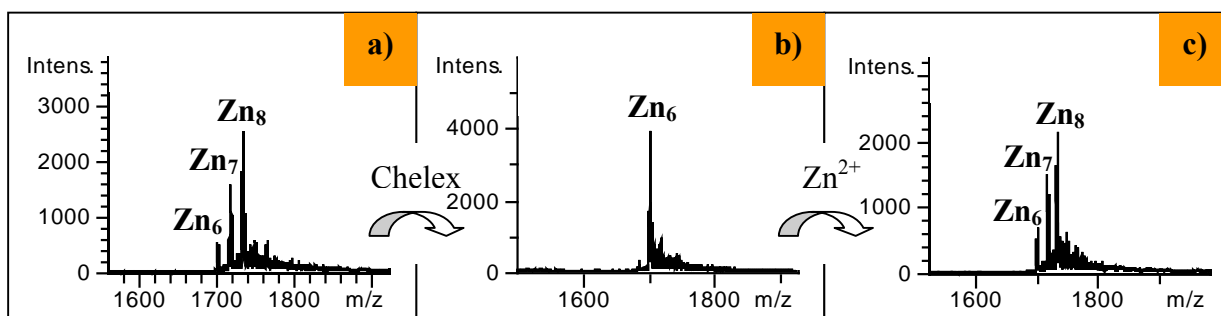
---

<sup>†</sup> Cal tenir en compte que la determinació de l'estequiometria coure/MTC, per Brouwer i col·laboradors, es dugué a terme abans de conèixer la seqüència de la proteïna i partia d'una premissa errònia, ja que es considerava que MTC contenia 18 cisteïnes, quan realment en té 21. Per aquest motiu el càlcul d'ions coure per MTC d'aquestes referències precisa d'una revisió considerant el nombre real de cisteïnes.

## V.4. Reconstitució d'apoMTC amb Zn(II): dinàmica de les posicions de coordinació

Els resultats obtinguts en la purificació de MTC, a partir dels cultius d'*E. coli* enriquits amb zinc, mostraren un important predomini en solució de les espècies  $Zn_6MTC$  i  $Zn_7MTC$ , observant-se també, en alguns casos, la formació de l'espècie amb 8 ions  $Zn^{2+}$ . Aquestes dades suggerien l'existència d'un equilibri entre diferents espècies  $ZnMTC$ , afavorit, probablement, per una naturalesa més dèbil d'algunes de les posicions de coordinació al zinc. Per tal d'ampliar la caracterització d'aquestes espècies  $ZnMTC$ , i determinar quantes posicions de coordinació febles conté aquesta proteïna, es plantejà la reconstitució amb Zn(II).

L'addició de 8.5 equivalents de zinc a l'apoMTC i l'ajust del pH fins a la neutralitat, permeté recuperar una mostra de  $ZnMTC$ , amb grau d'oxidació inferior al 5 % (segons la reacció amb DTP), formada per una mescla d'espècies que incloïa  $Zn_6MTC$ ,  $Zn_7MTC$  i  $Zn_8MTC$ . (Figura V.5.a).



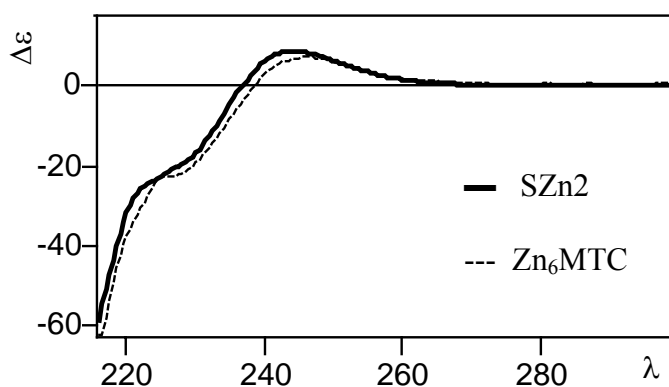
**Figura V.5.-** Espectres d'ESI-MS de la mostra obtinguda de (a) la reconstitució d'apoMTC amb zinc (b), de la incubació d'aquesta amb la resina Chelex 100 (c) i després de l'addició de 2 equivalents de zinc a la mostra de  $Zn_6MTC$ .

De nou, es recuperà una mostra formada per un conjunt d'espècies que coexistien en solució, anàlogament al que s'havia observat per la proteïna recombinant. El procés de reconstitució, en general, permet obtenir mostres de MT totalment reduïdes i homogènies. El fet d'obtenir, mitjançant aquesta metodologia, una mescla d'espècies, reforçà la hipòtesi proposada en el capítol anterior, en la qual es suggeria la presència, en MTC, de posicions de coordinació més febles. Un assaig mitjançant la resina quelant Chelex 100 permeté determinar el nombre d'ions  $Zn(II)$  que es troben enllaçats fortament a la proteïna. La proteïna aïllada del tractament amb Chelex fou analitzada

per ESI-MS i es determinà que l'espècie predominant en solució era  $Zn_6MTC$ , la qual cosa indica que la setena i vuitena posició de coordinació són més febles i faciliten que MTC estableixi equilibris entre aquestes espècies en presència d'un excés del metall. L'addició de dos equivalents de zinc a una mostra de  $Zn_6MTC$  revelà com de nou aquesta proteïna recuperava l'equilibri entre les espècies amb 6, 7 i 8 ions Zn(II), Figura V.5.

S'estableix, doncs, que en el cas de ZnMTC, per tal d'assolir una mostra homogènia, cal que el procés de reconstitució inclogui un tractament que elimini els ions addicionals, que interaccionen més feblement amb la proteïna i, que generen la mescla d'espècies que sovint presenta MTC.

L'estudi per CD d'una mostra que conté més d'una espècie en solució ens dóna una informació global de totes aquestes, sumant les diferents contribucions que aporta cadascuna d'elles. En l'anàlisi per CD de la mostra de ZnMTC aïllada del cultiu d'*E. coli* SZn2, on es determinà per ESI-MS la presència de  $Zn_6MTC$ ,  $Zn_7MTC$  i  $Zn_8MTC$ , s'obtingué una corba representativa de l'estructura de les tres espècies. En canvi, en l'espectre de CD de  $Zn_6MTC$ , obtinguda del tractament amb Chelex, la corba resultant és indicativa, essencialment, de l'estructura de l'espècie majoritària en solució,  $Zn_6MTC$ . La superposició d'aquests dos espectres, Figura V.6, mostra que ambdues corbes són pràcticament equivalents, la qual cosa indica la conservació de l'estructura de la proteïna. Aquesta dada reafirma la hipòtesi d'unes posicions de coordinació més febles. Tenint en compte que la mescla d'espècies  $Zn_6MTC$ ,  $Zn_7MTC$  i  $Zn_8MTC$ , de la mostra SZn2, presenta les mateixes contribucions en l'espectre de CD, que l'espècie  $Zn_6MTC$  sola, és de preveure que aquests dos ions Zn(II) addicionals, es trobin situats en una zona superficial de la proteïna, sense alterar apreciablement la conformació que adopta  $Zn_6MTC$  i mostrant una major labilitat que els 6 zincs restants.



**Figura V.6.-** Espectre de CD de la mostra SZn2 (que conté  $Zn_6MTC$ ,  $Zn_7MTC$  i  $Zn_8MTC$ ) i la mostra obtinguda de la reconstitució d'apoMTC amb zinc.

La capacitat de MTC d'incorporar fins a dos ions Zn(II) addicionals, amb relativa facilitat, suggereix la presència de cisteïnes lliures, que no participen en la coordinació del metall en Zn<sub>6</sub>MTC, però que permeten la captació de més zinc en presència d'un excés d'aquest metall, estabilitzant espècies d'estequiometria superior i, sense modificar significativament l'estructura de la proteïna. Aquesta hipòtesi explicaria la reactivitat de l'espècie Zn<sub>6</sub>MTC front la presència d'un excés de Zn(II), generant espècies de major nuclearitat. Cal recordar que en la seqüència d'aminoàcids d'aquesta proteïna es troben dos triplets de cisteïnes, propietat que pot estar forçant una participació parcial d'aquests aminoàcids en la formació dels agregats metàl·lics més estables. L'increment en el nombre de cisteïnes totals, però, justificaria la major capacitat coordinant observada, que permet a MTC enllaçar fins a 8 ions Zn(II), a diferència dels 6 ions Zn(II) trobats en altres MTs de crustaci.<sup>22, 28</sup>

## V.5. Reconstitució d'apoMTC amb Cd(II): dinàmica de les posicions de coordinació

El cadmi és un metall tòxic del qual no es coneix cap paper biològic, exceptuant el que desenvolupa com a part del centre actiu d'un enzim, en una alga marina.<sup>178</sup> Aquest ió es pot acumular en els organismes com a conseqüència de la seva avidesa pels grups tiol, trobant-se, en casos d'intoxicació per cadmi, coordinat a proteïnes amb un elevat contingut en cisteïnes, com és el cas de les metal·lotioneïnes.<sup>179</sup>

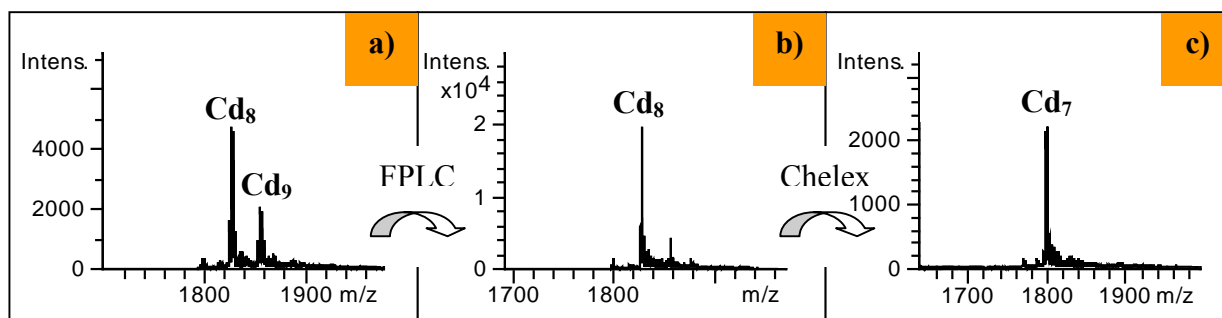
La capacitat del cadmi per enllaçar-se a residus que contenen sofre, oxigen o nitrogen, com a àtoms donadors, provoquen el desplaçament del calci, zinc o ferro en moltes metal·loproteïnes i per tant, la presència de cadmi pot alterar els processos metabòlics d'aquests metalls essencials.<sup>54, 179</sup> El cadmi i el zinc comparteixen diverses propietats: ambdós metalls formen cations divalents,<sup>180</sup> amb configuració electrònica d<sup>10</sup> i, una geometria de coordinació essencialment tetraèdrica.

En mamífers, l'òrgan més afectat per una intoxicació amb cadmi és el ronyó, on aquest metall s'acumula especialment coordinat a les metal·lotioneïnes.<sup>181, 182</sup> En aquestes proteïnes s'observa una substitució total o parcial del zinc pel cadmi, fet que provoca que en molts casos les MTs s'aïllin contenint ambdós metalls.<sup>183-185</sup>

Sovint, s'han caracteritzat les MTs contenint cadmi, en lloc de zinc o coure, per les avantatges que aquest ió presenta: important inducció de moltes MTs, propietats coordinants semblants a les del zinc, isòtops actius en RMN i característiques espectroscòpiques que simplifiquen la interpretació de les dades. En l'estudi de les MTs per UV-Vis, per exemple, les bandes de transferència de càrrega corresponents al cromòfor Cd(II)-tiolat donen, en molts casos, més informació dels agregats metàl·lics que forma la proteïna que les bandes corresponents al cromòfor Zn(II)-tiolat, ja que les primeres apareixen més ben resoltes respecte a les transicions de la cadena peptídica i en permeten una caracterització més a fons.<sup>186, 187</sup>

Seguint la mateixa metodologia descrita per a la reconstitució de l'apoMTC amb zinc es va procedir a la reconstitució amb cadmi. La proteïna s'obtingué gairebé en la seva totalitat en forma de Cd<sub>8</sub>MTC, i en alguns casos també s'observà la formació de Cd<sub>9</sub>MTC, com a espècie minoritària (Figura V.7).

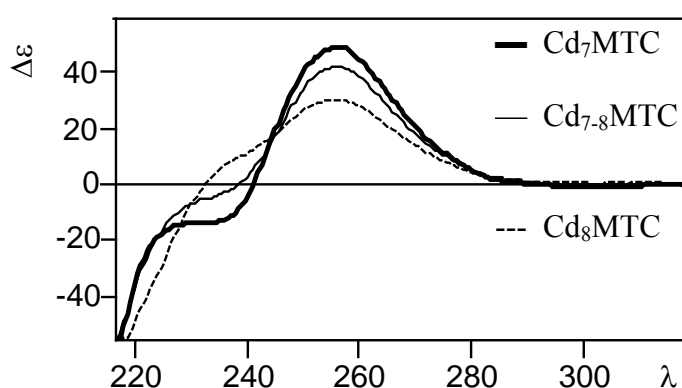
El pas final de purificació d'aquesta mostra mitjançant cromatografia de filtració en gel, per eliminar l'excés de metall (Mètodes), permeté addicionalment trencar l'enllaç amb el novè cadmi, recuperant-se Cd<sub>8</sub>MTC pràcticament pura (Figura V.7).



**Figura V.7.-** Espectres d'ESI-MS de l'apoMTC reconstituïda amb cadmi a) prèvia cromatografia de filtració en gel, b) després del procés cromatogràfic i c) després d'incubar la mostra (b) amb Chelex 100.

Amb l'objectiu d'estudiar possibles posicions de coordinació febles en CdMTC, tal com s'havia trobat en el cas de ZnMTC, es va incubar la mostra de Cd<sub>8</sub>MTC amb la resina Chelex 100. Aquest tractament provocà la pèrdua del vuitè ió Cd(II), recuperant-se l'espècie Cd<sub>7</sub>MTC (Figura V.7).

L'anàlisi de l'evolució espectral de les espècies CdMTC quan s'incuba la mostra obtinguda de la reconstitució amb Chelex permeté observar un increment de la intensitat de les bandes de CD a mesura que la proteïna anava perdent el vuitè equivalent de cadmi, formant-se l'espècie Cd<sub>7</sub>MTC (Figura V.8). Paradoxalment, en el cas del cadmi, a diferència del que s'observava pel zinc (Figura V.6), l'assoliment de l'espècie més estable en presència de Chelex 100 anava acompanyat d'un reajustament de l'estructura, adquirint-se un màxim de quiralitat per Cd<sub>7</sub>MTC.



**Figura V.8.-** Espectres de CD de Cd<sub>8</sub>MTC, Cd<sub>7.8</sub>MTC i Cd<sub>7</sub>MTC.

Amb la reconstitució amb Cd(II) s'observà com MTC estableix també, amb aquest metall, uns enllaços més forts i uns enllaços més febles. En aquest cas, però, són

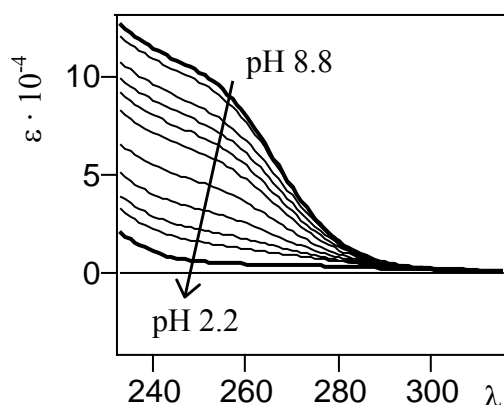
set les posicions de coordinació que es mantenen intactes en MTC en presència de Chelex, a diferència del que s'observava amb el zinc, on l'espècie més estable, sota aquestes condicions, és  $Zn_6MTC$ . Aquestes dades suggereixen que el setè i el vuitè ió divalent es coordinen a MTC amb unes propietats diferents segons si aquest ió és Zn(II) o és Cd(II).

L'enllaç que estableixen les cisteïnes amb el cadmi és més fort que el que forma amb els ions  $Zn^{2+}$ .<sup>11</sup> Resultats similars als que hem trobat per MTC, on el comportament de la proteïna vers el zinc no és equivalent al que s'obté pel cadmi, s'havien descrit ja anteriorment en la isoforma MT-3 de mamífer.<sup>188</sup>

### ***Determinació de la constant aparent de coordinació de MTC vers el cadmi***

La competència entre protons i ions metàl·lics a l'hora d'enllaçar-se als tiolats cisteïnics d'una MT es pot utilitzar per determinar les constants aparents de coordinació de la proteïna al metall. Amb l'acidificació d'una mostra de MT metal·lada amb Cd(II) s'aconsegueix trencar els enllaços Cd(II)-SCys. Si es du a terme el seguiment d'aquesta valoració per espectroscòpia electrònica, s'observa, a mesura que va disminuint el pH, una pèrdua de la intensitat de la banda LMCT a 250 nm, corresponent a aquest cromòfor.

Amb l'objectiu de determinar la constant aparent de coordinació de MTC vers el cadmi, es dugué a terme la valoració de  $Cd_8MTC$  amb HCl. Es prengueren diverses al·lòquies de  $Cd_8MTC$  4.8  $\mu M$ , i s'hi adicionaren successivament petits volums (0.2 – 10  $\mu l$ ) de HCl 1 M. S'enregistrà l'espectre UV-Vis a cada addició d'àcid i, posteriorment, s'enregistrà el pH de la solució. En la Figura V.9 es representa el coeficient d'extinció molar en funció de la longitud d'ona de cada punt de la valoració. En aquesta figura s'observa com la disminució del pH provoca una pèrdua de l'absorbància, i per tant, del coeficient d'extinció molar.



**Figura V.9.-** Espectres electrònics de  $Cd_8MTC$  a diferents valors de pH, obtinguts de l'acidificació amb HCl 1M. La valoració de la

## OBTENCIÓ DE LES FORMES holoMTC PER RECONSTITUCIÓ

proteïna amb àcid permet avaluar, d'acord amb procediments descrits,<sup>31, 174</sup> l'estabilitat dels agregats metàl·lics que forma la MT amb el cadmi. En la corba mostrada en la Figura V.10 es representa el grau d'alliberament dels ions  $\text{Cd}^{2+}$  (D) en funció del pH, a  $\lambda = 250$  nm. El grau d'alliberament D correspon a la fracció de Cd(II) coordinat a la proteïna a un determinat valor de pH, i indica per  $D = 1$  que tot el cadmi està enllaçat a la proteïna i, per  $D = 0$  que tot els ions metàl·lics han estat desplaçats pels protons.<sup>31</sup> Per calcular aquest paràmetre s'ha emprat la següent expressió:

$$D = (\epsilon_{250i} - \epsilon_{250, \text{pH } 2.2}) / (\epsilon_{250, \text{pH } 8.8} - \epsilon_{250, \text{pH } 2.2})$$

A partir dels coeficients d'extinció molar a  $\lambda = 250$  nm, dels diferents punts de la valoració, mostrats en la Taula V.2, s'ha calculat D i s'ha representat en funció del pH, obtenint-se la corba mostrada en la Figura V.10.

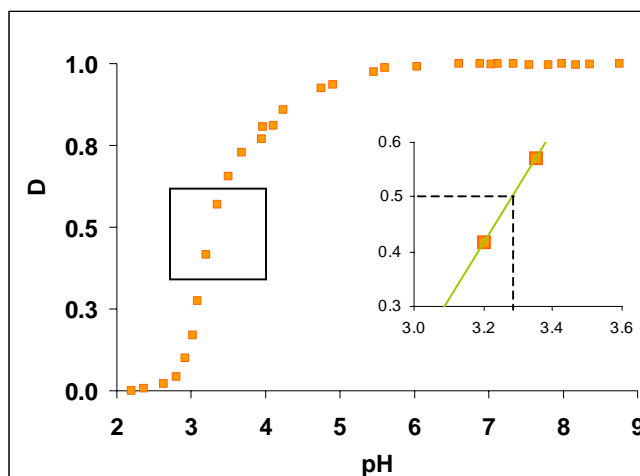
**Taula V.2.-** Valors de pH,  $\epsilon_{250}$  i D de la valoració de  $\text{Cd}_8\text{MTC}$  amb HCl.

pH	$\epsilon_{250}$	D	pH	$\epsilon_{250}$	D
8.76	10.33	1.00	6.01	10.34	1.00
8.6	10.48	1.02	5.6	10.20	0.99
8.36	10.30	1.00	5.45	10.08	0.97
8.17	10.30	1.00	4.9	9.71	0.94
7.98	10.33	1.00	4.75	9.60	0.93
7.8	10.30	1.00	4.24	8.96	0.86
7.59	10.39	1.01	4.1	8.49	0.81
7.54	10.30	1.00	3.96	8.45	0.81
7.44	10.45	1.01	3.95	8.09	0.77
7.33	10.32	1.00	3.68	7.69	0.73
7.12	10.32	1.00	3.5	6.98	0.66
7.03	10.31	1.00	3.35	6.14	0.57
6.88	10.33	1.00	3.2	4.65	0.42
6.82	10.41	1.01	3.08	3.28	0.27
6.73	10.42	1.01	3.02	2.26	0.17
6.6	10.34	1.00	2.92	1.59	0.10
6.56	10.43	1.01	2.8	1.03	0.04
6.46	10.41	1.01	2.63	0.82	0.02
6.28	10.38	1.00	2.36	0.68	0.01
6.03	10.24	0.99	2.2	0.61	0.00

Aquesta corba mostra com la valoració té lloc en dues etapes. En l'etapa inicial s'observa una lenta pèrdua dels primers ions Cd(II) a valors de pH entre 6 i 4. La segona etapa mostra un ràpid alliberament dels cadmis restants, en un estret interval de pH que



té lloc, essencialment, entre 3 i 4. La superposició de les dues etapes dificulta la determinació dels respectius punts d'inflexió i de les constants aparents de coordinació al cadmi de cada etapa. En defecte d'aquestes es pot determinar, però, la constant mitjana aparent, representativa de l'estabilitat global de les 8 posicions de coordinació a cadmi de la proteïna.



**Figura V.10.-** Representació de  $D = (\epsilon_{250i} - \epsilon_{250, \text{pH } 2.2}) / (\epsilon_{250, \text{pH } 8.8} - \epsilon_{250, \text{pH } 2.2})$ , grau d'alliberament del  $\text{Cd}^{2+}$ , respecte el pH.

Fent ús de l'expressió descrita en Wang *et al.* (1994):<sup>174</sup>

$$K_{\text{app,pH } 7} = [\text{H}^+]^n / [\text{Cd}] \cdot 10^{-7n},$$

es va calcular el valor de la constant mitjana aparent a pH 7 ( $K_{\text{app,pH } 7}$ ). En aquesta expressió, el valor de  $[\text{H}^+]$  representa la concentració de protons en el punt mig de la valoració (per a  $D = 0.5$ ). Es determina aquest valor a partir de  $\text{pH}_{1/2}$ , obtingut gràficament com es mostra en la Figura V.10. El paràmetre “n” representa el nombre de cisteïnes que participen en el complex metàl·lic per cada ió  $\text{Cd}^{2+}$  (Cys/Cd). Finalment,  $[\text{Cd}]$  indica la concentració d'ions Cd(II) en el punt mig de la valoració, assumint que en aquest punt només la meitat dels ions Cd(II) resten coordinats a la proteïna. Així, per determinar la constant  $K_{\text{app,pH } 7}$  de  $\text{Cd}_8\text{MTC}$ , s'ha tingut en compte que:

- a) El nombre de cisteïnes involucrades en la coordinació dels metalls en  $\text{Cd}_8\text{MTC}$  és 21, ja que, en base als resultats descrits en el següent apartat (V.6), s'ha determinat que en  $\text{Cd}_7\text{MTC}$  totes les cisteïnes de la proteïna (21 Cys) participen en la coordinació i s'assumeix, per tant, que també és així en  $\text{Cd}_8\text{MTC}$ .

## OBTENCIÓ DE LES FORMES holoMTC PER RECONSTITUCIÓ

---

- b) La forma metal·lada estudiada coordina 8 ions cadmi, d'acord amb les dades ESI-MS de la mostra que s'ha emprat per dur a terme la valoració.
- c) Tenint en compte les premisses (a) i (b) es calcula la relació Cys/Cd (n):

$$n = 21 / 8 = 2.6$$

- d) El paràmetre [Cd] es determina a partir de la concentració d'ions Cd(II) inicialment coordinats a la proteïna, ja que, com s'ha indicat abans, s'assumeix que en el punt mig de la valoració s'ha alliberat al medi la meitat dels ions Cd(II) totals. La concentració d'ions Cd(II) enllaçats inicialment a MTC és 8 vegades la concentració de Cd<sub>8</sub>MTC de la mostra valorada, és a dir:

$$8 \times (4.8 \times 10^{-6} \text{ M}) = 3.84 \times 10^{-5} \text{ M},$$

i per tant, la concentració d'ions Cd(II), en el medi, en el punt mig de la valoració és:

$$[\text{Cd}] = 3.84 \times 10^{-5} \text{ M} / 2 = 1.92 \cdot 10^{-5} \text{ M}$$

- e) El valor de pH<sub>1/2</sub> és 3.3, obtingut gràficament a partir de la representació de D en funció del pH (Figura V.10), quan D = 0.5. Per tant,

$$[\text{H}^+] = 10^{-3.3}$$

La constant aparent que s'obtingué per Cd<sub>8</sub>MTC fou  $K_{\text{app,pH } 7} = 2.2 \times 10^{14} \text{ M}^{-1}$ . Aquest valor és similar al trobat per MT-3,<sup>87</sup> que presenta una  $K_{\text{app,pH7}}$  de  $2 \times 10^{14} \text{ M}^{-1}$ . En canvi, altres MTs mostren una estabilitat dels seus agregats metàl·lics amb cadmi més allunyada a la que s'observa en MTC. Així, per la isoforma MT-2a de mamífer,<sup>87</sup> s'ha descrit un valor de  $K_{\text{app,pH7}}$  de  $7 \times 10^{14} \text{ M}^{-1}$ , mostrant una major estabilitat dels seus agregats i, per la MT de l'eriç de mar,<sup>174</sup> s'ha determinat una  $K_{\text{app,pH7}}$  de  $5.6 \times 10^{13} \text{ M}^{-1}$ , indicant una estabilitat lleugerament inferior.

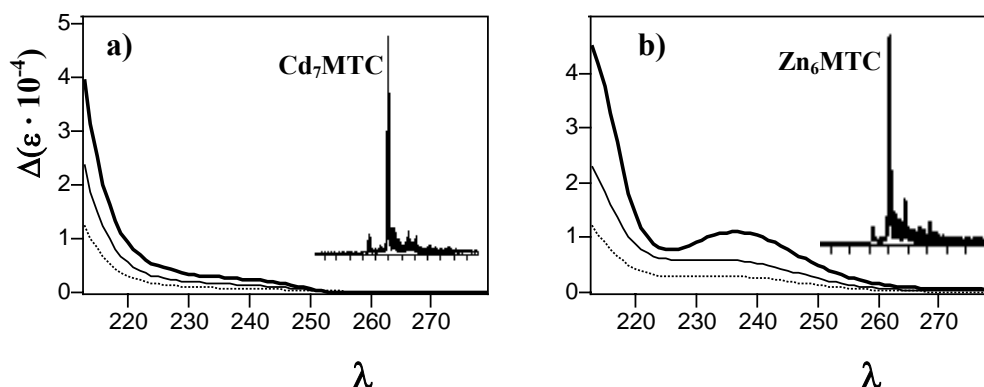
## V.6. Determinació del nombre de cisteïnes lliures en Zn<sub>6</sub>MTC i Cd<sub>7</sub>MTC, obtingudes per reconstitució

Les metal·lotioneïnes, com s'ha comentat àmpliament en la introducció d'aquest treball, són unes proteïnes amb un elevat contingut en cisteïnes. Aquest aminoàcid, mitjançant el grup tiol present en la seva cadena lateral, és el responsable de la coordinació dels ions metàl·lics. En general, les MTs requereixen de totes les cisteïnes presents en la seva estructura primària per assolir la forma totalment metal·lada. Malgrat aquesta premissa, s'ha descrit, en casos puntuals, la no participació d'algun dels residus cisteïnics en la coordinació dels metalls. És el cas, per exemple de la isoforma Cu<sub>8</sub>MT de llevat, en la qual s'ha determinat que només 10 cisteïnes, de les 12 que conté en la seva estructura primària, participen en la coordinació dels 8 ions Cu(I).<sup>13</sup> En algunes de les MTs que contenen triplets de cisteïna també s'ha proposat que un dels residus cisteïnics que forma part del triplet no intervé en la coordinació del metall.<sup>22,97,108</sup>

La detecció de cisteïnes lliures en una MT es pot efectuar mitjançant el seguiment espectroscòpic de la valoració de la proteïna totalment metal·lada amb una base, ja que, si en l'espècie en estudi hi ha cisteïnes lliures, l'increment del pH de la solució provocarà la seva desprotonació, generant-se una nova absorció en l'UV, característica dels ions tiolat, amb un màxim entre 230 i 240 nm.<sup>160</sup>

La valoració amb hidròxid de sodi de la MTC, seguida per espectroscòpia electrònica, ha estat l'estratègia que s'ha utilitzat per detectar la possible presència de cisteïnes lliures en les formes metal·lades Cd<sub>7</sub>MTC i Zn<sub>6</sub>MTC, obtingudes per reconstitució. Representant els espectres de diferència, obtinguts de restar l'espectre inicial (pH 7 – 8) dels espectres enregistrats a valors de pH superiors, es poden apreciar molt millor els canvis espectroscòpics que tenen lloc com a conseqüència de la variació del pH (Figura V.11).

En els espectres obtinguts de la basificació de Cd<sub>7</sub>MTC gairebé no s'aprecien canvis en la regió situada per sobre dels 230 nm (Figura V.11.a). Les variacions en l'absorció observades per sota dels 230 nm són degudes a la diferent absorció del tampó Tris, en funció del pH. Això permet proposar que en l'espècie Cd<sub>7</sub>MTC totes les cisteïnes de la proteïna estan participant en la coordinació dels ions Cd(II).



**Figura V.11.-** Espectres electrònics de diferència de a) Cd<sub>7</sub>MTC a pH 8.4 (⋯), 9.7 (—) i 11.3 (—), menys Cd<sub>7</sub>MTC a pH 7.7; b) Zn<sub>6</sub>MTC a pH 8.0 (⋯), 8.5 (—) i 11.2 (—), menys Zn<sub>6</sub>MTC a pH 7.4. S'indiquen els espectres d'ESI-MS de les mostres de partida en la part superior dreta de cada requadre.

En canvi, la valoració de Zn<sub>6</sub>MTC amb NaOH fins a un pH d'11.2 genera, clarament, una nova absorció, amb un màxim a 237 nm (Figura V.11.b). A partir de la valoració d'apoMTC amb NaOH, apartat V.2, es va determinar el coeficient d'extinció molar promig dels tiolats cisteínics de MTC,  $\epsilon_{237}$  (promig) =  $4.6 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}/\text{Cys}$  (a 237 nm a pH 11). Aquest valor permet fer una aproximació del nombre de cisteïnes lliures que estan contribuint en aquesta nova banda. L'absorció que apareix durant la valoració de Zn<sub>6</sub>MTC amb NaOH en aquest rang de longituds d'ona presenta, a pH 11.2, un  $\Delta(\epsilon_{237}) = 10 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ , la qual cosa suggereix que aquesta forma metal·lada de MTC conté aproximadament dues Cys lliures.

La detecció de cisteïnes lliures en l'espècie Zn<sub>6</sub>MTC és una propietat poc comú en les MTs. Malgrat això, tal com es comentava anteriorment, en algun cas puntual s'ha descrit la presència de cisteïnes que no participen en la coordinació dels metalls. Curiosament, la major part de metal·lotioneïnes que presenten aquesta característica contenen triplets de cisteïna en la seva estructura primària. La presència de dos triplets de cisteïna en la seqüència aminoacídica de MTC pot estar influenciant considerablement en les propietats coordinants que mostra aquesta proteïna: dificultant la participació de totes les cisteïnes en la forma metal·lada més estable de ZnMTC, però permetent la incorporació d'1 o 2 ions Zn(II) addicionals en presència d'un excés d'aquest metall.

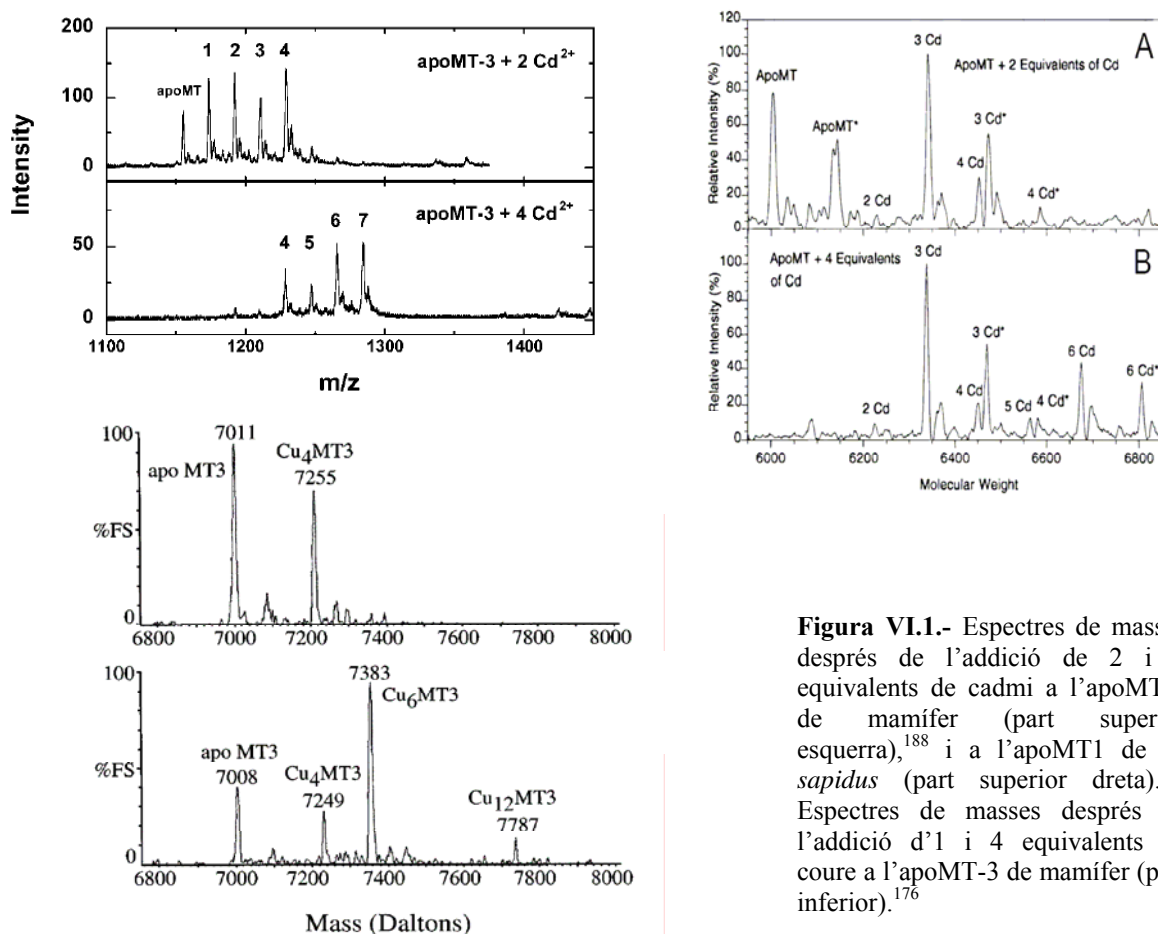




## **VI. Caracterització de les espècies metal·lades que forma MTC amb Cd(II) i Cu(I) mitjançant valoracions *in vitro***

La formació dels agregats metàl·lics que constitueixen una metal·lotioneïna és un procés que es pot analitzar essencialment per dues vies: a) mitjançant la successiva addició dels ions metàl·lics a la proteïna demetal·lada, generant diverses espècies homometàl·liques metall-MT d'estequiometria creixent, b) mitjançant la substitució dels ions que estan coordinats a la MT per uns altres que s'afegeixen al medi i que presenten una major afinitat pels tiolats que els metalls enllaçats inicialment.

Ambdós procediments es poden estudiar fent ús de diverses tècniques, com les que es descriuen a continuació. Així, mitjançant l'espectrometria de masses es pot determinar les espècies metal·lades que es formen en cada pas de la valoració (Figura VI.1). En alguns casos, fins i tot, es pot identificar si el procés és cooperatiu i, en aquest cas, quines espècies són clau per a la formació dels agregats metàl·lics. En altres casos, en canvi, no s'observa que unes espècies destaquen per sobre de les altres, denotant així, que l'assoliment de la forma totalment metal·lada de la MT en estudi no és un procés cooperatiu.

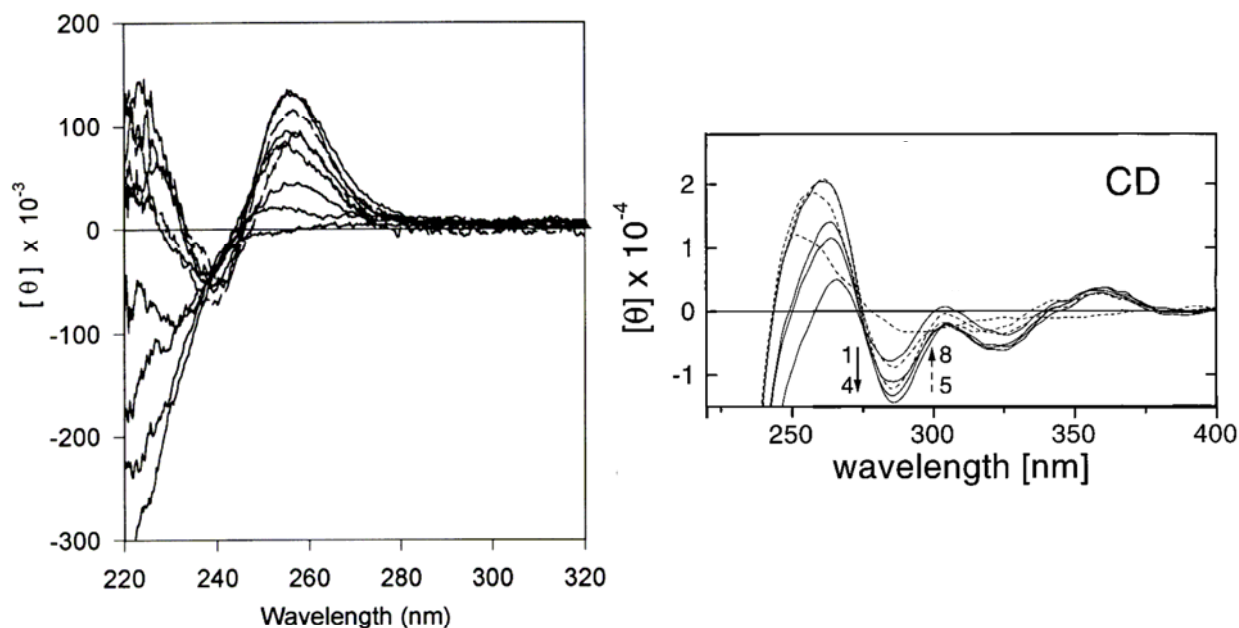


**Figura VI.1.-** Espectres de masses després de l'addició de 2 i 4 equivalents de cadmi a l'apoMT-3 de mamífer (part superior esquerra),<sup>188</sup> i a l'apoMT1 de *C. sapidus* (part superior dreta).<sup>189</sup> Espectres de masses després de l'addició d'1 i 4 equivalents de coure a l'apoMT-3 de mamífer (part inferior).<sup>176</sup>

L'espectrometria de masses, tot i oferir informació molt valuosa del procés de valoració d'una MT, difícilment aporta informació estructural. Aquestes mancances es poden suplir mitjançant l'anàlisi per CD i UV de la valoració.

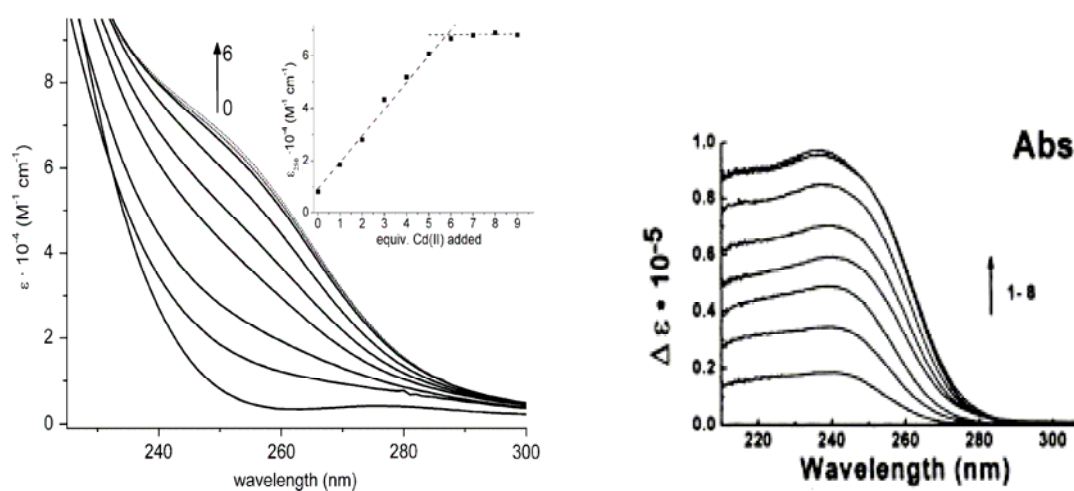
El dícroïsmes circular és una tècnica molt útil en la valoració de les metal·lotioneïnes, ja que és molt sensible als canvis estructurals que tenen lloc amb la coordinació dels nous metalls. El seguiment d'una valoració per CD ens ofereix una evolució espectral que representa els canvis produïts en cada pas, com a conseqüència de la formació de les noves formes metal·lades (Figura VI.2).





**Figura VI.2.-** Espectres de CD de la valoració amb cadmi de l'apoMT del cargol *Helix pomatia*, fins a 8 equivalents (esquerra);<sup>185</sup> i de la valoració amb coure de la forma apo de  $\alpha$ MT-3 de mamífer, fins a 8 equivalents de coure (dreta).<sup>187</sup>

El seguiment de la valoració per UV ens permet analitzar quins cromòfors s'estan formant i quins estan desapareixent. Les dades recollides mitjançant espectroscòpia electrònica es poden mostrar com espectres superposats, com espectres de diferència, o bé mitjançant la representació del coeficient d'extinció a una longitud d'ona determinada, tal com es mostra en la Figura VI.3, i d'aquesta manera extreure el màxim d'informació que la tècnica ens pot oferir.



**Figura VI.3.-** Espectres electrònics de la substitució dels ions Zn(II) per ions Cd(II) en la MT ZnEc-1 de blat i representació de la variació dels coeficients d'extinció a 250 nm (esquerra);<sup>7</sup> espectres electrònics de diferència de la valoració d'apoMT-4 de mamífer amb cadmi (dreta).<sup>31</sup>

Seguidament es descriuran les valoracions que es van realitzar amb Cd(II) i Cu(I) de l'apoMTC i de ZnMTC. Aquestes valoracions es van analitzar per tècniques espectroscòpiques (CD i UV) i, independentment, és a dir, a partir de mostres de diferent origen, mitjançant ESI-MS. Únicament s'estudiaren les mateixes mostres, en paral·lel, mitjançant les tres tècniques, en el cas de la valoració d'apoMTC amb cadmi. Per aquest motiu els resultats obtinguts en les diferents tècniques no es poden comparar pas a pas, però sí ens permeten extreure informació independent i unes conclusions globals importants.

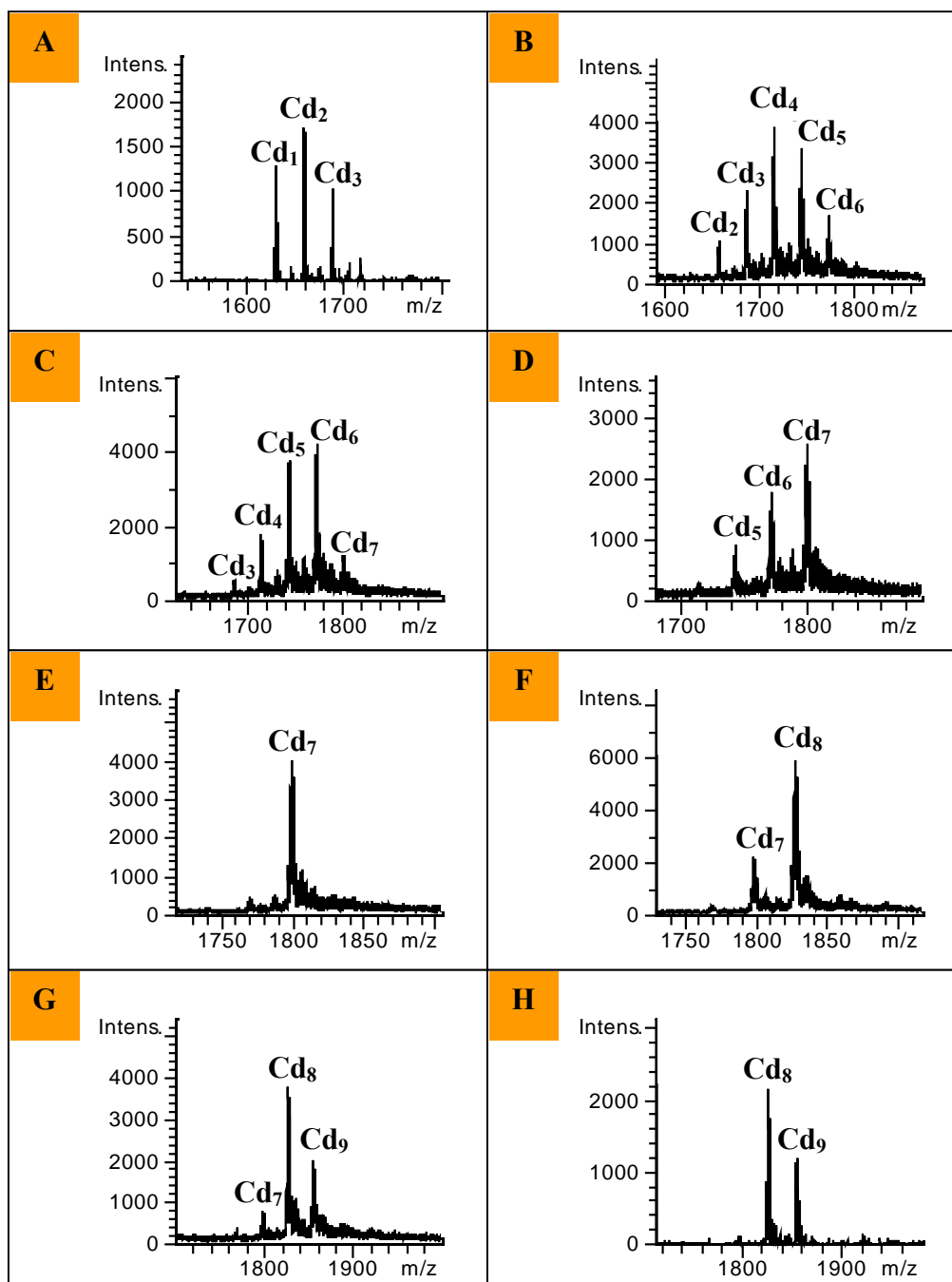
## VI.1. Valoració d'apoMTC amb cadmi

Per tal d'analitzar la formació dels agregats cadmi-tiolat que constitueixen les espècies més significatives de MTC ( $Cd_{7-8}MTC$ ), assolides en el procés de reconstitució, es va valorar l'apoMTC amb cadmi, fent-ne un seguiment en paral·lel mitjançant les tècniques abans esmentades (ESI-MS, CD i UV). Les dades analítiques d'apoMTC indiquen que el seu grau d'oxidació és pràcticament nul.

Els espectres de masses de la valoració d'apoMTC amb cadmi, Figura VI.4, mostraren una formació no cooperativa dels agregats metàl·lics. En gairebé totes les etapes de la valoració es va observar la coexistència de diferents metal·loformes, exceptuant en el punt en que s'havien addicionat 7 equivalents de cadmi, on únicament s'observava  $Cd_7MTC$ , suggerint que aquesta espècie presenta una estabilitat important.

No es va detectar cap intermedi que destaqués significativament en front de les altres espècies, el que suggereix que les diferents posicions de coordinació presenten una constant d'afinitat pel cadmi similar, donant suport als resultats obtinguts en la valoració de  $Cd_8MTC$  amb HCl (apartat V.5), on no s'observà una clara diferenciació d'estabilitat dels agregats metàl·lics que formen aquesta espècie.

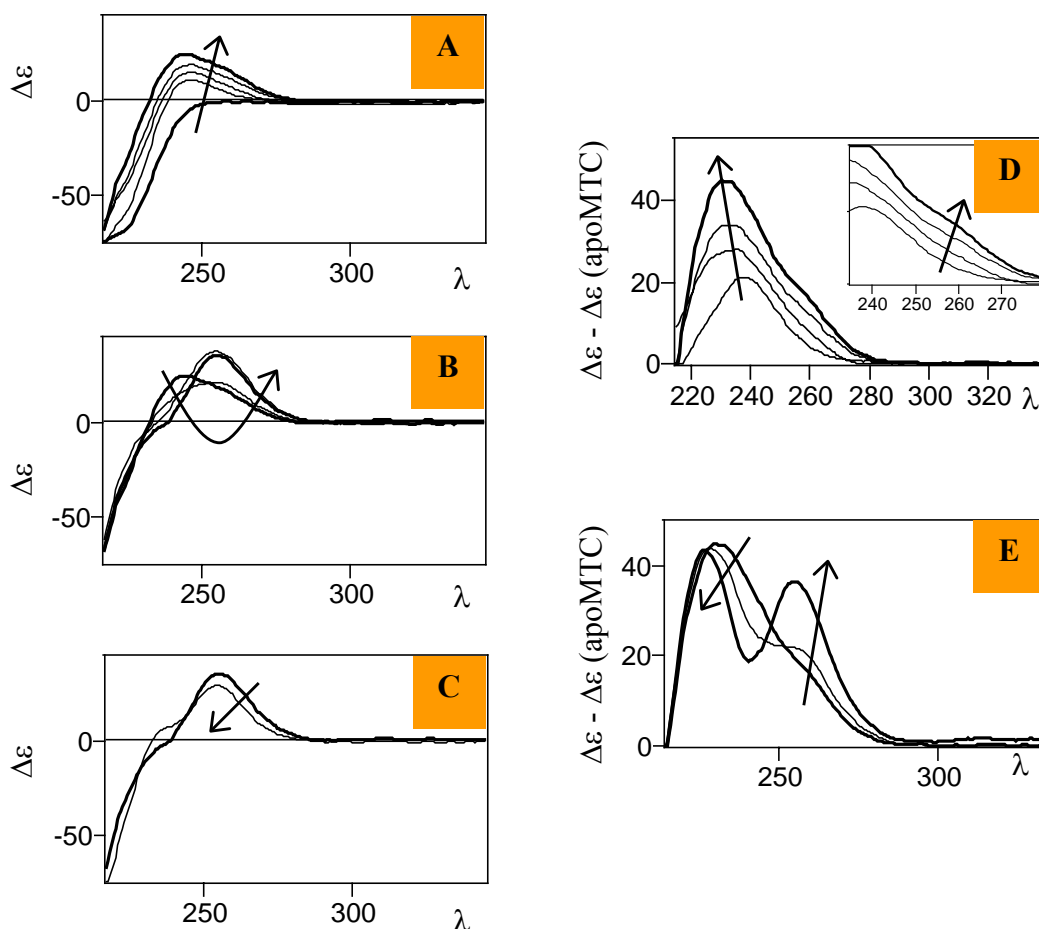
En les següents etapes de la valoració s'observà com MTC podia enllaçar 8 i, fins i tot, 9 ions de cadmi, essent  $Cd_9MTC$  sempre una espècie minoritària, concordant amb els resultats que s'havien obtingut en la reconstitució de la proteïna amb aquest metall.



**Figura VI.4.-** Espectres d'ESI-MS de la valoració d'apoMTC amb Cd(II) després de l'addició de A) 2 eq., B) 4 eq., C) 5 eq., D) 6 eq., E) 7 eq., F) 8 eq., G) 9 eq. i H) 10 eq.

En el seguiment per CD de la valoració es va poder observar com, a partir d'una estructura totalment desordenada (*random coil*), s'anaven originant els agregats metàl·lics que formen l'espècie final Cd<sub>7-8</sub>MTC (Figura VI.5). Els espectres de CD que s'obtenen mostren la contribució de la cadena peptídica i de les transicions corresponents als agregats cadmi-tiolat. Si es resta l'espectre de CD de l'apoMTC als

espectres obtinguts en cada pas de la valoració, Figura VI.5.D i E, es pot simplificar, en certa manera, l'estudi de les corbes resultants, ja que aquestes informaran essencialment de les transicions degudes al metall.<sup>190</sup>



**Figura VI.5.-** A l'esquerra es representen els espectres de CD de la valoració d'apoMTC amb Cd(II) després de l'addició de A) 0 – 4 eq., B) 4 – 7 eq., C) 7 i 8 eq. A la dreta es representen els espectres de CD de diferència respecte l'apoMTC, després de l'addició de : D) 1 – 4 eq. (s'amplia el rang comprès entre 230 i 280 nm) i E) 4, 5 i 7 eq.

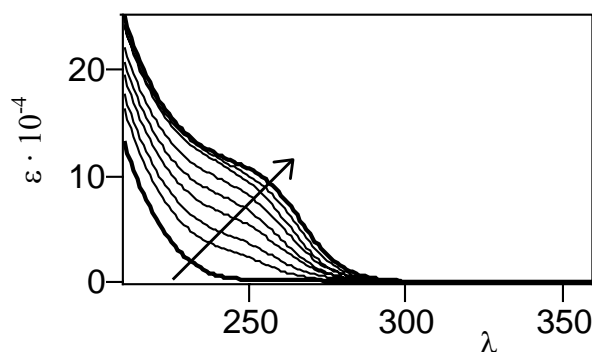
En la Figura VI.5.A es representen els espectres de CD corresponents a la primera etapa de la valoració, en la que es genera una banda ampla, centrada a 240 nm, que va creixent d'intensitat fins a l'addició del quart equivalent de Cd(II). En l'addició del 5è equivalent, Figura VI.5.B, s'observa un desplaçament d'aquesta banda cap a energies inferiors. L'anàlisi dels espectres de diferència mostren com aquest desplaçament realment correspon a un desdoblament de la banda, generant-se'n una de nova a 255 nm, que en els passos anteriors quedava pràcticament oculta sota la banda a 240 nm (Figura VI.5.D i E). Aquesta banda a longituds d'ona superiors es mostra

clarament en l'addició del sisè i setè cadmi, assolint en aquests punts un màxim d'intensitat (Figura VI.5.B). Els respectius espectres de masses mostren la formació de l'espècie Cd<sub>7</sub>MTC, d'elevada estabilitat i quiralitat màxima (proprietats determinades en la reconstitució d'apoMTC amb cadmi, apartat V.5).

En l'addició del vuitè equivalent s'aprecia una disminució de la intensitat d'aquesta banda (Figura VI.5.C), cosa que indica un canvi en l'estructura degut a la incorporació del nou ió. Aquest canvi en les propietats quirals de la proteïna en presència d'un excés d'ions cadmi ja s'havia observat en la valoració d'altres MTs, atribuint-ho a la presència de posicions de coordinació addicionals.<sup>123, 185</sup>

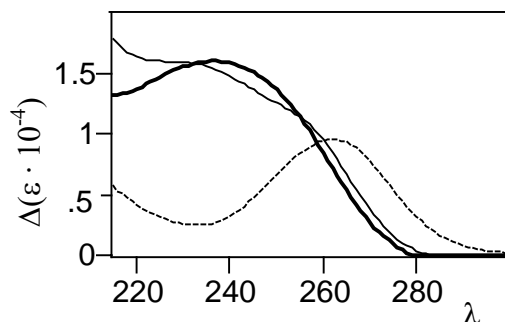
Els espectres de diferència, que informen exclusivament de l'aportació quiral de les interaccions cadmi-tiolat, mostren la formació del perfil bifàsic típic de les CdMTs, en els darrers punts de la valoració, Figura VI.5.E. Aquest perfil de CD respon a la formació dels agregats Cd<sub>x</sub>(SCys)<sub>y</sub>, que constitueixen la proteïna totalment metal·lada, generant-se nous tiolats pontals a partir dels tiolats terminals.<sup>190</sup>

Aquest pas de tiolats terminals a pontals també es pot apreciar en els espectres electrònics, Figura VI.6, on es dona un desplaçament de l'absorció cap a longituds d'ona més altes a mesura que es va incrementant el nombre d'equivalents de cadmi addicionats.



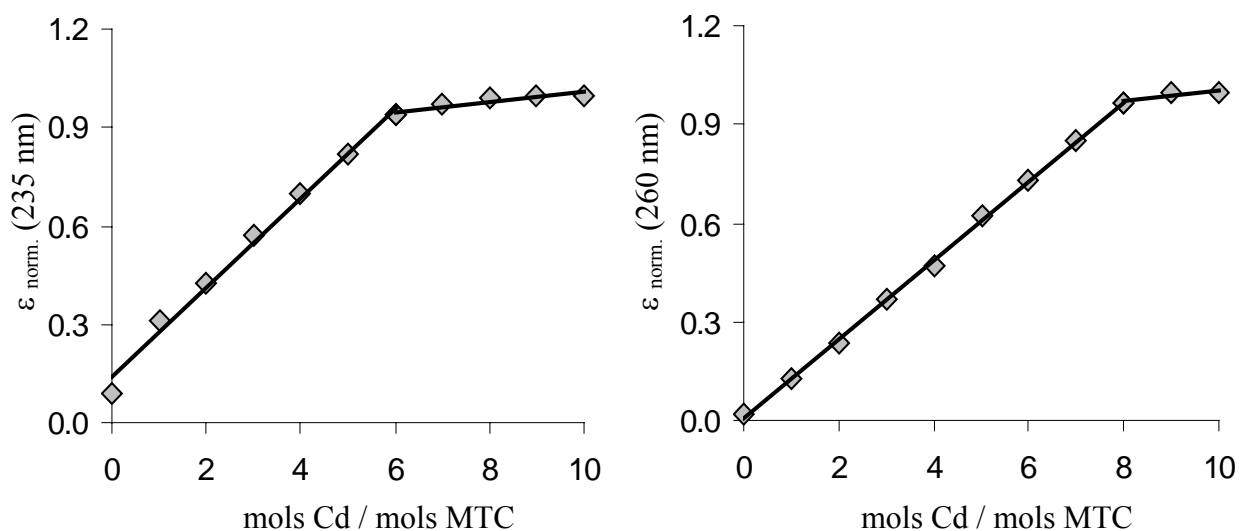
**Figura VI.6.-** Espectres electrònics de la valoració d'apoMTC amb 0 – 8 equivalents de cadmi.

Els espectres electrònics de la valoració ens mostren un successiu creixement de l'absorció centrat a 240 nm, com a conseqüència de la formació dels enllaços Cd(II)-SCys. Els primers equivalents addicionats provoquen un increment de l'absorció en un ampli rang de l'espectre, tal i com s'indica per l'addició del quart ió Cd<sup>2+</sup> en la Figura VI.7 (—).



**Figura VI.7.-** Espectres electrònics de diferència corresponents a: l'espectre obtingut en addicionar 4 equivalents de cadmi menys l'obtingut en addicionar-n'hi 3 (—●—); l'espectre del sisè equivalent menys el del cinquè (—○—); i l'espectre del vuitè equivalent menys el del setè (---).

En punts posteriors de la valoració aquesta aportació a l'espectre electrònic mostra un desdoblament, suggerint la presència d'una banda a 235 nm i una segona, d'energia més baixa, a 260 nm, associada a la formació de tiolats pontals (veure en la Figura VI.7 la corba corresponent a l'espectre de diferència del sisè equivalent de cadmi menys el cinquè, —○—). Si es representa, per a aquestes longituds d'ona, la variació del coeficient d'extinció,  $\epsilon$ , en funció de la relació mols de cadmi / mols de proteïna, s'obtenen les gràfiques mostrades en la Figura VI.8.



**Figura VI.8.-** Representació de l'increment d'absorció normalitzat a 1, és a dir, dividint tots els valors de  $\epsilon$  pel valor màxim ( $\epsilon_{\text{màx}}$ ), en funció de la relació mols de Cd / mols de MTC, a 235 nm (esquerra) i 260 nm (dreta).

S'observa, a 235 nm, un creixement lineal dels valors d' $\epsilon$  per l'addició dels 6 primers equivalents de cadmi. A aquesta longitud d'ona,  $\epsilon$  es manté gairebé constant quan la relació mols Cd / mols MTC és superior a 6. A 260 nm, en canvi, es manté el creixement lineal fins a l'addició del vuitè equivalent.

Assumint que la formació d'unitats  $\{\text{Cd}(\text{SCys})_{\text{terminal}}\}$  i  $\{\text{Cd}(\text{SCys})_{\text{pontal}}\}$  està associada a aquestes dues longituds d'ona, 235 i 260 nm, respectivament, es pot proposar que, en l'addició dels 6 primers equivalents de cadmi, ambdues unitat es van generant seguint una certa proporcionalitat respecte el nombre de cadmis addicionats. En canvi, amb l'addició del setè i el vuitè equivalent, pràcticament només es generen unitats  $\{\text{Cd}(\text{SCys})_{\text{pontal}}\}$  (Figura VI.7 i IV.3.8). L'addició del novè equivalent de cadmi provoca un petit increment d' $\epsilon$ , suggerint la formació de l'espècie  $\text{Cd}_9\text{MTC}$ , observada per ESI-MS. Pel desè equivalent, en canvi, s'enregistra un espectre electrònic totalment equivalent a l'obtingut en el pas anterior de la valoració, indicant que la proteïna ja no incorpora més cadmi.

L'estudi per ESI-MS, CD i UV, mostra com la formació dels agregats que constitueixen  $\text{Cd}_{7-8}\text{MTC}$  no té lloc de forma cooperativa. L'aparició de l'espècie  $\text{Cd}_7\text{MTC}$  en addicionar el cinquè equivalent de cadmi, Figura VI.4.C, es veu reflectida en els espectres de CD, mostrant un canvi en la tendència de les corbes, mitjançant el desenvolupament d'una banda a 255 nm. En aquest punt de la valoració, s'observa, en els espectres de CD de diferència, com la formació de  $\text{Cd}_7\text{MTC}$  dóna pas a l'aparició d'un perfil bifàsic, molt comú en les MTs coordinades a cadmi, que es caracteritza per un mínim relatiu al voltant dels 240 nm.<sup>7</sup> Aquest és indicatiu de l'estructuració de la proteïna en agregats metàl·lics, mitjançant la participació, com a lligands pontals, d'algunes de les cisteïnes.<sup>31</sup>

En els darrers estadis de la valoració s'observa com MTC pot coordinar-se a 8 ions  $\text{Cd}(\text{II})$ , formant  $\text{Cd}_8\text{MTC}$ , però el descens de la intensitat de les bandes de CD quan s'assoleix aquesta estequiometria suggereix que aquesta vuitena posició de coordinació correspon a una posició addicional de la proteïna. Els estudis realitzats a partir de la proteïna reconstituïda amb cadmi amb Chelex 100, mostraven una major feblesa de la vuitena posició de coordinació, confirmant els resultats que s'han obtingut en la valoració d'apoMTC.

L'espècie  $\text{Cd}_9\text{MTC}$  es pot formar en presència d'un excés de cadmi, però l'enllaç amb el novè ió es mostra com una interacció superficial i molt feble, que no modifica significativament l'estructura de la proteïna. Mitjançant l'eliminació de l'excés de metall mitjançant cromatografia de filtració en gel, es pot trencar l'enllaç amb aquest ió, recuperant una mostra homogènia, que conté, de forma gairebé exclusiva, l'espècie  $\text{Cd}_8\text{MTC}$  (Figura V.7), tal com s'observà en els assaigs de reconstitució.



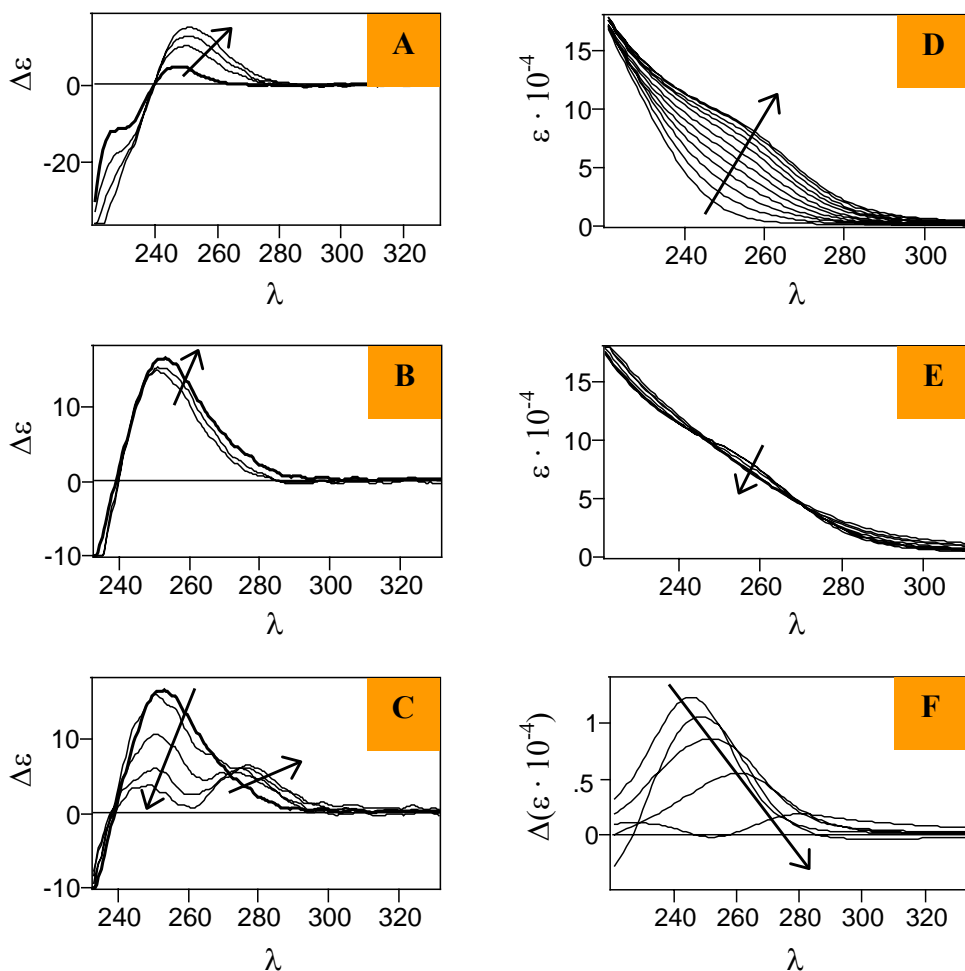
## VI.2. Valoració de ZnMTC amb cadmi

El bescanvi dels ions Zn(II) per ions Cd(II) en ZnMTC és un procés que permet analitzar el grau de labilitat de les diferents posicions de coordinació del zinc i les preferències metàl·liques de la proteïna front ambdós metalls. Amb aquest propòsit doncs, es va dur a terme la valoració amb cadmi d'una mostra de ZnMTC, obtinguda per reconstitució, que conté les espècies  $Zn_xMTC$  que s'indiquen en la Taula VI.1, per a 0 equivalents de Cd(II) adicionats. Es va seguir l'evolució de les espècies M(II)-MTC mitjançant espectrometria de masses (Taula VI.1). En els diferents estadis de la valoració s'obtingueren un conjunt d'espècies heterometàl·liques, en les quals MTC es trobava coordinant un total de 8 ions divalents. En els darrers passos de la valoració s'assoliren espècies homometàl·liques de cadmi, amb 8 o més ions Cd(II). Per aconseguir eliminar totalment els ions Zn(II) enllaçats a la proteïna fou necessari addicionar 12 equivalents de cadmi. En la valoració d'altres ZnMTs amb cadmi ja s'havia apreciat que el desplaçament de tot el zinc requeria un excés de cadmi,<sup>28, 29</sup> indicant una menor accessibilitat d'algunes de les posicions de coordinació.

**Taula VI.1.** - Espècies  $Cd_xZn_yMTC$  observades per masses en cada punt de la valoració de ZnMTC amb cadmi (X representa espècies majoritàries i x espècies minoritàries).

espècies $Cd_yZn_xMTC$ observades	mol Cd(II) afegits/mol MTC													
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	10	12	14	16	
Zn <sub>6</sub> MTC	X													
Zn <sub>7</sub> MTC	X	x	x											
Zn <sub>8</sub> MTC	x	X	x											
Cd <sub>1</sub> ,Zn <sub>7</sub> MTC		X	X	x										
Cd <sub>2</sub> ,Zn <sub>6</sub> MTC		X	X	x	x									
Cd <sub>3</sub> ,Zn <sub>5</sub> MTC		x	X	X	x									
Cd <sub>4</sub> ,Zn <sub>4</sub> MTC			x	X	X	x								
Cd <sub>5</sub> ,Zn <sub>3</sub> MTC			x	x	X	X								
Cd <sub>6</sub> ,Zn <sub>2</sub> MTC					X	X	x	x						
Cd <sub>7</sub> ,Zn <sub>1</sub> MTC						X	X	X	x					
Cd <sub>8</sub> MTC						x	x	x	X	X	x	x		
Cd <sub>8</sub> ,Zn <sub>1</sub> MTC							X	X	X	x				
Cd <sub>9</sub> MTC									X	X	X	X	X	X
Cd <sub>10</sub> MTC												x	x	

També es va valorar amb cadmi una mostra de ZnMTC, aïllada dels cultius d'*E. coli* enriquits amb zinc, i s'enregistrà l'espectre de CD i d'UV de cada pas. Es mostra en la Figura VI.9 els espectres més significatius d'aquesta valoració.



**Figura VI.9.-** Espectres de CD (A-C), UV (D-E) i espectres electrònics de diferència (F) de la valoració de ZnMTC amb Cd. A) 0 – 3 eq. de  $\text{Cd}^{2+}$ , B) 3, 5, 7 eq., C) 7, 11, 14, 18, 22 eq., D) 0 – 11 eq., E) 11 – 22 eq. i F) 1, 3, 5, 9 i 12 eq.

Mitjançant l'estudi per CD i UV de la valoració de ZnMTC amb cadmi es pot analitzar l'evolució estructural de les noves espècies formades. El seguiment de la valoració mitjançant diroïsmes circulars (Figura VI.9.A, B i C) mostra clarament tres etapes cabdals. Una primera etapa, que comprèn l'addició dels 3 primers equivalents de Cd, on es perd la banda de tipus *exciton coupling* que presenta ZnMTC i se'n genera una de nova, de tipus Gaussià, més intensa i centrada a 250 nm. En aquesta etapa la proteïna sofreix uns canvis estructurals que li permeten incorporar els primers ions Cd(II). Les successives addicions d'aquest metall, fins a assolir una relació Cd/MTC de

7, no provoquen canvis significatius en l'estructura, tot i que, tal i com es pot veure en els respectius espectres electrònics (Figura VI.9.D), la proteïna continua bescanviant ions Zn(II) per ions Cd(II). A partir d'aquest punt de la valoració, amb una relació Cd/MTC superior a 7, s'inicia la pèrdua d'intensitat de la banda a 250 nm, així com la formació d'una nova banda al voltant dels 280 nm.

La presència d'una banda a longituds d'ona superiors als 270 nm és una propietat poc comú per una CdMT, de la que només se'n troba algun exemple puntual en la bibliografia. En algun cas s'han associat aquestes absorcions a la presència d'ions sulfur formant part dels agregats metàl·lics de la proteïna.<sup>158</sup> També s'ha observat, en altres casos, la formació d'una banda en aquest rang de l'espectre com a conseqüència d'una alteració de la conformació dels agregats metàl·lics, promoguda per un increment de la temperatura.<sup>191</sup> Tal i com s'ha comentat en l'apartat IV.3.2, les mostres de ZnMTC no contenen ions sulfur, amb la qual cosa podem descartar que les absorcions a 280 nm, obtingudes per aquestes mostres amb un excés d'ions Cd(II), siguin fruit de la presència de sulfurs en la proteïna. La valoració de la ZnMTC amb cadmi es realitzà a temperatura constant, amb la qual cosa l'aparició d'aquestes bandes poden respondre a canvis conformacionals, però no deguts a un increment de la temperatura, sinó a un increment dels ions Zn(II) i Cd(II) lliures en solució.

Els espectres electrònics obtinguts de la valoració (Figura VI.9.D, E i F) mostren clarament la formació d'un nou cromòfor, inicialment centrat a 245 nm. Aquesta absorció és deguda a la formació d'enllaços Cd(II)-SCys. A mesura que la valoració avança, la banda a 245 nm va desplaçant progressivament el seu màxim a longituds d'ona més grans (Figura VI.9.F), degut a la incorporació de nous ions Cd(II).

En conjunt, es pot dir que el bescanvi de zinc per cadmi en MTC té lloc de manera progressiva, sense mostrar cooperativitat en cap etapa de la valoració, i incrementant, des de l'addició del primer equivalent de cadmi, l'estequiometria global M(II)/MTC fins a 8. Els canvis estructurals que sofreix la proteïna com a conseqüència d'aquest bescanvi es donen essencialment a l'inici de la valoració i quan hi ha un excés d'ions cadmi en el medi. Amb els tres primers equivalents de cadmi, la proteïna adopta una nova conformació que li permet encabir 8 ions divalents, una part dels quals són Cd(II), amb un radi iònic superior al del Zn(II). Aquesta conformació es manté en els següents passos de la valoració, fins a l'addició del setè equivalent, indicant que les espècies formades en la primera etapa de la valoració assoleixen una estructura que permet el bescanvi de zinc per cadmi, sense que es produeixin importants modificacions.

## CARACTERITZACIÓ DE LES ESPÈCIES OBTINGUDES *in vitro*

Veiem també, mitjançant aquest procediment, que algunes posicions de coordinació són menys accessibles a l'hora de permetre el bescanvi per un altre ió metàl·lic, fent que sigui necessari addicionar un excés de cadmi per assolir una mostra que únicament contingui espècies homometàl·liques CdMTC.

### VI.3. Valoració d'apoMTC amb coure

Les mostres homometàl·liques de coure, obtingudes en algunes de les síntesis de la proteïna en cultius d'*E. coli* enriquits amb aquest metall, indiquen que aquesta proteïna pot assolir, en unes condicions determinades, una estructura que no necessita de la presència de zinc. Malgrat això, aquesta estructura presenta un grau de quiralitat baix comparat amb el que s'ha observat en algunes mostres heterometàl·liques de Cu,ZnMTC, la qual cosa suggereix que el zinc facilita a MTC un millor plegament.

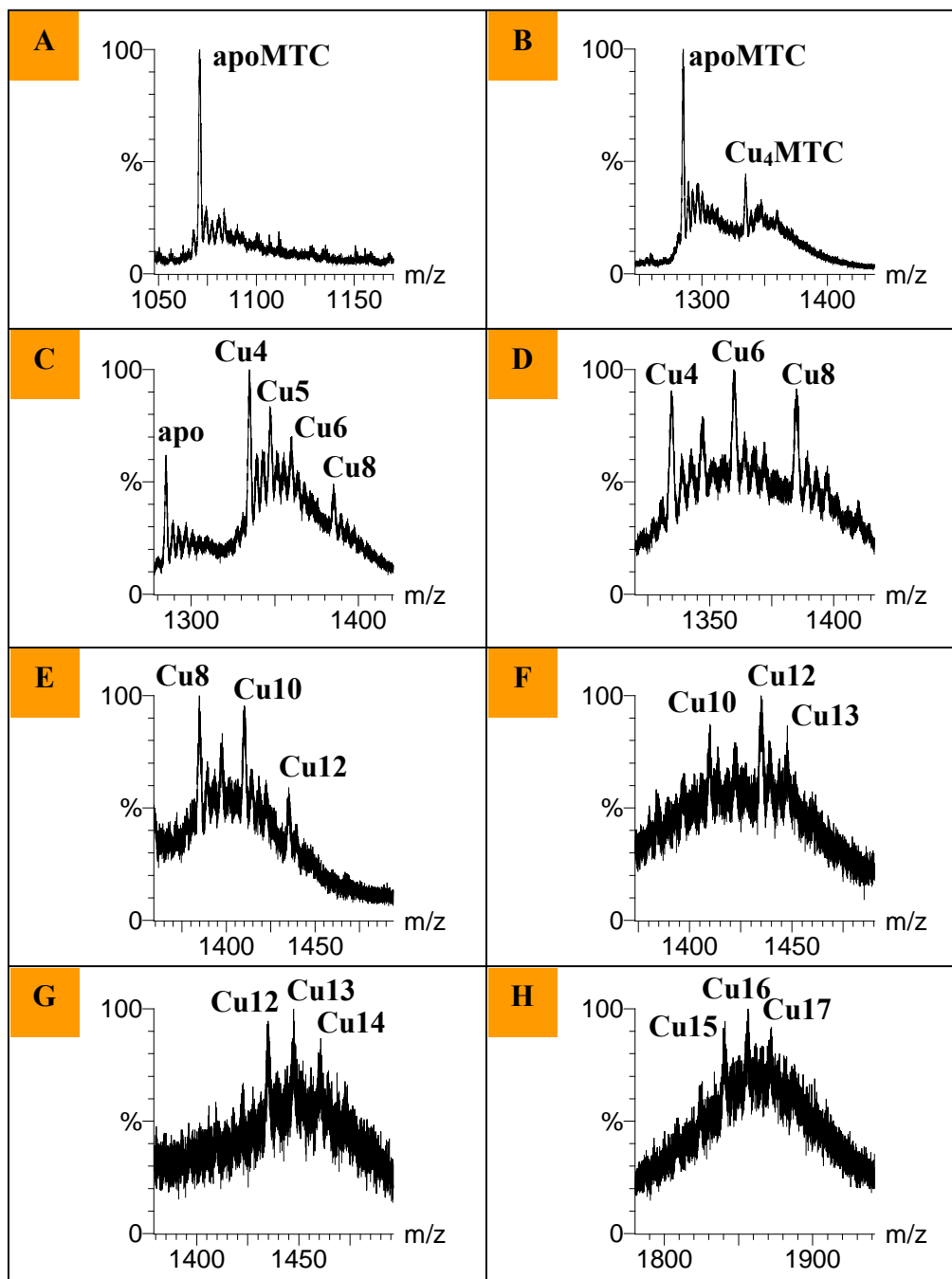
La valoració de la forma apoMTC amb ions Cu(I) permetrà analitzar les espècies homometàl·liques de coure que pot formar aquesta proteïna i fer un seguiment de l'evolució estructural que sofreix MTC en incorporar aquests ions.

Així doncs es dugué a terme aquesta valoració a partir de MTC totalment reduïda i demetal·lada, fent-ne un seguiment per ESI-MS. Els resultats obtinguts es mostren en la Figura VI.10.

L'addició dels dos primers equivalents de coure generà de manera cooperativa l'intermedi Cu<sub>4</sub>MTC. Sorprenentment, la valoració d'aquesta proteïna amb coure no mostrà la formació de cap espècie amb estequiometria coure/MTC inferior a 4, indicant la importància d'aquest intermedi per assolir els agregats CuMTC finals (Figura VI.10.B). En els successius passos de la valoració es van trobar com a intermedis també destacats les espècies Cu<sub>6</sub>MTC, Cu<sub>8</sub>MTC i Cu<sub>10</sub>MTC. La presència d'aquests intermedis suggereix la importància de les estequiometries Cu<sub>4</sub>- i Cu<sub>6</sub>- en ambdós agregats, assumint que la proteïna MTC adopta una estructura dividida en dos dominis quan es coordina a coure.

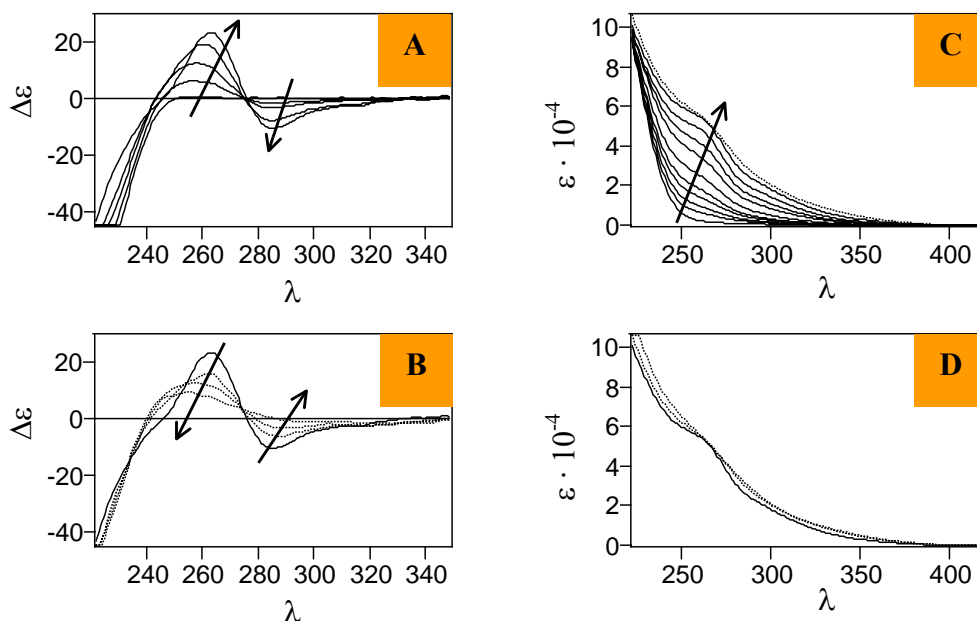
L'espècie Cu<sub>12</sub>MTC aparegué per primer cop després de l'addició de 8 equivalents de coure, formant part d'un equilibri entre diverses espècies, tal i com ja s'havia observat en les mostres aïllades d'*E. coli*.

Després de l'addició d'un excés de coure s'obtingueren espècies de diferents estequiometries amb relacions Cu/MTC de fins a 17 – 18. En la reconstitució de MTC amb coure també s'observaren estequiometries elevades per les espècies CuMTC obtingudes.



**Figura VI.10.-** Espectres d'ESI-MS de la valoració d'apoMTC amb  $\text{Cu}^+$ . A) 0 equivalent, B) 2 eq., C) 4 eq., D) 6 eq., E) 8 eq., F) 10 eq., G) 12 eq. i H) 14 eq.

El seguiment per CD i UV de la valoració d'apoMTC amb coure es va realitzar a partir d'una mostra de ZnMTC, purificada d'*E. coli*, alliberant-ne els ions zinc per acidificació fins a obtenir un espectre de CD nul. D'aquesta valoració s'obtingueren un conjunt d'espectres de CD, representats en la Figura VI.11.A i B, i d'UV, mostrats en la Figura VI.11.C i D.



**Figura VI.11.-** Espectres de CD (A i B) i UV (C i D) de la valoració de d'apoMTC amb Cu(I). A) 0, 2, 4, 6 i 9 equivalents de Cu<sup>+</sup>; B) 9, 10, 11 i 15 eq.; C) 0 – 10 eq. i D) 9, 10 i 15 equivalents.

En els primers passos de la valoració (Figura VI.11.A) s'observà com, a partir de l'apo-MTC, totalment desestructurada i, per tant, amb un espectre de CD d'intensitat nul·la per sobre dels 250 nm, s'anaven generant dues bandes, una de positiva a 263 nm i una segona de negativa a 285 nm, presents en la majoria de CuMTs degut a la interacció dels ions Cu(I) amb la proteïna.<sup>187</sup> Fins a l'addició del novè equivalent de Cu(I), les corbes de CD mostraren un increment successiu de la intensitat d'aquestes dues bandes. Aquest procés presenta una certa cooperativitat, tal com s'indicava en base als espectres de masses i, com s'apunta amb el punt isodicroic que apareix a 276 nm, en els espectres de CD.

A partir del novè equivalent de coure, l'estructura de la proteïna sofreix una pèrdua de quiralitat, mostrada per una disminució de la intensitat i un eixamplament de les bandes de CD (Figura VI.11.B).

Els espectres electrònics confirmen les dades obtingudes en el microïsm circular, mostrant un increment de l'absorció entre 220 i 350 nm fins a l'addició dels 9 primers equivalents de coure i, saturant-se el senyal en aquest punt de la valoració (Figura VI.11.C i D).

La proteïna MTC té prou capacitat per enllaçar 12 o més ions Cu(I), tal i com s'ha observat en les mostres homometàliques aïllades d'*E. coli*, en les obtingudes per reconstitució i en les assolides per valoració de la forma apoMTC. Malgrat aquesta gran

capacitat coordinant, les espècies amb una relació coure-proteïna de 12 o superior mostren una pèrdua del grau d'estructuració respecte a les espècies amb estequiometria inferior,  $\text{Cu}_8\text{MTC}$  i  $\text{Cu}_{10}\text{MTC}$ , o respecte a les espècies heterometàl·liques obtingudes en les síntesis  $\text{SCu1}$  i  $\text{SCu2}$ . Aquestes dades experimentals suggereixen que la proteïna MTC presenta, en la seva forma més estructurada, un contingut en coure inferior a 12, bé sigui contenint també zinc o no.

En les MTs de mamífer s'ha descrit que cadascun dels dominis que les formen poden enllaçar 6 ions  $\text{Cu(I)}$ , formant les respectives espècies  $\text{Cu}_{12}\text{MT}$ .<sup>192</sup> Malgrat això, s'ha determinat, en altres estudis, la importància de l'espècie  $\text{Cu}_8\text{MT}$ , per a aquestes proteïnes.<sup>21, 45</sup>

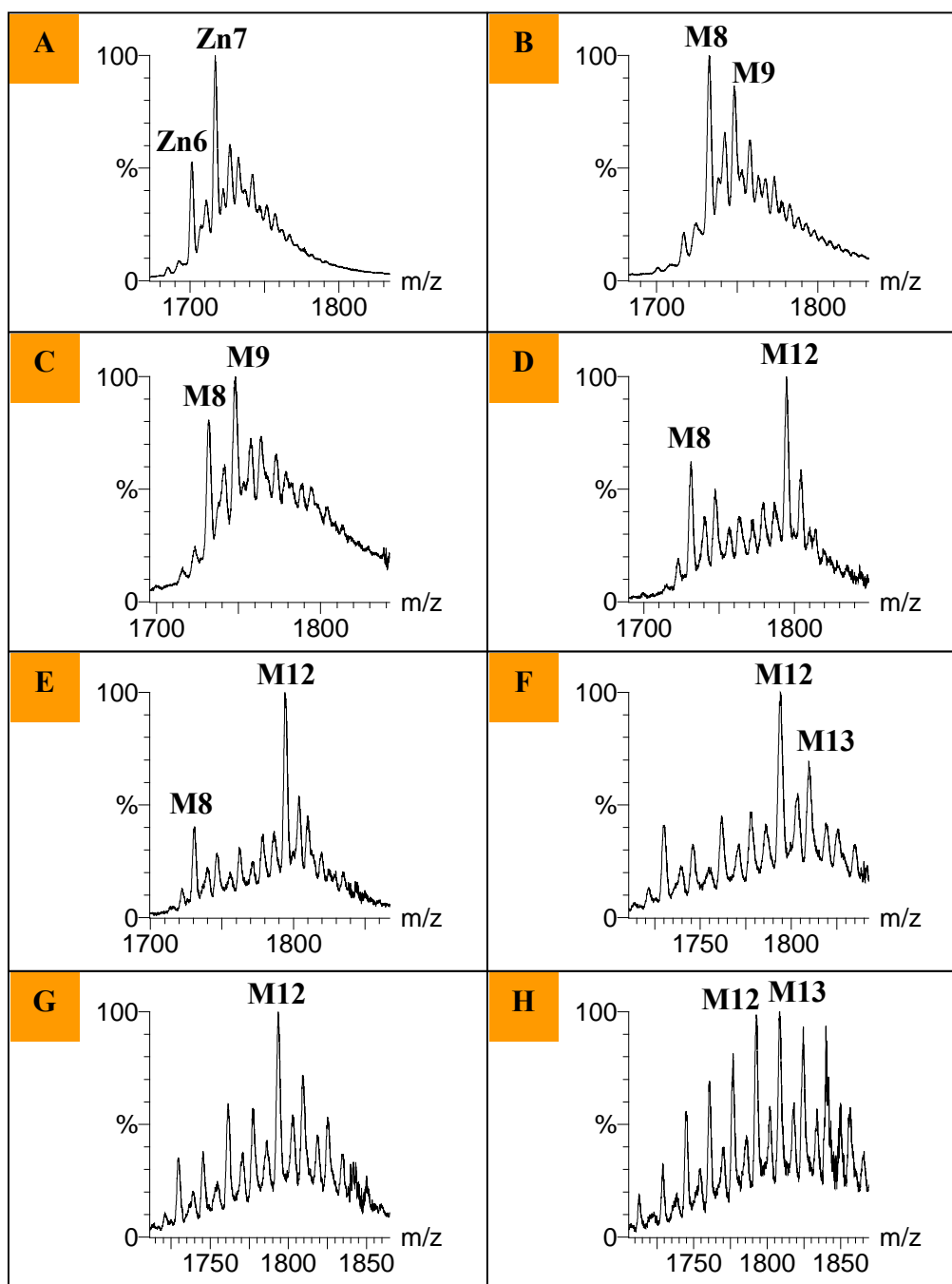


## VI.4. Valoració de ZnMTC amb coure

L'obtenció d'espècies heterometàl·liques Cu,ZnMTC en algunes de les síntesis en cultius d'*E. coli* enriquits únicament amb coure i l'enregistrament, per a aquestes, dels màxims graus de quiralitat observats en aquesta proteïna (SCu1 i SCu2, Taules IV.2 i IV.3), feren plantejar un possible paper estructural del zinc en MTC. Amb l'objectiu d'analitzar la possible via de formació de les espècies aïllades d'*E. coli* en SCu1 i SCu2, es va dur a terme la valoració de ZnMTC amb ions Cu(I).

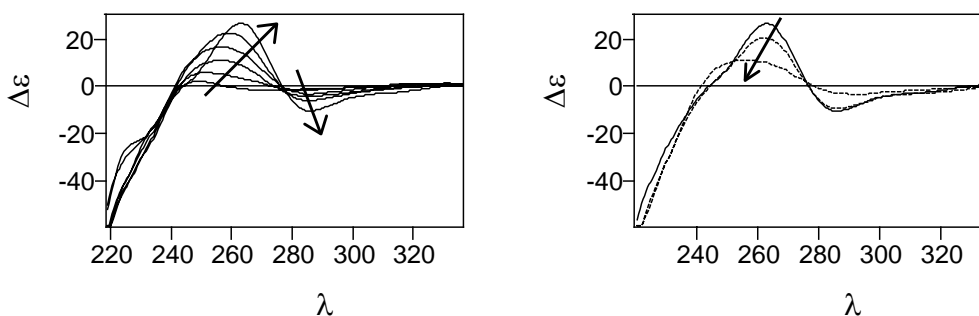
L'estudi de les espècies formades en la valoració amb coure de ZnMTC, obtinguda per reconstitució, es va realitzar per espectrometria de masses, Figura VI.12.

Com s'ha comentat anteriorment, aquesta tècnica no permet distingir entre els ions Zn(II) i els ions Cu(I), ja que tenen una massa molt pròxima. És per aquest motiu que s'indica el contingut total en metalls com a M, que representa la suma dels ions zinc i els ions coure. Malgrat no poder determinar la relació Zn/Cu de cada espècie, sí es pot observar l'increment de l'estequiometria metall-MTC que es dona com a conseqüència de l'addició de Cu(I) en el medi. L'evolució de les espècies metall-MTC du clarament a la formació de  $M_{12}MTC$ , amb la presència de  $M_8MTC$  com a intermedi rellevant, present en diversos punts de la valoració. La distribució d'espècies observada després d'haver addicionat entre 6 i 10 equivalents de coure (Figura VI.12.D, E i F) s'ajusta molt bé amb la distribució que presentaven les mostres aïllades de SCu1 i SCu2 (veure Figura IV.12). En passos posteriors de la valoració s'observa com la proteïna continua enllaçant ions coure, assolint estequiometries superiors a  $M_{14}MTC$ .



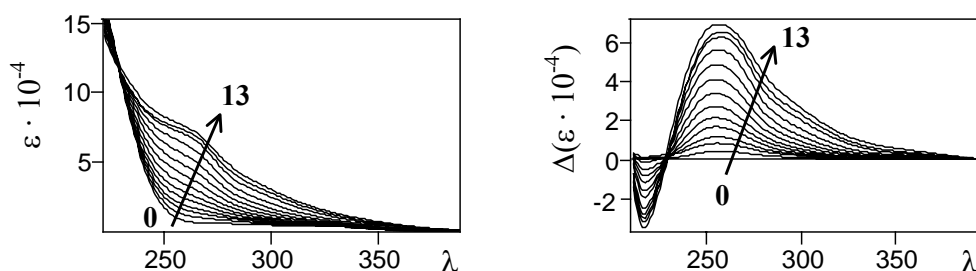
**Figura VI.12.-** Espectres d'ESI-MS de la valoració de ZnMTC, obtinguda per reconstitució, amb Cu(I). A) 0 eq. Cu<sup>+</sup>, B) 2 eq., C) 4 eq., D) 6 eq., E) 8 eq., F) 10eq., G) 12 eq. i H) 16 eq.

L'estudi espectroscòpic de la valoració de ZnMTC amb coure es dugué a terme partint de la proteïna aïllada de cultius d'*E. coli* enriquits amb zinc. El seguiment per CD i UV d'aquesta valoració permeté analitzar els canvis estructurals que sofria la proteïna en incorporar els ions Cu(I). En la Figura VI.13 es mostra l'evolució de la corba de CD de les espècies formades al llarg de la valoració.



**Figura VI.13.-** Espectres de CD de la valoració de ZnMTC, aïllada d'*E. coli*, després de l'addició de 0, 2, 5, 6, 8 i 12 equivalents de  $\text{Cu}^+$  (esquerra), i 12, 13 i 19 equivalents de  $\text{Cu}^+$  (dreta).

En el quadre de l'esquerra, s'observa com l'addició de coure a la mostra de ZnMTC induïx la formació d'una banda positiva a 263 nm i una de negativa a 285 nm, equivalents a les observades en la valoració d'apoMTC amb coure, que assoleixen la màxima intensitat quan la relació coure/proteïna és de 11 – 12. També s'observa, a 276 nm, un punt isodicroic indicatiu d'una certa cooperativitat en el procés de formació dels agregats Cu,ZnMTC. L'addició del 13è equivalent de coure provoca una pèrdua d'intensitat de les bandes de CD (Figura VI.13, dreta), malgrat que en el corresponent espectre electrònic (Figura VI.14), aquest equivalent continua mostrant un increment de l'absorbància entre 230 i 380 nm.

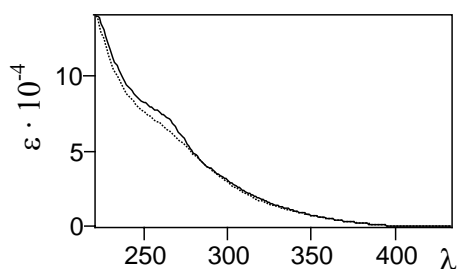


**Figura VI.14.-** Espectres electrònics de la valoració de ZnMTC, aïllada d'*E. coli*, després de l'addició de 0 – 13 equivalents de  $\text{Cu}^+$  (esquerra). A la dreta es mostren els respectius espectres de diferència respecte a l'espècie inicial ZnMTC.

Aquest canvi en la tendència dels espectres de CD, produït per l'addició del 13è equivalent de coure, podria respondre a un canvi en la conformació de la proteïna per facilitar la incorporació de més coure en la seva estructura.

L'addició de nous equivalents en la mostra provoca un desplegament dels agregats metàl·lics, com a conseqüència de l'excés de metall, presentant un

eixamplament de les bandes de CD (Figura VI.13, dreta) i una pèrdua d'absorció en l'espectre UV (Figura VI.15).

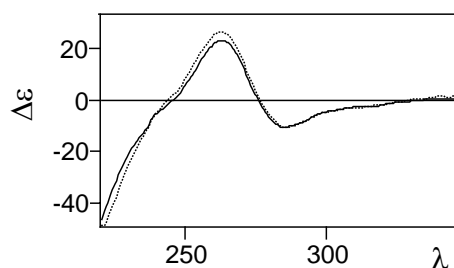


**Figura VI.15.-** Espectres electrònics de la valoració de ZnMTC, aïllada d'*E. coli*, després de l'addició de 13 (—) i 15 (···) equivalents de  $\text{Cu}^+$ .

Amb els resultats recollits en les valoracions seguides per ESI-MS, CD i UV, s'avalua el procés de formació dels agregats  $\text{Cu}_n\text{ZnMTC}$ , que finalment poden derivar a espècies homometàl·liques de coure. Mitjançant aquesta anàlisi s'ha detectat, en els primers passos de la valoració, la presència d'un intermedi amb estequiometria  $\text{M}_8\text{MTC}$ , que destaca per sobre de la resta d'espècies que s'observen en els espectres de masses.

L'obtenció de l'espècie  $\text{M}_{12}\text{MTC}$  es dona de manera parcialment cooperativa, i apareix per primer cop, després de l'addició del 6è equivalent de coure. La presència d'un excés de coure genera espècies de menor quiralitat, amb estequiometries  $\text{M}_{12}\text{MTC}$  –  $\text{M}_{15}\text{MTC}$ , majoritàriament, que coexisteixen en solució.

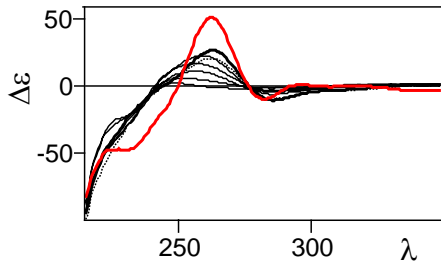
L'addició de 12 equivalents de coure a ZnMTC confereix un plegament a aquesta proteïna gairebé equivalent al que s'obté quan s'han addicionat 9 equivalents de coure a l'apoMTC (Figura VI.16). Aquesta superposició dels espectres de CD suggereix que en aquest punt de la valoració de ZnMTC s'ha desplaçat tot el zinc per ions coure.



**Figura VI.16.-** Espectres de CD d'apoMTC amb 9 equivalents de coure (—) i ZnMTC amb 12 equivalents de coure (···).

La comparació amb els espectres de CD obtinguts en les síntesis S $\text{Cu}_1$  i S $\text{Cu}_2$ , Figura VI.17, permet concloure que, mitjançant la valoració de ZnMTC amb ions  $\text{Cu(I)}$  no s'assoleixen agregats amb el grau de quiralitat observat per les mostres aïllades d'*E. coli*, la qual cosa suggereix que, la formació dels agregats més ben estructurats de MTC no té lloc mitjançant una primera coordinació dels ions zinc i un posterior reemplaçament per ions  $\text{Cu(I)}$ . Aquestes dades estarien d'acord amb els estudis del Dr.

Bouwer, en els quals es proposa que el coure alliberat per la proteïna GSH, és captat per MTC sintetitzada *de novo*, en lloc de desplaçar el zinc de les MTs del cranc que existeixen a nivell basal.<sup>136</sup>



**Figura VI.17.-** Espectres de CD de la valoració de ZnMTC després de l'addició de 0, 2, 5, 6, 8 equivalents de  $\text{Cu}^+$  (—), 12 (■) i 13 (⋯), i la mostra  $\text{SCu}_2$  (—).









## VII. Caracterització estructural de $^{113}\text{CdMTC}$

### VII.1. Precedents

L'estructura d'una metal·lotioneïna ve definida essencialment per la seva seqüència aminoacídica i pels metalls que hi estan coordinats. La determinació de l'estructura d'una MT permet associar la seva disposició tridimensional i la dels ions metàl·lics que inclou amb la funció que desenvolupa aquesta proteïna en l'organisme. Així, per exemple, les diferències funcionals descrites per les isoformes de mamífer s'han vist recolzades per la determinació d'algunes diferències a nivell estructural.<sup>38</sup>

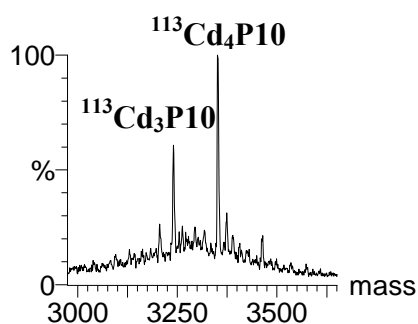
Les tècniques més emprades per caracteritzar l'estructura de qualsevol proteïna són la ressonància magnètica nuclear i la difracció de raigs X. En el camp de les metal·lotioneïnes, la major part d'estructures resoltes s'han determinat per RMN, ja que aquestes proteïnes presenten grans dificultats a l'hora de formar monocristalls. La manca d'èxit en la major part dels intents de cristal·litzar una MT s'han justificat, en algun cas, per la presència de fragments de la proteïna amb una conformació desordenada.<sup>50</sup>

La ressonància magnètica nuclear permet determinar l'estructura que adopta la cadena peptídica de la MT, així com la connectivitat metall-cisteïna, si el metall que està coordinat a la proteïna és un isòtop actiu en aquesta tècnica (ex:  $^{109}\text{Ag}$ ,  $^{111}\text{Cd}$  i  $^{113}\text{Cd}$ ).

## VII.2. Obtenció de les mostres de $^{113}\text{CdMTC}$ i $^{113}\text{CdP10}$

Les mostres de  $^{113}\text{Cd}_8\text{MTC}$  que permeteren una caracterització parcial de l'estructura de la proteïna han estat tres. Aquestes s'han anomenat MTC1, MTC2 i MTC3. L'obtenció d'aquestes mostres es va dur a terme, com s'indica a Mètodes, mitjançant la reconstitució d'apoMTC amb  $^{113}\text{Cd(II)}$ .

L'espècie CdMTC majoritària, en la reconstitució amb cadmi, fou  $^{113}\text{Cd}_8\text{MTC}$ , segons dades d'espectrometria de masses. En el cas del pèptid P10, corresponent a l'extrem N-terminal de la proteïna (pèptid  $_{2-31}$ ), es preparà una única mostra de  $^{113}\text{CdP10}$ , mitjançant la reconstitució d'apoP10 amb  $^{113}\text{Cd}$ , segons es detalla a Mètodes, en la que l'espècie majoritària era  $^{113}\text{Cd}_4\text{P10}$ , Figura VII.1.



**Figura VII.1.-** Espectre d'ESI-MS de la mostra de  $^{113}\text{CdP10}$  obtinguda per reconstitució (deconvolució de l'espectre original).

### VII.3. Anàlisi per RMN de les mostres de $^{113}\text{CdMTC}$ i $^{113}\text{CdP10}$

La caracterització estructural de la proteïna MTC s'emprengué des de dos fronts diferents: mitjançant l'estudi de la proteïna sencera, obtinguda per tècniques d'enginyeria genètica i, mitjançant la caracterització del pèptid  $_{2-31}$  (P10), pèptid sintètic adquirit a Ezbiolab.

Els estudis de RMN, tant homonuclears (RMN de  $^1\text{H}$  i RMN de  $^{113}\text{Cd}$ ) com heteronuclears (RMN de correlació  $^1\text{H}$ - $^{113}\text{Cd}$ ) requereixen altes concentracions de proteïna (de l'ordre de milimolar). Les metal·lotioneïnes en general presenten una elevada susceptibilitat a l'oxidació en medi aeròbic, formant ponts disulfur i, sovint, perdent part dels seus ions metàl·lics. L'ús d'un agent reductor per incrementar l'estabilitat d'aquestes mostres ha resultat contraproductiu, ja que aquests agents solen presentar senyals en els espectres de RMN de  $^1\text{H}$  en la mateixa regió on apareixen els protons  $\beta$  de les cisteïnes ( $\sim 3.5$  ppm). Aquests fets dificultaren en gran mesura la realització dels espectres i la posterior assignació dels aminoàcids.

La comparació dels espectres obtinguts a partir de les tres mostres de MTC (MTC1, MTC2 i MTC3) i del pèptid, P10, va ser decisiva a l'hora d'assignar a quin domini pertanyia cada ió  $\text{Cd(II)}$ .

#### *Espectres homonuclears de $^1\text{H}$*

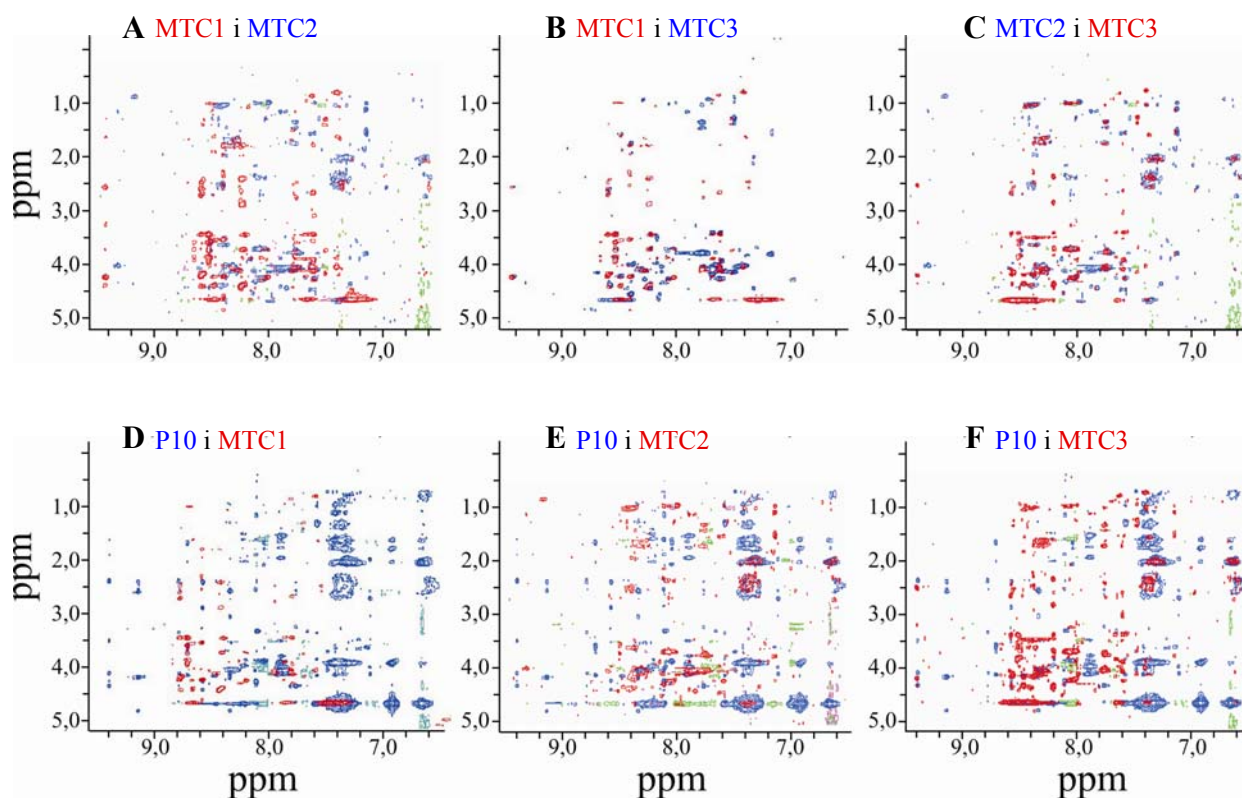
Els espectres bidimensionals NOESY, de la zona NH-H $\alpha$ , proporcionen l'empremta de la proteïna. En la Figura VII.2 es presenten, superposats entre ells, els espectres enregistrats per les quatre mostres (MTC1, MTC2, MTC3 i P10). Els espectres de MTC3 i MTC1 presenten pics de creuament comuns, Figura VII.2.B, la qual cosa indica que aquestes mostres mantenen una part de l'estructura amb el mateix plegament. Anàlogament, la superposició dels espectres de MTC3 i MTC2, Figura VII.2.C, també mostra pics de creuament comuns, indicant que MTC3 i MTC2 presenten elements estructurals equivalents. Els espectres de MTC1 i MTC2, contràriament, gairebé no presenten senyals en comú, Figura VII.2.A, suggerint que els elements que comparteixen aquestes dues mostres amb MTC3 no els comparteixen entre elles.

El recull de dades obtingudes a partir dels espectres NOESY de les tres mostres de MTC indiquen clarament que MTC3 presenta un grau de plegament superior al que

s'observa en les altres dues. MTC1 i MTC2 només mostren la conservació d'una part del plegament de la proteïna i, sorprenentment, aquesta està situada en dominis diferents en cada una d'elles.

Comparant els espectres NOESY de P10 amb els de les mostres de MTC, s'observen molts pocs pics de creuament comuns (Figura VII.2.D-F). Aquest fet indica que, probablement, l'aïllament de l'extrem N-terminal de la proteïna en el pèptid P10 du a una estructura tridimensional modificada respecte a la que presenta aquesta mateixa seqüència quan es troba en la proteïna sencera, suggerint una certa interacció o dependència entre ambdós dominis.

La baixa qualitat dels espectres, deguda a la inestabilitat de les mostres, a la concentració insuficient de proteïna, la precipitació i la presència d'agents reductors protonats, juntament amb la dispersió dels senyals i l'elevat grau de solapament, degut al gran nombre de cisteïnes, han fet impossible, fins al moment, l'assignació dels senyals.



**Figura VII.2.-** Comparació de les zones NH-H $\alpha$  dels espectres NOESY de A) MTC1 i MTC2, B) MTC1 i MTC3, C) MTC2 i MTC3, D) P10 i MTC1, E) P10 i MTC2 i F) P10 i MTC3.

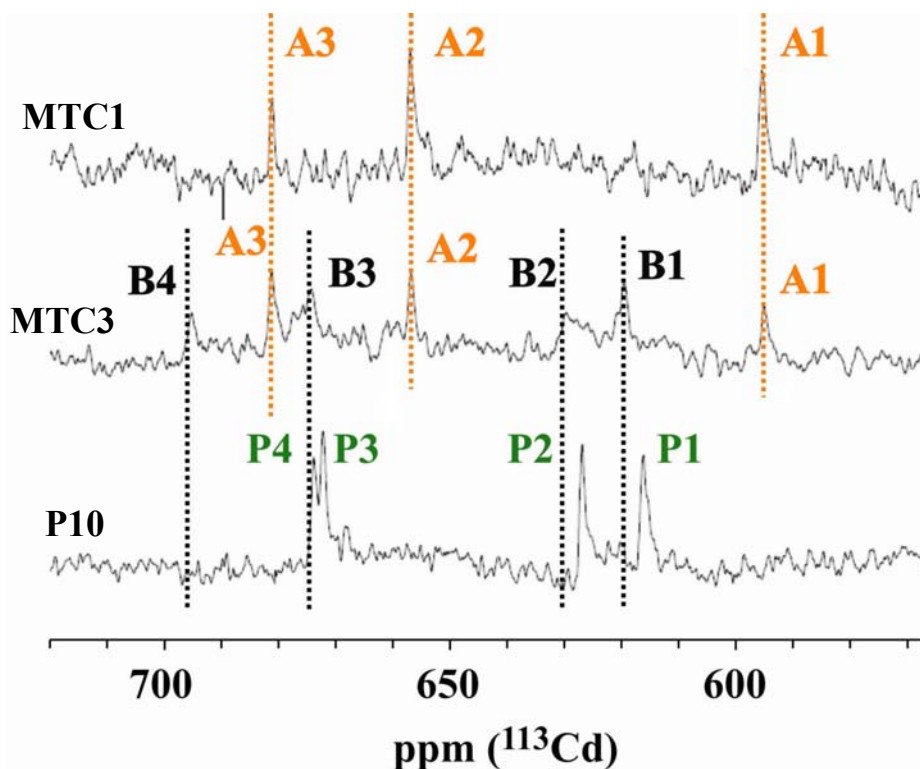
***Espectres homonuclears de  $^{113}\text{Cd}$***

Es van enregistrar els espectres de  $^{113}\text{Cd}$  directe de totes les mostres, excepte de MTC2, ja que, degut a la baixa concentració de proteïna en aquesta mostra i, probablement també, a la presència de llocs inespecífics d'unió al cadmi, amb una interacció més dèbil entre el metall i les cisteïnes (veure més detalls en la descripció dels espectres HSQC  $^1\text{H} - ^{113}\text{Cd}$ ), no se'n va poder enregistrar el seu espectre de  $^{113}\text{Cd}$ . Cal recordar que l'adquisició de  $^{113}\text{Cd}$  directe és un experiment de molt baixa sensibilitat.

En la Taula VII.1 s'indiquen els desplaçaments químics dels nuclis de  $^{113}\text{Cd}$  dels senyals observats i, en la Figura VII.3 es mostren els tres espectres enregistrats de  $^{113}\text{Cd}$  directe. En l'espectre de MTC1 apareixen tres senyals (A1, A2 i A3), el desplaçament dels quals coincideix amb tres dels senyals que presenta MTC3, Figura VII.3. En MTC3, però, s'observen clarament un mínim de 7 senyals (A1 – A3, B1 – B4), la qual cosa suggereix, de nou, que en aquesta mostra la proteïna es troba en un grau de plegament superior que en MTC1, Figura VII.3.

**Taula VII.1.-** Desplaçaments químics dels nuclis de  $^{113}\text{Cd}$  dels senyals observats per les mostres MTC1, MTC2 i MTC3.

Cadmi	Desplaçament químic (ppm)		
	MTC1	MTC2	MTC3
A1	594.9		594.9
		611.8	
B1		618.3	618.9
			622.4
			625.6
B2		630.1	630.1
A2	657.1	657.7	657.1
B3		662	661.2
		667.1	
			674.9
		676.7	
A3	681.3	681.8	681.3
B4			695.3



**Figura VII.3.-** Espectres de  $^{113}\text{Cd}$  directe de MTC1, MTC3 i P10.

L'absència dels senyals B1 – B4 en MTC1 indica que l'entorn químic d'aquests quatre cadmis s'ha vist significativament alterat en aquesta mostra, bé sigui perquè es troben en posicions inespecífiques, amb una interacció metall-cisteïna dèbil, o perquè s'ha trencat l'enllaç que els unia a la proteïna. En canvi, els altres tres cadmis, A1 – A3, no s'han vist modificats respecte a la mostra MTC3.

És molt poc probable que canviï l'entorn químic d'un nucli, quan es troba formant part d'un agregat metàl·lic, sense que es modifiqui l'entorn químic de cap dels ions cadmi d'aquest mateix agregat. Per aquest motiu s'assumeix que els tres ions representats pels senyals A1 – A3 es troben en el mateix agregat metàl·lic (que s'anomenarà agregat A, a partir d'ara) i, que els quatre ions restants (B1 – B4) corresponen a un segon agregat (agregat B).

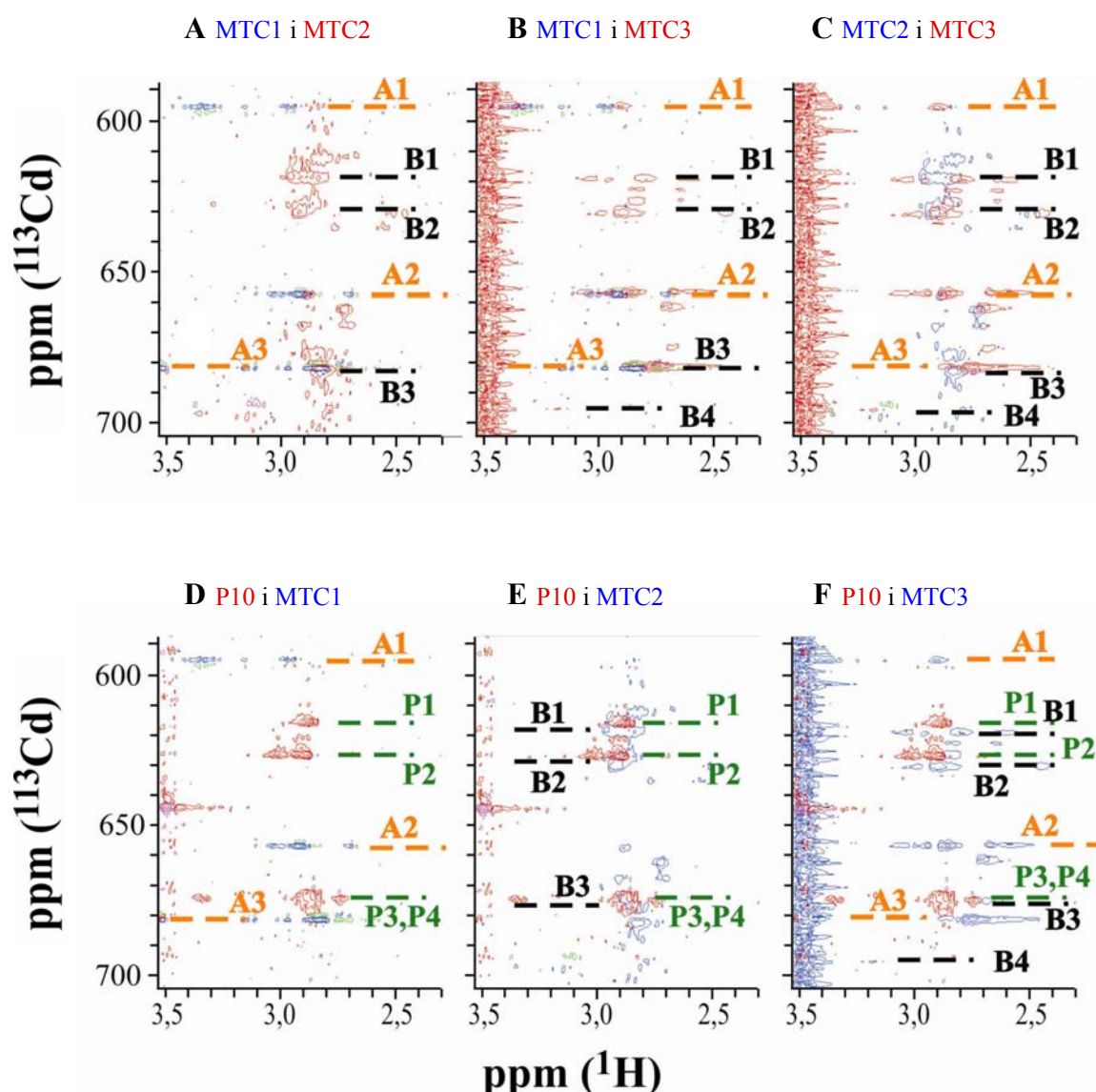
Les condicions d'obtenció de la mostra MTC1 (concentrada mitjançant els concentradors Millipore, i tractada amb un agent reductor després d'haver precipitat) han pogut influenciar en la pèrdua, total o parcial, de l'agregat B. En canvi, MTC3 es concentrà mitjançant liofilització i es redissolgué totalment sense necessitat d'un agent reductor.

En la Figura VII.3 es mostra l'espectre de  $^{113}\text{Cd}$  directe de P10. El pèptid P10 correspon al fragment 2 – 31 de la proteïna nativa. Es va escollir aquest fragment, ja que, per analogia amb altres MTs, era probable que es correspongués amb els aminoàcids que formen un dels dominis de la proteïna. En la Figura VII.3 s'observa com P10 enllaça quatre ions cadmi (P1 – P4), amb una estructura determinada, es a dir, formant un agregat metàl·lic. És poc probable que P10 formi un agregat amb una estructura terciària ben definida (veure Figura VII.2.D-E i Figura VII.3) i, que aquesta sigui completament diferent a qualsevol dels agregats observats per MTC.

Si s'analitza en detall els espectres de MTC3 i P10, es troben algunes analogies. Els desplaçaments químics de tres dels senyals que presenta P10 (P1, P2 i P3 o P4 – aquests dos darrers presenten desplaçaments químics molt similars) s'ajusten, amb certes diferències, amb els desplaçaments observats per B1 – B3, en MTC3 (veure Figura VII.3 i Taula VII.1). El senyal B4, de la mostra MTC3, no es correspon, però, amb cap senyal de P10 (Figura VII.3), la qual cosa suggereix que aquest ió ha vist modificat el seu desplaçament químic, transformant-se en P3 o P4. Aquesta alteració pot ser deguda a un reordenament espacial d'una o més cisteïnes unides a aquest cadmi, probablement motivat per l'absència de l'agregat A en el pèptid, afectant al desplaçament químic del cadmi. Aquestes dades suggereixen que l'agregat que forma P10 és anàleg a l'agregat B, però que, una certa dependència entre ambdós agregats fa que l'aïllament l'un de l'altre provoqui certs canvis conformacionals.

#### ***Correlació heteronuclear: HSQC $^1\text{H} - ^{113}\text{Cd}$***

En la Figura VII.4 es presenten, superposats, els espectres HSQC de  $^1\text{H} - ^{113}\text{Cd}$  de les tres mostres de MTC i de la mostra P10. Els experiments HSQC són molt més sensibles que l'observació directa de l'heteronucli, ja que, en aquests experiments s'aprofita la sensibilitat del protó, que és, en darrer terme, el nucli observat directament. Malgrat això, tots els experiments que es mostren es realitzaren amb 512 escombrats per increment, amb una duració total d'unes 24 hores.



**Figura VII.4.-** Comparació dels espectres HSQC  $^1\text{H} - ^{113}\text{Cd}$  de les mostres: A) MTC1 i MTC2, B) MTC1 i MTC3, C) MTC2 i MTC3, D) P10 i MTC1, E) P10 i MTC2, F) P10 i MTC3.

Els espectres de MTC1 i MTC3 (Figura VII.4B) presenten una superposició parcial: els desplaçaments de  $^{113}\text{Cd}$  de l'agregat A coincideixen totalment (com ja s'havia vist en els experiments de  $^{113}\text{Cd}$  directe) i els respectius desplaçaments de protó observats mostren una elevada similitud. Aquestes dades indiquen que l'agregat A es manté en ambdues mostres. En canvi, l'agregat B no s'observa en la mostra MTC1, amb la qual cosa, es pot concloure que MTC1 i MTC3 només mantenen un agregat en comú i, per aquest motiu, els seus espectres de protó coincideixen només parcialment.

MTC3 i P10 (Figura VII.4.F) també es superposen parcialment, consolidant les dades obtingudes per  $^{113}\text{Cd}$  directe. Assumint que els senyals B1 i B2 són els mateixos



que P1 i P2, amb un petit desplaçament, la coincidència seria acceptable. Els senyals B3 i B4 són molt dèbils en MTC3, dificultant la seva comparació amb P3 i P4. Aquestes dades reafirmen les conclusions que s'havien extret amb els espectres de  $^{113}\text{Cd}$  directe, on s'havia proposat l'equivalència dels agregats B i P (essent l'agregat P el que forma el pèptid P10).

Cal indicar, addicionalment, que en l'espectre de MTC3 s'observaven un mínim de 3 senyals de  $^{113}\text{Cd}$ , no esmentats fins al moment, amb intensitat menor, que poden correspondre a ions units de forma menys específica, o bé a ions que es troben en bescanvi químic amb diverses cisteïnes. Dos d'aquests senyals presenten desplaçaments químics de protó iguals. Una explicació raonable a aquest fet seria la presència d'un ió  $\text{Cd(II)}$  enllaçat a una mateixa cisteïna, però en dos entorns diferents, es a dir, que el cadmi, juntament amb la cisteïna es moguessin entre dues posicions, en condicions de bescanvi lent.

Per altra banda, els espectres de MTC1 i P10 (Figura VII.4.D) són completament diferents, la qual cosa està indicant que els agregats metàl·lics d'ambdues mostres no són el mateix. Aquesta dada corrobora, novament, la hipòtesi que es proposava, en base als resultat de  $^{113}\text{Cd}$  directe, on s'indicava que l'agregat A i P no són el mateix.

Els espectres corresponents a MTC2 mereixen una discussió independent. A partir d'aquesta mostra, com ja s'ha indicat anteriorment, no es van poder obtenir espectres de  $^{113}\text{Cd}$  directe. En canvi, els espectres de correlació  $^1\text{H} - ^{113}\text{Cd}$  sí es van poder enregistrar i mostren diversos senyals (Figura VII.4.A, C i E), dos dels quals conserven els desplaçaments químics de  $^{113}\text{Cd}$  que s'havien descrit per B1 i B2, en MTC3. Els corresponents desplaçaments químics de protó també coincideixen, però de manera menys precisa. Si es compara MTC2 i P10 (Figura VII.4.E), el senyal B3 també mostra certa coincidència. Aquesta semblança indicaria que MTC2 podria contenir l'agregat B, inalterat, però a baixa concentració. Malgrat això, existeixen tot un conjunt de senyals, més dèbils i menys ben resolts, que no coincideixen amb els senyals que s'havien observat prèviament en les altres mostres. En conjunt, aquestes dades semblen indicar que en MTC2 probablement hi ha ions cadmi en diversos llocs d'unió, mantenint gairebé inalterat l'agregat B i sense cap indicatiu de la presència de l'agregat A. Tot i que resulta difícil extreure conclusions d'aquesta mostra, es pot dir que MTC2 presenta una major similitud amb l'agregat B, de MTC3, i l'agregat P, de P10, que amb l'agregat A, de MTC1 i MTC3.

Tots els resultats obtinguts per RMN de  $^{113}\text{Cd}$ , tant homonuclears com heteronuclears, corroboren les dades obtingudes per RMN de protó. Els espectres de protó de MTC3 mostraven semblances amb els de MTC1 i MTC2, però aquests dos eren diferents entre si.

La semblança entre els agregats B i P indicaria que, probablement, l'agregat B correspon a l'extrem N-terminal de la proteïna i, per tant, l'agregat A correspondria a l'extrem C-terminal.

## VII.4. Discussió

L'estudi per RMN dels agregats metàl·lics que formen MTC i el pèptid P10 amb Cd(II) ha permès extreure unes conclusions molt valuoses, que reforcen els resultats obtinguts amb les tècniques exposades anteriorment.

La caracterització estructural del pèptid P10, corresponent a l'extrem N-terminal de la proteïna, ha mostrat la presència d'un agregat metàl·lic amb una estructura tridimensional definida, que conté quatre ions cadmi. La proximitat de les dades obtingudes per aquest pèptid amb alguns dels senyals descrits per la proteïna sencera (MTC3) ha permès proposar que l'agregat format en P10 es correspon amb un dels agregats metàl·lics de CdMTC, el que s'ha anomenat com B, i que la proteïna sencera està formada per aquest i un segon agregat, denominat A.

Els resultats de RMN, confirmen per primer cop la presència en M(II)-MTC de dos agregats metàl·lics. En base al nombre d'aminoàcids i de cisteïnes d'aquesta proteïna s'esperava una distribució dels ions divalents en dos dominis, però cap estudi publicat fins al moment havia aportat dades que ho confirmessin.

Els ions cadmi que conté la proteïna apareixen repartits, segons dades de RMN de  $^{113}\text{Cd}$ , en dos agregats, A i B, amb estequiometria  $\text{Cd}_3(\text{SCys})_{11}$  i  $\text{Cd}_4(\text{SCys})_{10}$ , respectivament. Però la presència de senyals addicionals menys intenses, disposades, presumptament, en posicions inespecífiques, podrien ampliar l'estequiometria d'algun dels agregats, probablement de l'agregat A, que conté una relació Cd/Cys baixa, en relació amb el que s'ha descrit fins ara en la bibliografia.

La presència d'un agregat amb estequiometria  $\text{Cd}_4(\text{SCys})_{10}$  s'ha pogut comprovar mitjançant l'estudi del pèptid corresponent a l'extrem N-terminal d'aquesta proteïna, P10, en el qual s'han observat, clarament, 4 senyals en RMN de  $^{113}\text{Cd}$  directe, que presenten una correlació parcial amb els senyals observats per l'agregat B de MTC. El motiu  $\text{M}^{\text{II}}_4(\text{SCys})_{10}$  apareix per primer cop en una MT, suggerint que la presència de triplets en aquesta proteïna permet una coordinació lleugerament modificada a la descrita, en general, per la resta de metal·lotioneïnes, on predominen les estequiometries  $\text{M}^{\text{II}}_3(\text{SCys})_9$  i  $\text{M}^{\text{II}}_4(\text{SCys})_{11}$ .

Les diferències detectades en els desplaçaments químics de l'agregat B, de MTC, i de l'agregat P, de P10, suggereixen la presència de canvis conformationals, induïts per l'absència de l'agregat A en el pèptid. Aquesta observació insinuaria que, en aquesta proteïna, hi ha una certa dependència interdominial.







## VIII. Paper dels dominis de la MT de mamífer en la resposta inflamatòria

L'objectiu principal d'aquesta tesi era la caracterització de la metal·lotioneïna de cranc MTC, mitjançant estudis de les propietats coordinants i estructurals de la proteïna. Malgrat això, també ens plantejarem com a segon objectiu contribuir en l'estudi de les funcions d'aquesta família de metal·loproteïnes. El fet de tenir la caracterització de MTC en una fase força preliminar i amb l'objectiu de comparar els resultats obtinguts amb les dades disponibles en la bibliografia, es va decidir realitzar un estudi fisiològic amb MT de mamífer, en lloc d'emprar la MT del cranc.

L'estudi del paper dels dominis de la MT de mamífer en la resposta inflamatòria ha estat un treball realitzat en col·laboració amb el grup del Dr. Hidalgo, de Fisiologia Animal de la UAB. S'ha cregut interessant incloure en aquest manuscrit el treball realitzat en aquesta col·laboració, ja que enfoca l'estudi d'una MT des d'un punt de vista totalment diferent al que hem utilitzat per analitzar MTC, enriquint així les possibles vies d'estudi d'una proteïna.

### VIII.1. Introducció i objectius

Un dels grans reptes pendents en l'estudi de les metal·lotioneïnes és la determinació dels papers fisiològics que pot desenvolupar aquesta àmplia família de proteïnes, especialment en el sistema nerviós central (CNS).

El sistema nerviós central humà està format per l'encèfal i la medul·la espinal. Una part constituent de l'encèfal és el cervell, el qual presenta dos tipus de cèl·lules: les neurones i les cèl·lules glials. Les darreres són cèl·lules encarregades de la reparació i regeneració de les lesions del sistema nerviós central. En situació de lesió en el CNS, s'activen senyals que donen lloc a una resposta inflamatòria. La primera línia de defensa en aquest sistema són les cèl·lules microglials (microglia) i els astròcits, dos tipus de cèl·lules glials. S'ha descrit que les metal·lotioneïnes poden participar en la funció que desenvolupen aquestes cèl·lules glials, com a neuroprotectores i neuroregeneradores.<sup>74, 77, 193, 194</sup>

Les isoformes de mamífer que s'expressen en el CNS són MT-1, MT-2 i MT-3. MT-1 i MT-2 s'indueixen en resposta a diferents situacions patològiques i neurodegeneratives.<sup>74</sup> La isoforma MT-3, a diferència del que passa amb les altres dues,

presenta un sistema de regulació i una funcionalitat diferenciada. En lesions traumàtiques, per exemple, els nivells de MT-3 mostren un descens inicial i, una posterior inducció, quan s'ha format la cicatriu glial.<sup>† 195</sup>

L'ús d'animals transgènics per estudiar el paper de les MTs en les malalties del CNS ha permès, mitjançant treballs amb ratolins que sobreexpressen MT-1 o que han estat genoanul·lats per MT-1 i MT-2, relacionar aquestes proteïnes amb un descens de l'estrès oxidatiu, la inflamació i l'apoptosi.

La criolesió ha estat un dels models utilitzats per estudiar els mecanismes implicats en la resposta inflamatòria. Aquest tipus de lesió provoca el trencament de la barrera hematoencefàlica, edema, gliosi (activació de les cèl·lules glijals), reclutament de cèl·lules inflamatòries, mort necròtica i apoptòtica, així com inducció de gens involucrats en la supervivència neuronal.

Una via per avaluar les funcions de les MTs en el model de la criolesió és l'administració exògena de la proteïna. S'ha comprovat que la MT subministrada mitjançant aquest procediment manté els mateixos efectes que la proteïna endògena,<sup>196</sup> habilitant-la així, com a potencial agent terapèutic.

La determinació dels mecanismes mitjançant els quals aquestes proteïnes duen a terme les seves funcions és, actualment, un dels principals focus d'estudi de les MTs. Les metal·lotioneïnes expressades en els astròcits mostren un acció beneficiosa en la regeneració neuronal. En un recent estudi, s'ha pogut identificar un receptor (*megalin*) que permet el transport de les MTs segregades pels astròcits del medi extracel·lular a l'interior de la neurona,<sup>75</sup> posant de manifest, una possible via de comunicació entre ambdós tipus de cèl·lules. En un altre estudi, s'ha proposat el motiu Cys<sub>19</sub>-Lys-Cys-Lys, present en el domini  $\beta$  de la MT, com el responsable principal de la interacció de la proteïna amb el receptor *megalin*,<sup>78</sup> donant, així, un pas endavant en el coneixement del funcionament d'aquestes proteïnes.

Altres possibles vies d'acció de la MT, en el seu paper neuroprotector, podrien donar-se mitjançant els ions metàl·lics que es troben enllaçats a la MT o mitjançant altres propietats químiques que presenten aquestes proteïnes, com és l'elevat contingut en cisteïnes.<sup>197</sup> Els dos dominis que formen les MTs de mamífer mostren una reactivitat diferent dels seus tiolats cisteïnics. Les característiques pròpies de cada domini fan que aquests presentin una capacitat específica per transferir els ions metàl·lics a molècules

---

<sup>†</sup> La cicatriu glial, formada per astròcits reactius, té com a objectiu principal aïllar físicament la zona lesionada del teixit sa.



acceptores i per reaccionar amb agents oxidants. En la reacció amb el reactiu d'Ellman, per exemple, que oxida els tiols cisteínics formant ponts disulfur, el domini  $\beta$ MT-2 mostra una cinètica més ràpida. Aquest domini també presenta una major capacitat per cedir els seus ions Zn(II) a enzims, afavorida per una labilitat superior dels enllaços que forma amb aquest metall.<sup>198</sup> Les diferents propietats que mostren els dominis de les MTs han dut a proposar una diferent funcionalitat per a cadascun d'ells, atribuint al domini  $\alpha$  un paper destoxicador i al domini  $\beta$  un paper relacionat amb la homeòstasi del zinc i del coure.<sup>80</sup>

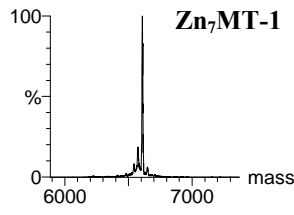
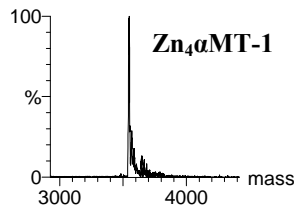
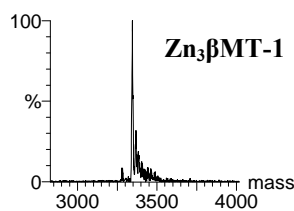
Amb l'objectiu d'avaluar aquest diferent comportament dels dominis de les MTs de mamífer *in vivo*, s'ha obtingut la MT-1 de ratolí i els seus respectius dominis per separat i s'han estudiat els efectes de l'administració exògena d'aquests pèptids en ratolins MT-1/-2 KO, criolesionats, tant a nivell conductual, histològic, com d'expressió gènica. Tots els assaigs fisiològics d'aquest estudi, en els quals he participat, familiaritzant-me en la manipulació dels ratolins i en les diferents tècniques emprades en aquest experiment (conducta, criolesió, anàlisi gènica i histològic), han estat encapçalats per na Yasmina Manso i dirigits pel Dr. Juan Hidalgo.

## VIII.2. Resultats

### *Caracterització de ZnMT-1 de ratolí i dels seus dominis obtinguts per enginyeria genètica*

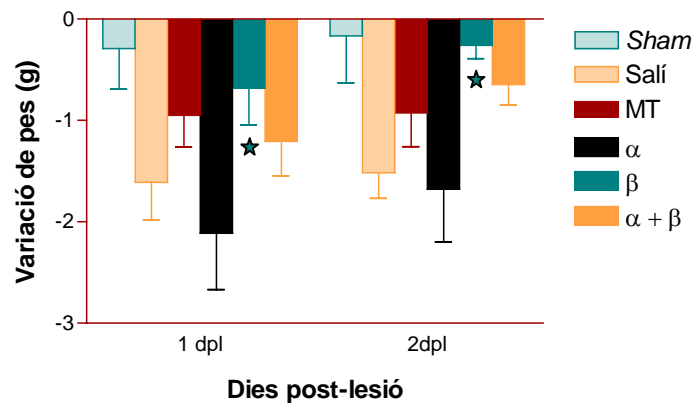
Els complexos de zinc recuperats de la síntesi de MT-1 i dels seus dominis constituents en *E. coli* es van caracteritzar mitjançant espectrometria de masses i ICP-AES. Els resultats d'aquests estudis es mostren en la Taula VIII.1.

**Taula VIII.1.-** Dades analítiques i espectromètriques dels complexos de zinc obtinguts de la síntesi recombinant de MT-1 de ratolí i dels seus dominis.

Pèptid	ICP-AES (Contingut metàl·lic)	ESI-MS
MT-1	$6.5 \pm 0.2$ Zn/MT	
$\alpha$ MT-1	$3.7 \pm 0.1$ Zn/MT	
$\beta$ MT-1	$2.65 \pm 0.03$ Zn/MT	

### Variació del pes

Es controlà la variació del pes de cada animal després de la criolesió per tal d'avaluar la capacitat de recuperació d'aquests. En el gràfic representat en la Figura VIII.1.a s'observen les mitjanes de la variació del pes enregistrada després de la criolesió, per a cada grup d'animals.



**Figura VIII.1.-** Representació de les variacions del pes dels ratolins els dies posteriors a la criolesió, respecte el pes del dia previ a la lesió. S'indiquen amb una estrella els grups que difereixen significativament del salí, amb un grau de significació  $p < 0.05$ .

Els pesos enregistrats el dia després de la criolesió mostraren un descens significatiu respecte al dia anterior a aquesta. Els *sham* mostraren poca pèrdua de pes, ja que aquest grup no es va criolesionar. Exceptuant els *sham*, el grup que experimentà menys pèrdua de pes fou el tractat amb el domini  $\beta$ , variació que diferia significativament de l'observada pel grup salí.

En el segon dia després de la criolesió, s'obtingué un guany de pes general, respecte el dia anterior, indicant l'inici de la recuperació dels animals als efectes del dany que se'ls havia causat. De nou, el grup que mostrà una major recuperació del pes fou el que s'havia tractat amb el pèptid corresponent al domini  $\beta$ . Aquesta dada suggereix que l'administració exògena d'aquest pèptid té una acció protectora front la pèrdua de pes observada després de la lesió.

La realització dels tests conductuals, al segon i tercer dia post-lesió, es veié també reflectida en els pesos dels ratolins, que mostraren una pèrdua de pes gairebé uniforme, en els diferents grups, a 3 i 4 dpl. En aquests casos, ja no es pot analitzar

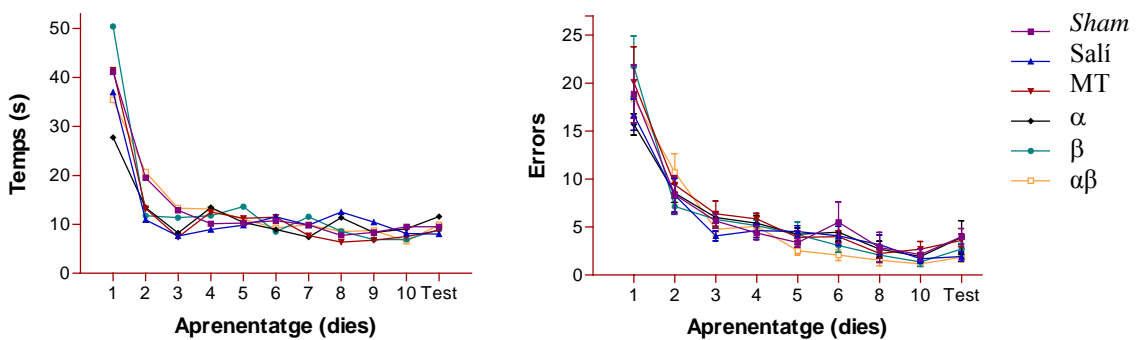
l'efecte del tractament en la variació del pes, ja que la influència de les proves conductuals a aquest paràmetre és gran i difumina les diferències entre grups.

**Proves conductuals**

Per tal d'avaluar la coordinació motora i la capacitat de recuperació dels ratolins en funció del tractament que se'ls aplica, després d'haver sofert una lesió cerebral a l'àrea motora, es van dur a terme dos tipus de proves conductuals: l'escala horitzontal (*ladder beam*) i la barra giratòria (*RotaRod*). Es van sotmetre els animals a un període d'aprenentatge, a un test previ a la criolesió i a dos tests a 2 i 3 dies després de la lesió, anomenats retests.

✓ Escala horitzontal (*horizontal ladder beam*)

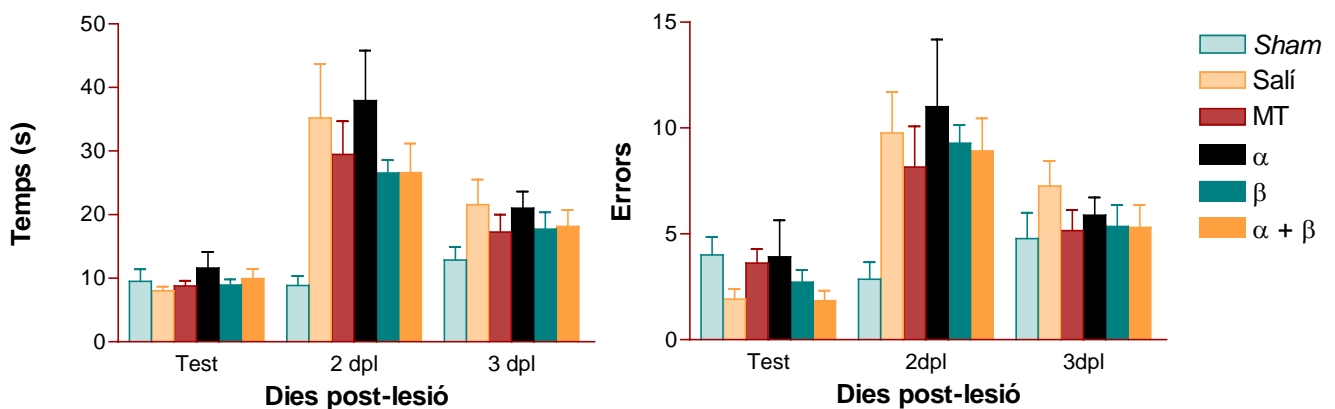
El període d'aprenentatge de la prova *ladder beam* constà de 10 dies, en els quals, cadascun dels ratolins havia de creuar un cop la passarel·la, disposada en mode de *shock*. Tal com s'observa en la Figura VIII.2, durant els primers dies d'aprenentatge tots els ratolins aconseguiren disminuir el temps de realització de la prova fins a uns 10 segons, mantenint gairebé constant aquest paràmetre fins el dia del test. També minimitzaren el nombre d'errors comesos durant la prova.



**Figura VIII.2.-** Representació del temps i dels errors enregistrats per cada grup de ratolins en la prova de l'escala horitzontal, durant els dies d'aprenentatge.

El dia abans de la criolesió se sotmeteren els animals al test, emprant el mode sensor. Al segon i al tercer dia després de la criolesió s'aplicaren els retests, també en mode sensor, per avaluar com havia afectat la criolesió a la coordinació motora dels ratolins i com el tractament aplicat podia facilitar la recuperació de l'animal.

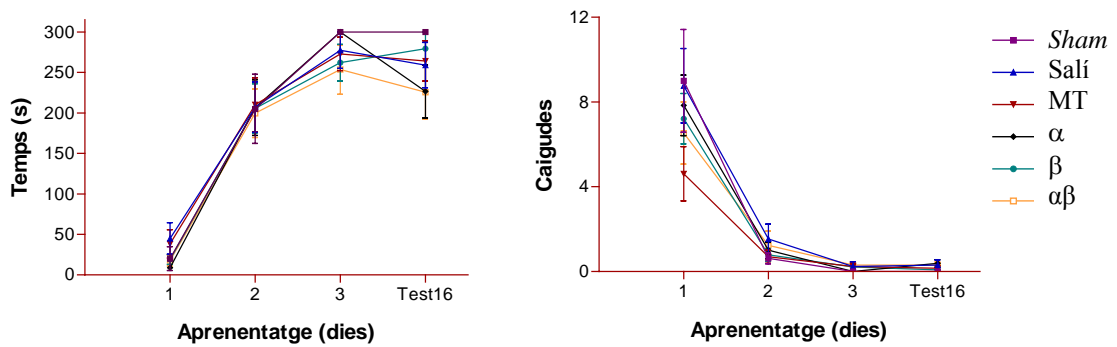
Els gràfics mostrats en la Figura VIII.3 indiquen la mitja del temps que necessitaren els ratolins de cada grup per superar la prova i els errors comesos durant aquesta, en el test (el dia abans de la criolesió) i en els retests (a 2 i 3 dpl). S'observà a 2 dpl un increment significatiu, tant del temps com dels errors, per a aquells animals que havien estat criolesionats. El retest a 3 dpl mostrà una disminució de tots dos factors respecte el dia anterior, assolint gairebé els valors enregistrats en el test. Aquesta dada indica l'inici de la recuperació de la coordinació motora. No s'observaren diferències significatives entre els diversos grups de ratolins criolesionats, tot i que, gràficament, es suggereix que, els animals injectats amb solució salina o amb el domini  $\alpha$  són els que recuperen més lentament la coordinació motora.



**Figura VIII.3.-** Representació del temps i els errors enregistrats per cada grup de ratolins en la prova de l'escala horitzontal, el dia abans de la criolesió (test) i els dies successius a aquesta (retest a 2 dpl i 3 dpl).

#### ✓ Barra giratòria (*RotaRod*)

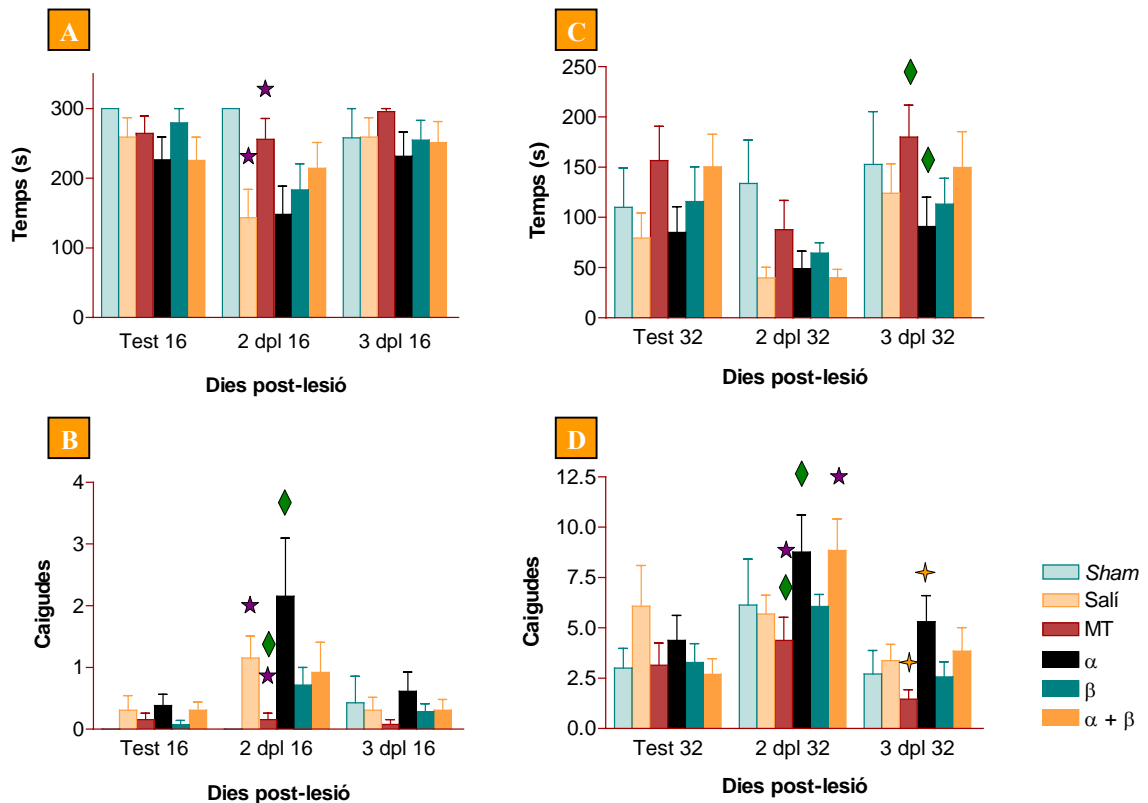
Els ratolins es sotmeteren també a 3 dies d'aprenentatge de la prova *RotaRod*, mitjançant experiments de 5 minuts, a 16 rpm, Figura VIII.4. El dia abans de la criolesió es realitzà el test, que incloïa dues proves a 16 i 32 rpm. Al segon i al tercer dia després de la criolesió se'ls sotmeté als retests, també a ambdues velocitats.



**Figura VIII.4.-** Representació del temps que transcorre fins a la primera caiguda i de les caigudes enregistrats per cada grup de ratolins en la prova de la barra giratòria, durant els dies d'aprenentatge.

Els paràmetres analitzats en la barra giratòria són el temps que tarden en caure per primer cop i el total de caigudes durant els 5 minuts que dura la prova, a 16 i 32 rpm, Figura VIII.5. S'observà com els animals tractats amb la proteïna MT-1 responenien millor al test conductual, a ambdues velocitats. A 16 rpm el grup MT-1 mostrà diferències significatives respecte el grup salí, tant en temps transcorregut fins a la primera caiguda, com en caigudes. A 32 rpm aquest grup no es diferencia significativament del salí, però sí ho fa del grup  $\alpha$ , respecte el temps que transcorre fins a la primera caiguda i, dels grups  $\alpha$  i  $\alpha + \beta$ , en el nombre de caigudes, suggerint un efecte invers del domini alfa, quan aquest es troba independent del domini beta.

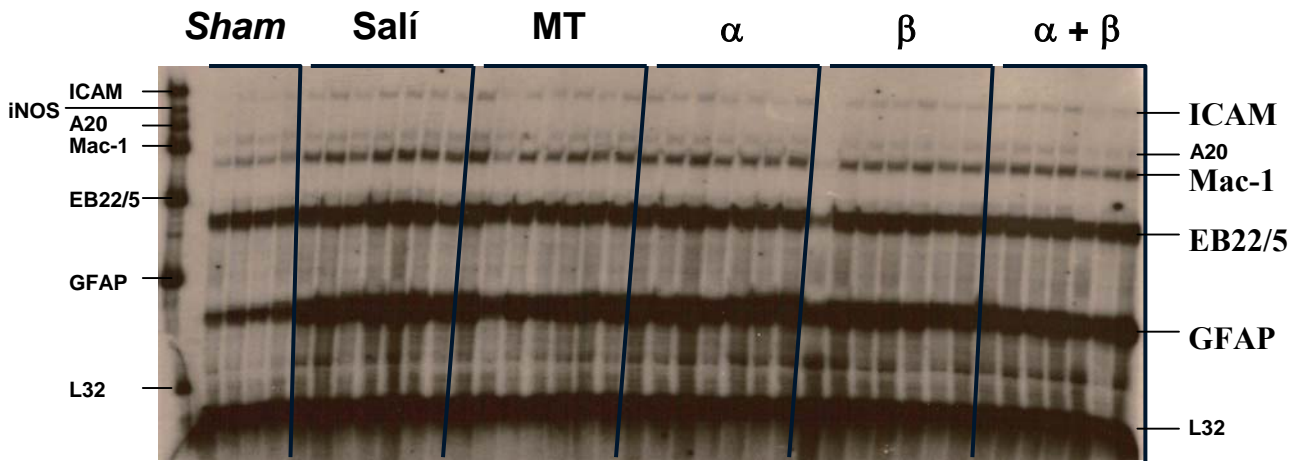
En la prova conductual del *RotaRod* es pot suggerir, doncs, que la proteïna sencera permet una recuperació de la coordinació motora més ràpida, després de la criolesió, que els dominis independents.



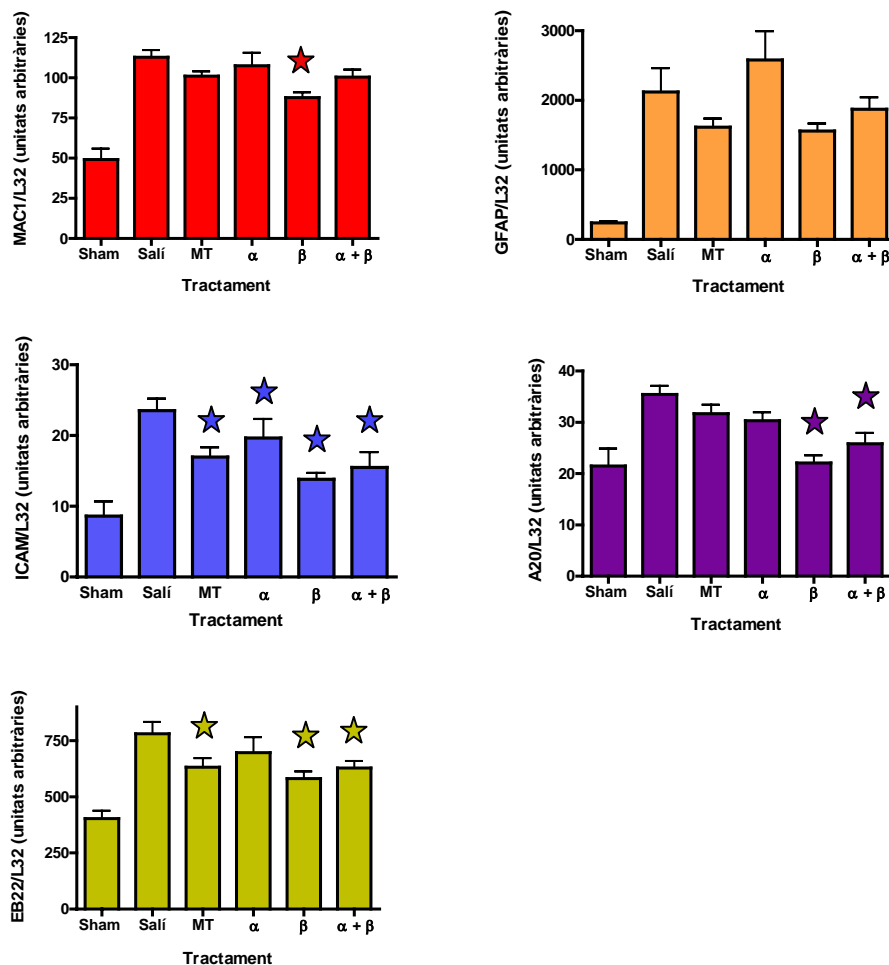
**Figura VIII.5.-** Representació del temps que transcorre fins a la primera caiguda i, de les caigudes totals enregistrades per cada grup de ratolins, en la prova de la barra giratòria, a 16 rpm (A i B) i 32 rpm (C i D), el dia abans de la criolesió (test) i els dies successius a aquesta (retest 2 dpl i 3 dpl). S'indiquen amb el mateix símbol els grups que difereixen entre ells significativament, amb un grau de significació  $p < 0.05$ .

#### *Determinació de mRNA de diferents gens mitjançant RPA*

Del total de ratolins emprats en aquest experiment, se'n reservaren 39 per determinar l'expressió gènica dels marcadors inflamatoris Mac-1, GFAP, ICAM, A20 i EB22, en la part lesionada del cervell. L'extracte de mRNA d'aquesta regió s'hibridà amb unes sondes, marcades amb  $^{32}\text{P}$ , corresponents a aquestes proteïnes característiques de la resposta inflamatòria. Els diferents mRNA hibridats se separaren mitjançant electroforesi en gel i s'obtingué la pel·lícula autoradiogràfica mostrada en la Figura VIII.6. La determinació semi-quantitativa dels nivells de mRNA de cada marcador permeté representar els gràfics de la Figura VIII.7, en els quals s'observen les variacions en funció del tractament.



**Figura VIII.6.-** Pel·lícula autoradiogràfica obtinguda a partir del gel d'electroforesi dels productes de l'assaig de protecció de la ribonucleasa, RPA. Les bandes del marcador apareixen més endarrerides que les corresponents de les mostres ja que les sondes del marcador contenen nucleòtids addicionals en l'extrem 5' i 3', degut a la metodologia d'obtenció de les sondes i, que en les mostres han estat degradats per l'acció de les RNases.



**Figura VIII.7.-** Anàlisi de l'expressió gènica dels marcadors inflamatoris Mac-1, GFAP, ICAM, A20 i EB22, a partir de les dades obtingudes per RPA, dels diferents grups de ratolins. S'indiquen amb una estrella els grups que difereixen significativament del Salí, amb un grau de significació  $p < 0.05$ .



L'anàlisi de l'expressió gènica d'aquestes proteïnes ens permeté detectar diferències significatives, d'algun dels tractaments amb proteïna o pèptid respecte el tractament amb solució salina, per a totes les proteïnes excepte per a GFAP. En el cas del tractament amb el domini  $\alpha$  només s'observà diferències significatives pel mRNA d'ICAM i, en canvi, quan el tractament s'havia fet amb el domini  $\beta$ , es determinà una expressió gènica significativament diferent a l'observada en el grup salí per a tots els marcadors inflamatoris, menys per a GFAP.

Aquestes dades indiquen que la injecció del domini  $\beta$  inhibeix la inducció d'alguns marcadors inflamatoris en comparació amb la injecció, únicament, de solució salina, permetent una recuperació més ràpida de l'animal, front a la criolesió.

### ***Quantificació de l'activació de cèl·lules glials (gliosi)***

En l'estudi de l'activació de les cèl·lules glials, astròcits i micròglia, per immunohistoquímica i histoquímica, s'empraren 34 ratolins de l'experiment. Es dugué a terme l'anàlisi mitjançant la determinació de GFAP, amb anticossos marcats, en el primer cas, i mitjançant detecció amb lectina, en el segon, de talls gruixuts del cervell, realitzats per criostat.

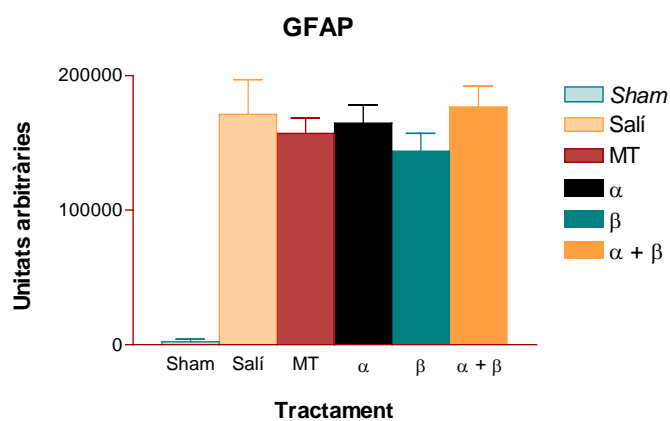
La lesió del cervell provoca una activació de les cèl·lules glials al voltant de la regió lesionada i una migració de micròglia activada cap a l'interior de la lesió, per tal de fagocitar les cèl·lules danyades. Per aquest motiu, les regions que presenten un major nombre de cèl·lules glials activades són la lesió i les zones més pròximes a aquesta. La presència d'astròcits activats també s'estén a zones més allunyades a la lesió.

En els nostres experiments, la part lesionada del cervell es despreguè de la majoria de les seccions cerebrals a estudiar, degut a l'extrema delicadesa d'aquesta regió. Això provocà una important pèrdua d'informació a l'hora d'analitzar les variacions en l'activació de cèl·lules glials, especialment, en el cas de la micròglia.

Una metodologia alternativa al tall dels cervells congelats és la inclusió amb parafina. Amb aquest procés els cervell s'envolten amb una gruixuda capa de parafina que els protegeix durant la manipulació: en el moment de fer els talls en micròtom i en la deposició de les seccions en els porta-objectes. La repetició de la immunohistoquímica i la histoquímica, seguint aquesta nova metodologia, per evitar la pèrdua de la regió lesionada, està en procés.

Amb les dades obtingudes del primer experiment, es dugué a terme la quantificació d'astròcits activats, mitjançant la detecció de GFAP, però no

s'obtingueren diferències significatives pels diferents tractaments, en els ratolins criolesionats, Figura VIII.8, degut essencialment als problemes metodològics exposats anteriorment. Malgrat això, gràficament s'intueix un efecte major en la disminució d'astrogliosi, activació d'astròcits, en els animals tractats amb el domini  $\beta$ .



**Figura VIII.8.-** Representació dels nivells de GFAP determinats per immunohistoquímica.

### VIII.3. Discussió

Una de les principals causes de discapacitat i mort entre la gent jove són les lesions traumàtiques en el cervell. El model de criolesió en el còrtex frontoparietal dret ha estat un procediment àmpliament utilitzat en el laboratori del Dr. Hidalgo per estudiar els mecanismes de la resposta inflamatòria en aquest tipus de lesió, que són la qüestió més important a resoldre si es pretenen trobar bons agents terapèutics. Aquesta metodologia, per exemple, ha permès determinar algunes funcions per la interleuquina 6 i pels receptors del factor de necrosi tumoral, TNF, en condicions de lesió traumàtica.<sup>199</sup>

Experiments anàlegs als descrits en aquest annex (ratolins MT-1/-2 KO criolesionats i tractats amb MT-2), han demostrat que l'administració exògena de MT-2, produeix els mateixos efectes que la sobreexpressió de MT-1, en ratolins transgènics, en condicions de lesió traumàtica: descens de microgliosi (activació de micròglia), i disminució de l'estrès oxidatiu i d'apoptosi.<sup>196</sup> Aquests resultats indiquen que la MT té un paper en la resposta inflamatòria i que l'activitat observada també es pot dur a terme quan la proteïna és administrada exògenament.

L'aprofundiment en el mecanisme d'acció de la MT, en la resposta inflamatòria després d'una lesió traumàtica, s'ha abordat en aquest treball mitjançant l'estudi dels dominis de MT-1, independents i aïllats (tractament  $\alpha$  i tractament  $\beta$ ) i, independents, però conjuntament (tractament  $\alpha + \beta$ ).

En aquest estudi s'han obtingut resultats per MT-1 i pel domini  $\beta$  que difereixen significativament, en alguns casos, dels efectes observats en els ratolins control criolesionats (salí). A trets generals, es pot dir que la recuperació de la coordinació motora després de la criolesió es veu especialment afavorida per un tractament amb la proteïna MT-1 i que, el domini  $\beta$  mostra un paper destacat en el restabliment del pes i en la normalització dels nivells de marcadors inflamatoris, mostrant una activitat antiinflamatòria. Aquests resultats indiquen que el pèptid  $\beta$  presenta una participació més activa en la recuperació dels ratolins del dany causat.

En general, el tractament amb MT-1 i amb  $\alpha + \beta$  mostren un efecte antiinflamatori superior a l'observat en els animals tractats únicament amb el domini  $\alpha$ , la qual cosa suggereix novament que aquesta activitat recau essencialment en el domini  $\beta$ . Les diferències detectades entre els tractaments MT-1 o  $\alpha + \beta$  i el tractament amb domini  $\beta$ , on s'observa una major activitat per aquest últim en gairebé totes les proves, poden ser degudes a la quantitat de proteïna/pèptid injectada en cada tractament. Tal

com s'ha indicat en l'apartat de Mètodes, en el tractament amb el domini  $\beta$  s'ha injectat als ratolins el doble de mols d'aquest domini que en els tractament MT-1 i  $\alpha + \beta$ .

Les diferents propietats descrites per ambdós dominis,  $\alpha$  i  $\beta$ , fan preveure un diferent comportament en les funcions fisiològiques que emprèn la proteïna. En aquest cas, la major labilitat dels metalls coordinats al domini  $\beta$  suggereix que l'alliberament o cessió dels ions metàl·lics pot ser un punt clau en la recuperació de l'animal. Estudis amb diferents metalls, per exemple, podrien ajudar a concloure els resultats obtinguts en aquest experiment.

# **Discussió general**



## IX. Discussió

Les metal·lotioneïnes, pèptids amb una excepcional capacitat coordinant, constitueixen una gran família de metal·loproteïnes, presents en gairebé tots els éssers vius. Existeixen dos importants grups de MTs, les de mamífer (amb un domini  $\alpha$  i un domini  $\beta$ ) i les de crustaci (amb dos dominis  $\beta$ ), amb unes propietats clarament definides, una elevada uniformitat de seqüència i una total conservació dels residus cisteïnics.

En general, les MTs presenten una distribució de les seves cisteïnes (aminoàcid que, normalment, constitueix un 30 % dels residus de la proteïna) en uns motius característics: Cys-Cys i Cys-X-Cys. Però el descobriment de noves isoformes ha posat de manifest que existeix un motiu diferent, el triplet Cys-Cys-Cys, la rellevància del qual encara està per resoldre. Així mateix les funcions de les MTs també són, encara, motiu de debat entre la comunitat científica que les estudia, tot i haver passat mig segle del seu descobriment, i per tant, cal caracteritzar, químicament i fisiològicament, les diferents isoformes aïllades, per tal d'aconseguir elucidar les funcions de cadascuna d'elles.

### *Una MT de crustaci atípica*

La major part de les MTs de crustaci presenten unes característiques comuns: 58 – 59 aminoàcids, d'entre els quals 18 – 19 són cisteïnes, i una distribució dels metalls en dos dominis, que inclouen, cadascun d'ells, un agregat  $M^{II}_3(SCys)_9$ . En general, aquestes metal·lotioneïnes s'indueixen per metalls divalents i els estudis que s'han dut a terme sobre la seva capacitat d'enllaçar coure s'han realitzat amb proteïna recombinant o mitjançant assaigs *in vitro*.<sup>28</sup>

En canvi, la isoforma MTC de *Callinectes sapidus* i la seva homòloga del cranc *Portunus pelagicus* mostren característiques molt diferents: 21 cisteïnes, dels 64 aminoàcids totals que les formen. En el cas de MTC, únicament s'havia descrit, abans de la realització d'aquesta tesi, la seva capacitat per enllaçar coure, amb una estequiometria global d'aproximadament  $Cu_{10}MTC$ , a partir de la proteïna aïllada de crancs tractats amb coure.<sup>134</sup>

La manca de correlació tant en les cisteïnes com en els residus no cisteïnics, entre les dues darreres isoformes exposades (MTC i la MT de *P. pelagicus*) i la resta de MTs de crustaci, fa que s'hagin de tenir en compte ambdós paràmetres a l'hora

d'interpretar les diferents propietats que presenten aquestes proteïnes. A més a més, la presència, en aquestes dues isoformes, d'un motiu molt poc habitual en MTs (triplet de cisteïnes, Cys-Cys-Cys) posa un atractiu addicional a l'hora d'estudiar com es veuen reflectides en les característiques de la proteïna aquestes peculiaritats en la seqüència primària.

La inducció específica de MTC per ions coure, a diferència del que s'ha observat amb les altres isoformes de *C. sapidus*, MT1 i MT2, que s'indueixen per zinc, cadmi i, en el cas de MT1, també per coure, ha dut a proposar diverses funcions, per a aquesta proteïna, relacionades amb l'homeòstasi del coure.<sup>92</sup> Es desconeix, però, els mecanismes d'acció d'aquesta MT i quina forma o formes metal·lades són les fisiològicament actives.

Els crustacis transporten l'oxigen mitjançant l'hemocianina, proteïna que presenta ions coure en el centre actiu. El coure, molt important per la seva funció en les proteïnes que el contenen, pot catalitzar la formació de radicals lliures altament citotòxics, quan es troba lliure en la cèl·lula, per la qual cosa és necessari minimitzar els nivells d'aquest metall en el medi intracel·lular. Un dels mecanismes proposats per dur a terme aquesta tasca és el segrest de l'excés de coure lliure en una forma no tòxica per a la cèl·lula, mitjançant la unió a una metal·lotioneïna.<sup>92</sup> Els estudis del Dr. Brouwer indiquen que MTC és l'encarregada de l'homeòstasi del coure en els processos de síntesi i degradació de l'hemocianina en el cranc *C. sapidus*. Les similituds que presenta la MT de *P. pelagicus* suggereixen que aquesta proteïna també seria la responsable de realitzar aquesta funció, en aquest organisme.

Per la resta de crustacis, però, no s'han descrit MTs anàlogues a aquestes dues, la qual cosa suggereix, en un primer moment, que en els crancs *C. sapidus* i *P. pelagicus*, l'homeòstasi del coure es du a terme per una via diferent. Tot i que aquesta seria una possible explicació a la presència d'unes MTs tant específiques en aquests organismes, cal tenir en compte que encara, actualment, s'estan descobrint noves MTs i existeix l'opció de que altres crustacis continguin MTs, encara no aïllades, amb seqüències i propietats properes a les de MTC.



### *Mètodes emprats per obtenir MTC i els seus corresponents complexos metàl·lics*

L'obtenció d'una proteïna mitjançant l'enginyeria genètica, en *Escherichia coli*, és una metodologia que permet, en general, l'obtenció del pèptid amb un elevat grau de puresa i de rendiment, en unes condicions fisiològiques properes a les que es troba la proteïna nativa, ja que aquesta s'està sintetitzant i estructurant a l'interior d'una cèl·lula. En el cas de les MTs, aquesta metodologia permet també dirigir parcialment el seu contingut metàl·lic, mitjançant un suplement del metall desitjat, en el medi de cultiu. En alguns casos, però, aquest suplement de metall no permet recuperar mostres totalment homogènies o homometàl·liques.<sup>29</sup> És freqüent, per exemple, l'obtenció d'espècies Cu,ZnMT quan s'ha dut a terme la síntesi en cultius enriquits amb coure.<sup>102, 200</sup> Aquesta característica ha estat utilitzada com a criteri de classificació de les MTs,<sup>28</sup> establint la divisió entre zinc-tioneïnes i coure-tioneïnes, segons les diferents preferències metàl·liques de les diverses isoformes en condicions anàlogues. S'ha establert, en aquesta classificació, entre altres criteris, que les MTs que s'obtenen com a espècies heterometàl·liques de coure i zinc, quan s'han sintetitzat en medis enriquits amb coure, són zinc-tioneïnes, ja que requereixen el zinc per estructurar-se. En canvi, si en aquestes mateixes condicions els complexos resultants són homometàl·lics de coure, aleshores la MT es classifica com a coure-tioneïna.

En el nostre treball, la presència d'una mescla d'espècies ZnMTC en les síntesis de la proteïna en medis rics en zinc, així com la disparitat de resultats en les mostres obtingudes en medis suplementats amb coure poden ser degudes a la sensibilitat de la proteïna a les condicions de síntesi, aïllament i purificació, també observada en altres MTs.<sup>29, 102</sup> La impossibilitat de controlar plenament els paràmetres responsables d'aquesta variabilitat du a plantejar-se, en alguns casos, mètodes alternatius per obtenir els agregats metàl·lics de les MTs. En el nostre cas optarem per la reconstitució de l'apoMTC amb coure, zinc i cadmi. Aquests experiments ens permeteren realitzar un estudi exhaustiu dels agregats que s'obtingueren amb zinc i cadmi, així com obtenir una mostra amb <sup>113</sup>Cd per dur a terme estudis de ressonància magnètica nuclear. En la reconstitució amb coure, en canvi, no s'obtingueren resultats complementaris als que s'havien assolit en *E. coli*. En aquest cas en concret, les dades extretes directament de les síntesis en medis enriquits amb coure aportaren més informació que les obtingudes mitjançant la reconstitució.

Aquests resultats indiquen que, en funció de la proteïna, dels metalls que coordina i dels estudis que es vulguin dur a terme, cal optar per una o altra metodologia, o una combinació d'aquestes. Pels estudis estructurals dels fragments N-terminal i C-terminal de la proteïna, per exemple, optarem per la síntesi de pèptids en fase sòlida. En el primer cas, la reconstitució amb  $^{113}\text{Cd}$  del pèptid P10, extrem N-terminal de MTC, ens permeté obtenir informació molt valuosa mitjançant els estudis de RMN. En canvi, per l'extrem C-terminal, pèptid P11, no s'aconseguí amb èxit la reconstitució amb cadmi, amb la qual cosa, no se'n pogueren dur a terme els estudis estructurals. De nou, aquests experiments ens revelaren les limitacions d'una altra metodologia, mostrant que, en funció de les característiques del pèptid, l'obtenció i aïllament dels corresponents agregats metàl·lics pot ser una tasca més o menys complexa, i que és necessari determinar en cada cas quina és la metodologia més apropiada.

### *Estudi dels agregats metàl·lics que forma MTC amb zinc i cadmi*

En aquest treball s'ha aprofundit en el coneixement de les propietats coordinants de MTC, incidint, especialment, en l'estudi amb metalls divalents, del que no hi havia dades en la bibliografia, per poder comparar-la amb les altres MTs de crustaci.

Els resultats obtinguts en els nostres estudis mostren que MTC enllaça fortament 6 ions  $\text{Zn(II)}$  i, de manera més feble, fins a 2 ions addicionals. L'espècie  $\text{Zn}_6\text{MTC}$ , de quiralitat intermèdia, no requereix de la participació de totes les cisteïnes per a la coordinació dels 6 ions, trobant-se'n aproximadament dues de lliures, en forma de tiol. La coordinació dels ions addicionals, que generaria les espècies  $\text{Zn}_7\text{MTC}$  i  $\text{Zn}_8\text{MTC}$ , gairebé no provoca canvis estructurals, la qual cosa fa proposar que aquests ions se situen en la superfície de la molècula, sense alterar significativament la disposició dels agregats inicials.

Aquesta proteïna, a diferència de l'observat en la resta de MTs de crustaci, té la capacitat d'incorporar fins a 2 ions addicionals, establint un equilibri entre espècies amb 6 – 8 ions  $\text{Zn(II)}$ . Així, addicionant un petit excés de metall, únicament un o dos equivalents de zinc, a  $\text{Zn}_6\text{MTC}$ , ja s'obté la mescla d'espècies que conté  $\text{Zn}_6\text{MTC}$ ,  $\text{Zn}_7\text{MTC}$  i  $\text{Zn}_8\text{MTC}$ . Aquesta capacitat es veu probablement assistida per la participació de les cisteïnes que romanien lliures en  $\text{Zn}_6\text{MTC}$ . S'ha descrit per a altres MTs amb triplets la no participació de la totalitat de les cisteïnes en la coordinació dels metalls,<sup>22, 97, 108</sup> però és en MTC el primer cas en el qual es proposa que aquestes cisteïnes lliures faciliten l'establiment d'un equilibri amb espècies d'estequiometria superior.

L'espècie  $Zn_6MTC$  es pot aïllar de la mescla d'espècies  $Zn_6MTC$ ,  $Zn_7MTC$  i  $Zn_8MTC$  a partir del tractament amb un agent quelant (Chelex 100), indicant una major estabilitat per a aquesta espècie, d'estequiometria inferior. Aquest comportament, en certa manera, aproxima MTC a la resta de MTs de crustaci, quan aquestes es coordinen al zinc, tot i que, només en el cas de MTC, s'ha observat la capacitat d'ampliar la coordinació fins a 8.

El comportament de MTC vers el cadmi, en canvi, s'allunya clarament de l'observat en les MTs de crustaci (predomini de  $Cd_6MT$ ), establint l'espècie  $Cd_8MTC$  com la resultant de la reconstitució d'apoMTC i  $Cd_7MTC$  com la més quiral i la més estable front a un tractament amb Chelex 100.

No s'havia descrit, fins ara, per cap MT de crustaci, l'estequiometria  $Cd_7MT$  com la més estable, només s'havia proposat, en algun cas puntual, com una espècie minoritària, fruit d'una posició addicional de coordinació.<sup>28, 123</sup> Aquest fet subratlla, de nou, l'excepcionalitat de la proteïna MTC.

La incorporació d'un ió  $Cd(II)$  addicional a l'espècie  $Cd_7MTC$ , per formar  $Cd_8MTC$ , sí provoca canvis estructurals apreciables, tal i com s'observa en la disminució de la intensitat de les bandes de CD. L'absència de cisteïnes lliures en l'espècie  $Cd_7MTC$  obliga a una apreciable reestructuració dels lligands per tal d'encabir el nou ió.

MTC mostra un comportament diferenciat front el zinc i el cadmi. Amb el zinc, s'observa una prevalença de l'espècie  $Zn_6MTC$ , en la qual no totes les cisteïnes participen en la coordinació dels metalls. Amb el cadmi, en canvi, és  $Cd_7MTC$  l'espècie que s'obté del tractament amb Chelex de la proteïna reconstituïda, i aquesta no presenta cisteïnes lliures. La naturalesa més forta de l'enllaç  $Cd-SCys$  és determinant en les propietats que mostra aquesta proteïna front a aquests dos ions divalents. Malgrat les diferents propietats d'aquests metalls, rarament s'ha descrit per a altres MTs un comportament tan diferenciat front el zinc i el cadmi,<sup>188</sup> suggerint que, en aquest cas, les espècies  $M_6MTC$ ,  $M_7MTC$  i  $M_8MTC$  presenten una estabilitat similar, fent que, en funció de les condicions de treball i de quin sigui el metall divalent que s'hi coordina, predomini una o altra estequiometria. Altrament, la incorporació del vuitè ió divalent, en el cas del zinc no provoca canvis estructurals i en el cas del cadmi sí. Aquesta dada indica que la vuitena posició de coordinació no és equivalent per ambdós metalls.

### *Estudis estructurals*

Les dificultats per obtenir una mostra amb la concentració adient, així com la flexibilitat dels residus d'algunes parts de la molècula<sup>39</sup> han estat alguns dels factors limitants en la determinació de l'estructura de les MTs per RMN. Tal com s'indica en la introducció, aquesta tècnica únicament ha permès resoldre, totalment o parcialment, l'estructura d'unes 13 MTs.

L'estudi, mitjançant aquesta tècnica, de  $^{113}\text{Cd}_8\text{MTC}$  ens ha permès descriure, per a aquesta proteïna, la presència de dos agregats metàl·lics, cadascun d'ells, amb 3 – 4 ions Cd(II), indicant que MTC s'estructura en dos dominis quan està coordinada a ions divalents. Addicionalment, amb l'anàlisi del pèptid enllaçat a  $^{113}\text{Cd}$  (CdP10) s'ha determinat que les primeres 10 cisteïnes de la proteïna formen un agregat estable amb 4 ions Cd(II). No s'ha pogut confirmar, però, que aquest agregat es mantingui intacte en la proteïna sencera, ja que els corresponents espectres de ressonància mostren algunes discrepàncies, que podrien suggerir modificacions degudes a la presència del domini C-terminal.

La major part de metal·lotioneïnes descrites fins ara mostren agregats metàl·lics equivalents, amb estequiometries  $\text{M}^{\text{II}}_3\text{L}_9$  i  $\text{M}^{\text{II}}_4\text{L}_{11}$ , on L representa una cisteïna, i en algun cas puntual, una histidina. Això ha dut a establir aquests motius com a patrons estàndards per a aquestes proteïnes. L'estudi de noves MTs, però, ha posat de manifest que també existeixen altres distribucions possibles dels metalls. És el cas, per exemple, de la MT de blat Ec-1, en la qual es proposa un agregat  $\text{Cd}_2(\text{SCys})_6$ .<sup>7</sup> Al seu torn, l'estudi realitzat, per RMN, de l'extrem N-terminal de MTC (pèptid P10) ha mostrat, assumint que totes les cisteïnes del pèptid participen en la coordinació dels ions, la formació d'un agregat  $\text{Cd}_4(\text{SCys})_{10}$ , totalment inèdit en les MTs. La presència d'un triplet Cys-Cys-Cys en el pèptid P10 suggereix que aquesta especial disposició de les cisteïnes pot estar induint a l'aparició d'un nou motiu estructural. Aquest treball està, doncs, obrint pas a una nova concepció dels agregats metàl·lics que configuren les metal·lotioneïnes, ampliant els patrons generals acceptats per a aquestes proteïnes.

### *Estudi dels agregats metàl·lics que forma MTC amb coure*

Els resultats que hem pogut assolir sobre MTC quan es coordina a Cu(I) són escassos degut a les dificultats intrínseques de treballar amb aquest metall. Malgrat això, els experiments realitzats ens han permès proposar unes propietats per a aquesta proteïna que en els estudis previs no s'havien considerat.

Les dades obtingudes *in vivo* pel Dr. Brouwer sobre MTC indiquen una inducció específica d'aquesta proteïna per coure i la formació d'un complex amb, aproximadament, 10 ions Cu(I). L'obtenció, però, d'espècies heterometàl·liques de zinc i coure, en gran part de les nostres síntesis, de la proteïna recombinant, en medis enriquits amb coure i, l'assoliment de graus de quiralitat màxims, per algunes d'aquestes mostres, sembla indicar que aquesta proteïna necessita d'un cert contingut en zinc per assolir el seu màxim grau d'estructuració. Aquest requeriment trenca amb la diferenciació entre zinc-tioneïnes i coure-tioneïnes, suggerint que algunes MTs precisen d'ambdós metalls per dur a terme el seu paper fisiològic, tot i que s'indueixin únicament per coure.

### ***MTs amb triplets de cisteïnes***

Únicament 3 MTs de crustaci, descrites fins al moment, contenen triplets de cisteïnes en la seva estructura primària. Aquestes són la MT de *Panulirus argus* (MTPA), una MT *Portunus pelagicus* i MTC. La primera és una típica MT de crustaci, no induïble per coure i amb un contingut metàl·lic de 6 ions divalents, probablement distribuïts en dos agregats  $M^{\text{II}}_3(\text{SCys})_9$ .<sup>22</sup> La segona MT, de la qual només s'ha pogut aïllar el mRNA, presenta una seqüència aminoacídica gairebé idèntica a la de MTC (97 %),<sup>107</sup> per la qual cosa és d'esperar que mostri les mateixes propietats coordinants, estructurals i, fins i tot, funcionals. La presència de triplets de cisteïnes en MTPA ha estat descrita com una mutació accidental, però en el cas de MTC les modificacions en la seqüència d'aminoàcids respecte a la resta de MTs de crustaci, incloent els triplets Cys-Cys-Cys, clarament tenen unes implicacions estructurals i funcionals.

L'estudi de la capacitat coordinant de la resta de MTs amb triplets es troba, en general, en un estadi força preliminar, exceptuant el cas d'una MT de *Tetrahymena*, per la qual s'ha dut a terme un exhaustiu estudi dels agregats metàl·lics que forma amb zinc, cadmi i coure.<sup>102</sup> Per aquest motiu, l'estudi realitzat en aquesta tesi, sobre MTC, servirà com a precedent alhora d'establir com poden participar les cisteïnes que configuren aquest nou motiu en la formació dels agregats metàl·lics i en l'estructura de la proteïna.

### *Tècniques emprades per estudiar les MTs*

Els estudis de les propietats químiques de les MTs s'iniciaren principalment mitjançant espectroscòpia UV i CD.<sup>159, 160, 201, 202</sup> Les valoracions de la MT amb ions metàl·lics, seguides per UV i CD, poden aportar una valuosa informació sobre les etapes per les quals passa la proteïna durant el procés de metal·lació o bescanvi metàl·lic. Aquestes dades, però, estan subjectes a quines són les espècies presents en solució. Sovint l'addició d'un ió metàl·lic a una MT provoca la formació d'una mescla d'espècies, l'estequiometria i abundància de les quals no es pot determinar mitjançant aquestes tècniques, per la qual cosa, es requereixen d'altres dades per determinar-ne la naturalesa.

L'espectrometria de masses, tècnica que es començà a aplicar a aquests sistemes molts anys després,<sup>176, 189, 203</sup> resulta, actualment, imprescindible per determinar la distribució dels metalls en les diferents espècies presents en solució. Aquesta tècnica també presenta algunes limitacions, com els estudis dels complexos CuMT, més difícilment ionitzables;<sup>176</sup> la manca d'informació estructural que pot aportar, les dificultats per assolir unes condicions adients per evitar el trencament de les interaccions no covalents, etc.

Sovint, les tres tècniques s'han utilitzat conjuntament per obtenir informació complementària, permetent detallar més a fons el sistema en estudi.<sup>12, 31</sup> En el nostre treball també s'han emprat les tres tècniques, assolint, en alguns casos, un bon sinergisme, com en la valoració d'apoMTC amb cadmi, on s'ha pogut determinar quines espècies CdMTC són claus en el procés de formació dels corresponents agregats metàl·lics i, quines són les més quirals. En altres casos, però, la complexitat del sistema ha dificultat trobar la relació entre els resultats, com en la valoració de ZnMTC amb coure, on no es va poder determinar la relació coure/zinc de les espècies heterometàl·liques detectades per masses, i els canvis estructurals observats mitjançant les tècniques espectroscòpiques no es van poder correlacionar amb unes espècies Cu,ZnMTC o CuMTC concretes.

Les tècniques que permeten donar informació directa de l'estructura de la proteïna són la ressonància magnètica nuclear i la difracció de raigs X. Malgrat els bons resultats que pot oferir l'anàlisi d'una metal·lotioneïna mitjançant aquestes tècniques, les dificultats per obtenir una mostra adequada han propiciat que molts investigadors emprenguessin l'estudi de la proteïna per altres vies.

En l'estudi de MTC ha estat necessari un treball exhaustiu mitjançant ESI-MS, CD i UV, per entendre les propietats químiques d'aquesta proteïna i per determinar la manera òptima d'aconseguir una mostra per RMN. Finalment s'ha assolit una mostra de  $^{113}\text{CdMTC}$  adequada, que ens ha permès, en un primer estadi, determinar que els metalls es distribueixen en dos dominis. Estudis, pendents de finalitzar, han de permetre assignar quines cisteïnes estan enllaçant a cada ió cadmi, com participen els triplets en la coordinació i la resolució de l'estructura tridimensional de la proteïna. Amb aquests resultats es podria concretar quines són les diferències estructurals que manté MTC amb les metal·lotioneïnes de crustaci comuns.

La caracterització de MTC no només passa per la resolució de l'estructura amb  $^{113}\text{Cd(II)}$ , també cal establir l'estequiometria de les espècies  $\text{Cu,ZnMTC}$ , aïllar-les i determinar-ne l'estructura, ja que, aquestes poden ser les fisiològicament rellevants. Així doncs, tot i que queda encara molt camí per recórrer en la caracterització d'aquesta metal·lotioneïna, el treball realitzat en aquesta tesi ha obert una important via en l'estudi de les MTs mitjançant un ampli espectre de metodologies i proposant interessants interrogants sobre quins són els motius estructurals que adopten aquestes proteïnes, el paper del zinc en MTs induïdes específicament per coure i una possible via alternativa en l'homeòstasi del coure en crustacis.





# **Conclusions**



## X. Conclusions

### 1. Obtenció de MTC per enginyeria genètica.

Dins del context de posta a punt de la metodologia del DNA recombinant en aquest grup de recerca, s'ha procedit a sintetitzar una MT de crustaci, la metal·lotioneïna específica de coure del cranc *Callinectes sapidus*, MTC, en presència de diferents ions metàl·lics.

D'una banda, el vector d'expressió escollit, pGEX-4T-1, i d'altra, les cèl·lules hoste, *E. coli*, han permès l'obtenció, per primera vegada, de la proteïna MTC recombinant. En conseqüència, s'ha obert un camí alternatiu a l'extracció de la MTC a partir dels crancs corresponents. Així mateix, el sistema d'expressió emprat ha permès l'obtenció de MTC amb un elevat grau de puresa.

### 2. Caracterització dels complexos metall-MTC obtinguts per enginyeria genètica i per valoració *in vitro*.

MTC mostra una capacitat coordinant vers el zinc superior a la de la resta de MTs de crustaci, coordinant 6 – 8 ions Zn(II), amb un grau d'estructuració mig, quan la proteïna s'obté en medis suplementats amb zinc. En aquest treball s'ha detectat per primera vegada l'estequiometria Zn<sub>8</sub>MT per una MT de crustaci.

Quan s'obté MTC en medis suplementats amb coure, la proteïna s'estructura formant complexos homometàl·lics CuMTC i heterometàl·lics Cu,ZnMTC. La màxima quiralitat observada correspon a les espècies heterometàl·liques de Zn(II) i Cu(I), suggerint que aquesta proteïna, tot i induir-se específicament per coure i mostrar propietats relacionades amb l'homeòstasi d'aquest metall, presenta un requeriment de zinc en la seva estructura.

Les valoracions d'apoMTC i ZnMTC amb cadmi mostren que aquesta proteïna té una major capacitat coordinant vers el cadmi que vers el zinc, mostrant estequiometries superiors quan la proteïna coordina cadmi. En la valoració d'apoMTC amb cadmi s'ha observat una especial rellevància per les espècies Cd<sub>7</sub>MTC i Cd<sub>8</sub>MTC i, en la valoració de ZnMTC amb cadmi s'han assolit, en gairebé tots els passos, una mescla d'espècies heterometàl·liques Zn<sub>x</sub>Cd<sub>y</sub>MTC, on  $x + y = 8$ .

Les valoracions d'apoMTC i ZnMTC amb coure indiquen que aquesta proteïna té prou capacitat coordinant per enllaçar 12 o més ions coure, tot i que aquestes espècies presenten una menor quiralitat que les d'estequiometria inferior. Cal remarcar l'espècie Cu<sub>4</sub>MTC observada en la valoració de la forma apoMTC amb coure, com a intermedi d'especial rellevància en la formació dels agregats CuMTC finals.

### 3. Reconstitució d'apoMTC.

La metodologia de la reconstitució de MTs aplicada a aquesta proteïna ens ha permès obtenir mostres més homogènies, assolint, en el cas del zinc i del cadmi, mostres en les que clarament predomina una estequiometria M(II)/MTC. Mitjançant el procediment de reconstitució s'ha pogut aprofundir en les propietats dels complexos metàl·lics que forma MTC, segons s'indica a continuació:

- La constant d'acidesa promig de les cisteïnes de MTC  $K_a$  té un valor de  $10^9$ , valor coherent amb el determinat per a altres MTs.
- La constant aparent de coordinació de MTC vers el cadmi a pH 7,  $K_{app,pH 7}$ , té un valor promig de  $2.2 \times 10^{14} M^{-1}$ . Aquest valor mostra una estabilitat dels agregats CdMTC similar a la determinada per la MT-3 de mamífer ( $K_{app,pH 7} = 2 \times 10^{14} M^{-1}$ ).
- S'ha establert que MTC coordina més fortament 6 ions Zn(II) i fins a 2 ions més, de manera més dèbil, quan es reconstitueix amb aquest metall. L'enllaç amb aquests dos ions addicionals es trenca fàcilment mitjançant un tractament amb la resina quelant Chelex 100, obtenint-se Zn<sub>6</sub>MTC. S'ha determinat que en aquesta espècie, Zn<sub>6</sub>MTC, no totes les cisteïnes contribueixen a la coordinació del zinc.
- S'ha determinat que MTC forma el complex Cd<sub>8</sub>MTC, quan es reconstitueix amb cadmi i que aquest passa a Cd<sub>7</sub>MTC quan es tracta amb Chelex 100. En aquesta espècie, Cd<sub>7</sub>MTC, les 21 cisteïnes de la proteïna estan implicades en la coordinació del cadmi. Amb aquest resultat, es demostra per primera vegada la participació de totes les cisteïnes dels triplets d'una MT en la coordinació dels metalls. Les estequiometries Cd<sub>7</sub>MTC i

$Cd_8MTC$  són superiors a les descrites per la majoria de MTs de crustaci (en general  $Cd_6MT$ ), la qual cosa està d'acord amb el major nombre de cisteïnes que presenta aquesta isoforma.

- Mitjançant la reconstitució d'apoMTC i apoP10 amb  $^{113}Cd$ , s'han obtingut mostres adequades de  $^{113}Cd_8MTC$  i  $^{113}Cd_4P10$  per estudis estructurals, després de nombrosos intents per assolir la concentració suficient per dur a terme els anàlisis per RMN de  $^1H$  i  $^{113}Cd$ .

#### 4. Estudis estructurals de $^{113}CdMTC$ , per RMN.

L'estudi per RMN del pèptid P10, corresponent a l'extrem N-terminal de la proteïna MTC, ha permès proposar la formació de l'agregat  $Cd_4(SCys)_{10}$  en aquest domini. L'estequiometria d'aquest agregat, amb 4 ions divalents i 10 cisteïnes, és inèdita en les metal·lotioneïnes descrites fins a l'actualitat.

Segons dades de RMN de  $^{113}Cd$  i  $^1H$ , l'estructuració de  $Cd_8MTC$  té lloc en dos dominis, cadascun dels quals coordina 3 – 4 ions  $Cd(II)$ . Amb la comparació dels espectres de  $Cd$  directe de la proteïna sencera i del pèptid P10 es pot concloure que el domini N-terminal de la proteïna, amb 10 cisteïnes, estableix un agregat estable amb 4 ions  $Cd$  i, el domini C-terminal, que conté 11 cisteïnes, enllaça més fortament 3 ions  $Cd$ .

#### 5. Estudis funcionals dels dominis $\alpha$ i $\beta$ de la proteïna MT-1 de ratolí.

En els estudis funcionals dels dominis de MT-1 de mamífer respecte la resposta inflamatòria, s'ha observat que la injecció del domini  $\beta$  a ratolins criolesionats: a) té un efecte protector front la pèrdua de pes, b) permet una millor recuperació de la coordinació motora i c) facilita el reestabliment dels nivells normals dels marcadors inflamatoris; indicant un major efecte antiinflamatori per a aquest segment de la proteïna.



# **Bibliografia**





## XI. Bibliografia

1. Margoshes, M.; Vallee, B. L., A cadmium protein from equine kidney cortex. *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, 79, 4813-4814.
2. Base de dades *Swiss-Prot*.
3. Kagi, J. H., Overview of metallothionein. In *Methods Enzymol.*, 1991; Vol. 205, pp 613-26.
4. González-Duarte, P., Metallothioneins. In *Comprehensive Coordination Chemistry II*, McCleverty, J.; Meyer, T. J., Eds. Elsevier-Pergamon: Amsterdam, 2003; Vol. 8, pp 213-228.
5. Henkel, G.; Krebs, B., Metallothioneins: zinc, cadmium, mercury, and copper thiolates and selenolates mimicking protein active site features--structural aspects and biological implications. *Chem. Rev.* **2004**, 104, (2), 801-24.
6. Stillman, M. J., Metallothioneins. *Coord. Chem. Rev.* **1995**, 144, 461-511.
7. Peroza, E. A.; Freisinger, E., Metal ion binding properties of Triticum [corrected] aestivum Ec-1 metallothionein: evidence supporting two separate metal thiolate clusters. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2007**, 12, (3), 377-91.
8. Robbins, A. H.; McRee, D. E.; Williamson, M.; Collett, S. A.; Xuong, N. H.; Furey, W. F.; Wang, B. C.; Stout, C. D., Refined crystal structure of Cd, Zn metallothionein at 2.0 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **1991**, 221, (4), 1269-93.
9. Narula, S. S.; Brouwer, M.; Hua, Y.; Armitage, I. M., Three-dimensional solution structure of Callinectes sapidus metallothionein-1 determined by homonuclear and heteronuclear magnetic resonance spectroscopy. *Biochemistry* **1995**, 34, (2), 620-31.
10. Blindauer, C. A.; Harrison, M. D.; Parkinson, J. A.; Robinson, A. K.; Cavet, J. S.; Robinson, N. J.; Sadler, P. J., A metallothionein containing a zinc finger within a four-metal cluster protects a bacterium from zinc toxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **2001**, 98, (17), 9593-8.
11. Vašák, M.; Romero-Isart, N., Metallothioneins. In *Encyclopedia of Inorganic Chemistry*, 2006; Vol. V, pp 3208-3221.
12. Bofill, R.; Capdevila, M.; Cols, N.; Atrian, S.; González-Duarte, P., Zinc(II) is required for the in vivo and in vitro folding of mouse copper metallothionein in two domains. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2001**, 6, (4), 405-17.
13. Calderone, V.; Dolderer, B.; Hartmann, H. J.; Echner, H.; Luchinat, C.; Del Bianco, C.; Mangani, S.; Weser, U., The crystal structure of yeast copper thionein: the solution of a long-lasting enigma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **2005**, 102, (1), 51-6.
14. Cobine, P. A.; McKay, R. T.; Zangger, K.; Dameron, C. T.; Armitage, I. M., Solution structure of Cu<sub>6</sub> metallothionein from the fungus *Neurospora crassa*. *Eur. J. Biochem.* **2004**, 271, (21), 4213-21.
15. Darby, N.; Creighton, T. E., Disulfide bonds in protein folding and stability. *Methods Mol. Biol.* **1995**, 40, 219-52.
16. Jocelyn, P. C., *Biochemistry of the SH group: the occurrence, chemical properties, metabolism and biological function of thiols and disulphides*. Academic Press: London - New York, 1972; p 404.
17. Creighton, T. E., *Proteins: structures and molecular properties*. 2nd ed.; W. H. Freeman: New York, 1993; p 507.
18. Kang, Y. J., The antioxidant function of metallothionein in the heart. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **1999**, 222, (3), 263-73.

19. Krezel, A.; Hao, Q.; Maret, W., The zinc/thiolate redox biochemistry of metallothionein and the control of zinc ion fluctuations in cell signaling. *Arch. Biochem. Biophys.* **2007**, 463, (2), 188-200.
20. Meloni, G.; Faller, P.; Vašák, M., Redox silencing of copper in metal-linked neurodegenerative disorders: reaction of Zn7metallothionein-3 with Cu<sup>2+</sup> ions. *J. Biol. Chem.* **2007**, 282, (22), 16068-78.
21. Pountney, D. L.; Schauwecker, I.; Zarn, J.; Vašák, M., Formation of mammalian Cu<sub>8</sub>-metallothionein in vitro: evidence for the existence of two Cu(I)<sub>4</sub>-thiolate clusters. *Biochemistry* **1994**, 33, (32), 9699-705.
22. Molto, E.; Bonzon-Kulichenko, E.; Gallardo, N.; Andres, A., MTPA: a crustacean metallothionein that affects hepatopancreatic mitochondrial functions. *Arch. Biochem. Biophys.* **2007**, 467, (1), 31-40.
23. Palmiter, R. D., The elusive function of metallothioneins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **1998**, 95, (15), 8428-30.
24. Vašák, M.; Hasler, D. W., Metallothioneins: new functional and structural insights. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2000**, 4, (2), 177-83.
25. Coyle, P.; Philcox, J. C.; Carey, L. C.; Rofe, A. M., Metallothionein: the multipurpose protein. *Cell. Mol. Life Sci.* **2002**, 59, (4), 627-47.
26. Fowler, B. A.; Hildebrand, C. E.; Kojima, Y.; Webb, M., Nomenclature of metallothionein. *Experientia Suppl.* **1987**, 52, 19-22.
27. Binz, P. A.; Kagi, H. R., Metallothionein: Molecular evolution and classification. In *Metallothionein IV, [International Metallothionein Meeting]*, Klaassen, C., Ed. Birkhäuser Verlag: Basel, 1999; pp 7-13.
28. Valls, M.; Bofill, R.; González-Duarte, R.; González-Duarte, P.; Capdevila, M.; Atrian, S., A new insight into metallothionein (MT) classification and evolution. The in vivo and in vitro metal binding features of *Homarus americanus* recombinant MT. *J. Biol. Chem.* **2001**, 276, (35), 32835-43.
29. Tio, L.; Villarreal, L.; Atrian, S.; Capdevila, M., Functional differentiation in the mammalian metallothionein gene family: metal binding features of mouse MT4 and comparison with its paralog MT1. *J. Biol. Chem.* **2004**, 279, (23), 24403-13.
30. Romero-Isart, N.; Vašák, M., Advances in the structure and chemistry of metallothioneins. *J. Inorg. Biochem.* **2002**, 88, (3-4), 388-96.
31. Meloni, G.; Zovo, K.; Kazantseva, J.; Palumaa, P.; Vašák, M., Organization and assembly of metal-thiolate clusters in epithelium-specific metallothionein-4. *J. Biol. Chem.* **2006**, 281, (21), 14588-95.
32. Messerle, B. A.; Schaffer, A.; Vašák, M.; Kagi, J. H.; Wuthrich, K., Three-dimensional structure of human [113Cd7]metallothionein-2 in solution determined by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J. Mol. Biol.* **1990**, 214, (3), 765-79.
33. Capasso, C.; Carginale, V.; Crescenzi, O.; Di Maro, D.; Parisi, E.; Spadaccini, R.; Temussi, P. A., Solution structure of MT<sub>nc</sub>, a novel metallothionein from the Antarctic fish *Notothenia coriiceps*. *Structure* **2003**, 11, (4), 435-43.
34. Riek, R.; Precheur, B.; Wang, Y.; Mackay, E. A.; Wider, G.; Guntert, P.; Liu, A.; Kagi, J. H.; Wuthrich, K., NMR structure of the sea urchin (*Strongylocentrotus purpuratus*) metallothionein MTA. *J. Mol. Biol.* **1999**, 291, (2), 417-28.
35. Arseniev, A.; Schultze, P.; Worgotter, E.; Braun, W.; Wagner, G.; Vašák, M.; Kagi, J. H.; Wuthrich, K., Three-dimensional structure of rabbit liver [Cd7]metallothionein-2a in aqueous solution determined by nuclear magnetic resonance. *J. Mol. Biol.* **1988**, 201, (3), 637-57.
36. Schultze, P.; Worgotter, E.; Braun, W.; Wagner, G.; Vašák, M.; Kagi, J. H.; Wuthrich, K., Conformation of [Cd7]-metallothionein-2 from rat liver in aqueous

- solution determined by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J. Mol. Biol.* **1988**, 203, (1), 251-68.
37. Zangger, K.; Oz, G.; Otvos, J. D.; Armitage, I. M., Three-dimensional solution structure of mouse [Cd7]-metallothionein-1 by homonuclear and heteronuclear NMR spectroscopy. *Protein Sci.* **1999**, 8, (12), 2630-8.
  38. Oz, G.; Zangger, K.; Armitage, I. M., Three-dimensional structure and dynamics of a brain specific growth inhibitory factor: metallothionein-3. *Biochemistry* **2001**, 40, (38), 11433-41.
  39. Wang, H.; Zhang, Q.; Cai, B.; Li, H.; Sze, K. H.; Huang, Z. X.; Wu, H. M.; Sun, H., Solution structure and dynamics of human metallothionein-3 (MT-3). *FEBS Lett.* **2006**, 580, (3), 795-800.
  40. Muñoz, A.; Forsterling, F. H.; Shaw, C. F., 3rd; Petering, D. H., Structure of the (113)Cd(3)beta domains from *Homarus americanus* metallothionein-1: hydrogen bonding and solvent accessibility of sulfur atoms. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2002**, 7, (7-8), 713-24.
  41. Peterson, C. W.; Narula, S. S.; Armitage, I. M., 3D solution structure of copper and silver-substituted yeast metallothioneins. *FEBS Lett.* **1996**, 379, (1), 85-93.
  42. Zhu, Z.; DeRose, E. F.; Mullen, G. P.; Petering, D. H.; Shaw, C. F., 3rd, Sequential proton resonance assignments and metal cluster topology of lobster metallothionein-1. *Biochemistry* **1994**, 33, (30), 8858-65.
  43. Vašák, M., Metallothioneins. *Encyclopedia of Inorganic Chemistry* **1994**, IV, 2229-2241.
  44. Dolderer, B.; Echner, H.; Beck, A.; Hartmann, H. J.; Weser, U.; Luchinat, C.; Del Bianco, C., Coordination of three and four Cu(I) to the alpha- and beta-domain of vertebrate Zn-metallothionein-1, respectively, induces significant structural changes. *FEBS J.* **2007**, 274, (9), 2349-62.
  45. Roschitzki, B.; Vašák, M., A distinct Cu(4)-thiolate cluster of human metallothionein-3 is located in the N-terminal domain. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2002**, 7, (6), 611-6.
  46. Jocelyn, P. C., The standard redox potential of cysteine-cystine from the thiol-disulphide exchange reaction with glutathione and lipoic acid. *Eur. J. Biochem.* **1967**, 2, (3), 327-31.
  47. Vaher, M.; Romero-Isart, N.; Vašák, M.; Palumaa, P., Reactivity of Cd7-metallothionein with Cu(II) ions: evidence for a cooperative formation of Cd3,Cu(I)5-metallothionein. *J. Inorg. Biochem.* **2001**, 83, (1), 1-6.
  48. Narula, S. S.; Winge, D. R.; Armitage, I. M., Copper- and silver-substituted yeast metallothioneins: sequential <sup>1</sup>H NMR assignments reflecting conformational heterogeneity at the C terminus. *Biochemistry* **1993**, 32, (26), 6773-87.
  49. Bertini, I.; Hartmann, H. J.; Klein, T.; Liu, G.; Luchinat, C.; Weser, U., High resolution solution structure of the protein part of Cu7 metallothionein. *Eur. J. Biochem.* **2000**, 267, (4), 1008-18.
  50. Luchinat, C.; Dolderer, B.; Del Bianco, C.; Echner, H.; Hartmann, H. J.; Voelter, W.; Weser, U., The Cu(I)(7) cluster in yeast copper thionein survives major shortening of the polypeptide backbone as deduced from electronic absorption, circular dichroism, luminescence and <sup>1</sup>H NMR. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2003**, 8, (3), 353-9.
  51. Palacios, O.; Polec-Pawlak, K.; Lobinski, R.; Capdevila, M.; González-Duarte, P., Is Ag(I) an adequate probe for Cu(I) in structural copper-metallothionein studies? The binding features of Ag(I) to mammalian metallothionein 1. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2003**, 8, (8), 831-42.

52. Masters, B. A.; Kelly, E. J.; Quaife, C. J.; Brinster, R. L.; Palmiter, R. D., Targeted disruption of metallothionein I and II genes increases sensitivity to cadmium. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **1994**, 91, (2), 584-8.
53. Klaassen, C. D.; Liu, J.; Choudhuri, S., Metallothionein: an intracellular protein to protect against cadmium toxicity. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **1999**, 39, 267-94.
54. Trinchella, F.; Riggio, M.; Filosa, S.; Volpe, M. G.; Parisi, E.; Scudiero, R., Cadmium distribution and metallothionein expression in lizard tissues following acute and chronic cadmium intoxication. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* **2006**, 144, (3), 272-8.
55. Molto, E.; Bonzon-Kulichenko, E.; del Arco, A.; Lopez-Alanon, D. M.; Carrillo, O.; Gallardo, N.; Andres, A., Cloning, tissue expression and metal inducibility of an ubiquitous metallothionein from *Panulirus argus*. *Gene* **2005**, 361, 140-8.
56. Amiard, J. C.; Amiard-Triquet, C.; Barka, S.; Pellerin, J.; Rainbow, P. S., Metallothioneins in aquatic invertebrates: their role in metal detoxification and their use as biomarkers. *Aquat. Toxicol.* **2006**, 76, (2), 160-202.
57. Yang, Z. B.; Zhao, Y. L.; Li, N.; Yang, J., Effect of waterborne copper on the microstructures of gill and hepatopancreas in *Eriocheir sinensis* and its induction of metallothionein synthesis. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **2007**, 52, (2), 222-8.
58. Cherian, M. G.; Chan, H. M., Biological functions of metallothionein. A review. In *Metallothionein III. Biological roles and medical implications*, Suzuki, K. T.; Imura, N.; Kimura, M., Eds. 1993; pp 87-109.
59. Winge, D. R., The metallothionein structural motif involved in metalloregulation. In *Metallothionein III. Biological role and medical implications*, Suzuki, K. T.; Imura, N.; Kimura, M., Eds. 1993; pp 381-397.
60. Bremner, I., Involvement of metallothionein in the regulation of mineral metabolism. In *Metallothionein III. Biological roles and medical implications*, Suzuki, K. T.; Imura, N.; Kimura, M., Eds. 1993; pp 111-124.
61. Jiang, L. J.; Maret, W.; Vallee, B. L., The glutathione redox couple modulates zinc transfer from metallothionein to zinc-depleted sorbitol dehydrogenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **1998**, 95, (7), 3483-8.
62. Udom, A. O.; Brady, F. O., Reactivation in vitro of zinc-requiring apo-enzymes by rat liver zinc-thionein. *Biochem. J.* **1980**, 187, (2), 329-35.
63. Beltramini, M.; Lerch, K., Copper transfer between *Neurospora* copper metallothionein and type 3 copper apoproteins. *FEBS Lett.* **1982**, 142, (2), 219-22.
64. Formigari, A.; Irato, P.; Santon, A., Zinc, antioxidant systems and metallothionein in metal mediated-apoptosis: biochemical and cytochemical aspects. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* **2007**, 146, (4), 443-59.
65. Kang, Y. J., Metallothionein redox cycle and function. *Exp. Biol. Med. (Maywood)* **2006**, 231, (9), 1459-67.
66. Viarengo, A.; Burlando, B.; Ceratto, N.; Panfoli, I., Antioxidant role of metallothioneins: a comparative overview. *Cell. Mol. Biol. (Noisy-le-grand)* **2000**, 46, (2), 407-17.
67. Quesada, A. R.; Byrnes, R. W.; Krezoski, S. O.; Petering, D. H., Direct reaction of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> with sulfhydryl groups in HL-60 cells: zinc-metallothionein and other sites. *Arch. Biochem. Biophys.* **1996**, 334, (2), 241-50.
68. Lazo, J. S.; Kondo, Y.; Dellapiazza, D.; Michalska, A. E.; Choo, K. H.; Pitt, B. R., Enhanced sensitivity to oxidative stress in cultured embryonic cells from transgenic mice deficient in metallothionein I and II genes. *J. Biol. Chem.* **1995**, 270, (10), 5506-10.

69. Coyle, P.; Philcox, J. C.; Rofe, A. M., Metallothionein-null mice absorb less Zn from an egg-white diet, but a similar amount from solutions, although with altered intertissue Zn distribution. *J. Nutr.* **1999**, 129, (2), 372-9.
70. Ogra, Y.; Aoyama, M.; Suzuki, K. T., Protective role of metallothionein against copper depletion. *Arch. Biochem. Biophys.* **2006**, 451, (2), 112-8.
71. Beattie, J. H.; Wood, A. M.; Newman, A. M.; Bremner, I.; Choo, K. H.; Michalska, A. E.; Duncan, J. S.; Trayhurn, P., Obesity and hyperleptinemia in metallothionein (-I and -II) null mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **1998**, 95, (1), 358-63.
72. Deng, D. X.; Chakrabarti, S.; Waalkes, M. P.; Cherian, M. G., Metallothionein and apoptosis in primary human hepatocellular carcinoma and metastatic adenocarcinoma. *Histopathology* **1998**, 32, (4), 340-7.
73. Kondo, Y.; Rusnak, J. M.; Hoyt, D. G.; Settineri, C. E.; Pitt, B. R.; Lazo, J. S., Enhanced apoptosis in metallothionein null cells. *Mol. Pharmacol.* **1997**, 52, (2), 195-201.
74. Hidalgo, J.; Aschner, M.; Zatta, P.; Vašák, M., Roles of the metallothionein family of proteins in the central nervous system. *Brain Res. Bull.* **2001**, 55, (2), 133-45.
75. Chung, R. S.; Hidalgo, J.; West, A. K., New insight into the molecular pathways of metallothionein-mediated neuroprotection and regeneration. *J. Neurochem.* **2008**, 104, (1), 14-20.
76. Hidalgo, J., Metallothioneins and brain injury: What transgenic mice tell us. *Environmental Health and Preventive Medicine* **2004**, 9, 87-94.
77. Chung, R. S.; Hidalgo, J.; West, A. K., New insight into the molecular pathways of metallothionein-mediated neuroprotection and regeneration. *J Neurochem* **2007**, 104, (1), 14-20.
78. Ambjorn, M.; Asmussen, J. W.; Lindstam, M.; Gotfryd, K.; Jacobsen, C.; Kiselyov, V. V.; Moestrup, S. K.; Penkowa, M.; Bock, E.; Berezin, V., Metallothionein and a peptide modeled after metallothionein, EmtinB, induce neuronal differentiation and survival through binding to receptors of the low-density lipoprotein receptor family. *J. Neurochem.* **2008**, 104, (1), 21-37.
79. Buttke, T. M.; Sandstrom, P. A., Oxidative stress as a mediator of apoptosis. *Immunol. Today* **1994**, 15, (1), 7-10.
80. Zangger, K.; Armitage, I. M., Dynamics of interdomain and intermolecular interactions in mammalian metallothioneins. *J. Inorg. Biochem.* **2002**, 88, (2), 135-43.
81. Quaipe, C. J.; Findley, S. D.; Erickson, J. C.; Froelick, G. J.; Kelly, E. J.; Zambrowicz, B. P.; Palmiter, R. D., Induction of a new metallothionein isoform (MT-IV) occurs during differentiation of stratified squamous epithelia. *Biochemistry* **1994**, 33, (23), 7250-9.
82. Uchida, Y.; Takio, K.; Titani, K.; Ihara, Y.; Tomonaga, M., The growth inhibitory factor that is deficient in the Alzheimer's disease brain is a 68 amino acid metallothionein-like protein. *Neuron* **1991**, 7, (2), 337-47.
83. Romero-Isart, N.; Jensen, L. T.; Zerbe, O.; Winge, D. R.; Vašák, M., Engineering of metallothionein-3 neuroinhibitory activity into the inactive isoform metallothionein-1. *J. Biol. Chem.* **2002**, 277, (40), 37023-8.
84. Zheng, Q.; Yang, W. M.; Yu, W. H.; Cai, B.; Teng, X. C.; Xie, Y.; Sun, H. Z.; Zhang, M. J.; Huang, Z. X., The effect of the EAAEAE insert on the property of human metallothionein-3. *Protein Eng.* **2003**, 16, (12), 865-70.

85. Cai, B.; Zheng, Q.; Teng, X. C.; Chen, D.; Wang, Y.; Wang, K. Q.; Zhou, G. M.; Xie, Y.; Zhang, M. J.; Sun, H. Z.; Huang, Z. X., The role of Thr5 in human neuron growth inhibitory factor. *J Biol Inorg Chem* **2006**, 11, (4), 476-82.
86. Sewell, A. K.; Jensen, L. T.; Erickson, J. C.; Palmiter, R. D.; Winge, D. R., Bioactivity of metallothionein-3 correlates with its novel beta domain sequence rather than metal binding properties. *Biochemistry* **1995**, 34, (14), 4740-7.
87. Hasler, D. W.; Jensen, L. T.; Zerbe, O.; Winge, D. R.; Vašák, M., Effect of the two conserved prolines of human growth inhibitory factor (metallothionein-3) on its biological activity and structure fluctuation: comparison with a mutant protein. *Biochemistry* **2000**, 39, (47), 14567-75.
88. Faller, P.; Hasler, D. W.; Zerbe, O.; Klauser, S.; Winge, D. R.; Vašák, M., Evidence for a dynamic structure of human neuronal growth inhibitory factor and for major rearrangements of its metal-thiolate clusters. *Biochemistry* **1999**, 38, (31), 10158-67.
89. Brouwer, M.; Enghild, J.; Hoexum-Brouwer, T.; Thogersen, I.; Truncali, A., Primary structure and tissue-specific expression of blue crab (*Callinectes sapidus*) metallothionein isoforms. *Biochem. J.* **1995**, 311 ( Pt 2), 617-22.
90. Schlenk, D.; Brouwer, M., Isolation of three copper metallothionein isoforms from the blue crab (*Callinectes sapidus*). *Aquat. Toxicol.* **1991**, 20, 25-34.
91. Dallinger, R.; Berger, B.; Hunziker, P.; Kagi, J. H., Metallothionein in snail Cd and Cu metabolism. *Nature* **1997**, 388, (6639), 237-8.
92. Brouwer, M.; Syring, R.; Hoexum Brouwer, T., Role of a copper-specific metallothionein of the blue crab, *Callinectes sapidus*, in copper metabolism associated with degradation and synthesis of hemocyanin. *J. Inorg. Biochem.* **2002**, 88, (2), 228-39.
93. Ang, S. G.; Wong, V. W., Chromatographic analysis of low-molecular-mass copper-binding ligands from the crab species *Scylla serrata* and *Portunus pelagicus*. *J. Chromatogr.* **1992**, 599, (1-2), 21-4.
94. Kille, P.; Hemmings, A.; Lunney, E. A., Memories of metallothionein. *Biochim. Biophys. Acta* **1994**, 1205, (2), 151-61.
95. Vašák, M.; Hasler, D. W.; Faller, P., Metal-thiolate clusters in neuronal growth inhibitory factor (GIF). *J. Inorg. Biochem.* **2000**, 79, (1-4), 7-10.
96. Nielson, K. B.; Winge, D. R., Preferential binding of copper to the beta domain of metallothionein. *J. Biol. Chem.* **1984**, 259, (8), 4941-6.
97. Gruber, C.; Sturzenbaum, S.; Gehrig, P.; Sack, R.; Hunziker, P.; Berger, B.; Dallinger, R., Isolation and characterization of a self-sufficient one-domain protein. (Cd)-metallothionein from *Eisenia foetida*. *Eur. J. Biochem.* **2000**, 267, (2), 573-82.
98. Fu, C.; Miao, W., Cloning and characterization of a new multi-stress inducible metallothionein gene in *Tetrahymena pyriformis*. *Protist* **2006**, 157, (2), 193-203.
99. Piccinni, E.; Irato, P.; Coppellotti, O.; Guidolin, L., Biochemical and ultrastructural data on *Tetrahymena pyriformis* treated with copper and cadmium. *J. Cell. Sci.* **1987**, 88 ( Pt 3), 283-93.
100. Boldrin, F.; Santovito, G.; Irato, P.; Piccinni, E., Metal interaction and regulation of *Tetrahymena pigmentosa* metallothionein genes. *Protist* **2002**, 153, (3), 283-91.
101. Piccinni, E.; Staudenmann, W.; Albergoni, V.; De Gabrieli, R.; James, P., Purification and primary structure of metallothioneins induced by cadmium in the protists *Tetrahymena pigmentosa* and *Tetrahymena pyriformis*. *Eur. J. Biochem.* **1994**, 226, (3), 853-9.

102. Domenech, J.; Bofill, R.; Tinti, A.; Torreggiani, A.; Atrian, S.; Capdevila, M., Comparative insight into the Zn(II)-, Cd(II)- and Cu(I)-binding features of the protozoan *Tetrahymena pyriformis* MT1 metallothionein. *Biochim. Biophys. Acta* **2008**, 1784, (4), 693-704.
103. Dondero, F.; Cavaletto, M.; Ghezzi, A. R.; La Terza, A.; Banni, M.; Viarengo, A., Biochemical characterization and quantitative gene expression analysis of the multi-stress inducible metallothionein from *Tetrahymena thermophila*. *Protist* **2004**, 155, (2), 157-68.
104. Shang, Y.; Song, X.; Bowen, J.; Corstanje, R.; Gao, Y.; Gaertig, J.; Gorovsky, M. A., A robust inducible-repressible promoter greatly facilitates gene knockouts, conditional expression, and overexpression of homologous and heterologous genes in *Tetrahymena thermophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **2002**, 99, (6), 3734-9.
105. Jenny, M. J.; Warr, G. W.; Ringwood, A. H.; Baltzegar, D. A.; Chapman, R. W., Regulation of metallothionein genes in the American oyster (*Crassostrea virginica*): ontogeny and differential expression in response to different stressors. *Gene* **2006**, 379, 156-65.
106. Syring, R. A.; Hoexum Brouwer, T.; Brouwer, M., Cloning and sequencing of cDNAs encoding for a novel copper-specific metallothionein and two cadmium-inducible metallothioneins from the blue crab *Callinectes sapidus*. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* **2000**, 125, (3), 325-32.
107. Base de dades *TrEMBL*.
108. Hong, S. H.; Maret, W., A fluorescence resonance energy transfer sensor for the beta-domain of metallothionein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **2003**, 100, (5), 2255-60.
109. Strouhal, M.; Kizek, R.; Vacek, J.; Trnkova, L.; Nemeč, M., Electrochemical study of heavy metals and metallothionein in yeast *Yarrowia lipolytica*. *Bioelectrochemistry* **2003**, 60, (1-2), 29-36.
110. Garcia, S.; Prado, M.; Degano, R.; Dominguez, A., A copper-responsive transcription factor, CRF1, mediates copper and cadmium resistance in *Yarrowia lipolytica*. *J. Biol. Chem.* **2002**, 277, (40), 37359-68.
111. Park, H.; Ahn, I. Y.; Choi, H. J.; Pyo, S. H.; Lee, H. E., Cloning, expression and characterization of metallothionein from the Antarctic clam *Laternula elliptica*. *Protein Expr. Purif.* **2007**, 52, (1), 82-8.
112. Boldrin, F.; Santovito, G.; Negrisolo, E.; Piccinni, E., Cloning and sequencing of four new metallothionein genes from *Tetrahymena thermophila* and *T. pigmentosa*: evolutionary relationships in *Tetrahymena* MT family. *Protist* **2003**, 154, (3-4), 431-42.
113. Diaz, S.; Amaro, F.; Rico, D.; Campos, V.; Benitez, L.; Martin-González, A.; Hamilton, E. P.; Orias, E.; Gutierrez, J. C., *Tetrahymena* metallothioneins fall into two discrete subfamilies. *PLoS ONE* **2007**, 2, e291.
114. Lerch, K.; Ammer, D.; Olafson, R. W., Crab metallothionein. Primary structures of metallothioneins 1 and 2. *J. Biol. Chem.* **1982**, 257, (5), 2420-6.
115. Otvos, J. D.; Olafson, R. W.; Armitage, I. M., Structure of an invertebrate metallothionein from *Scylla serrata*. *J. Biol. Chem.* **1982**, 257, (5), 2427-31.
116. Brouwer, M.; Winge, D. R.; Gray, W. R., Structural and functional diversity of copper-metallothioneins from the American lobster *Homarus americanus*. *J. Inorg. Biochem.* **1989**, 35, (4), 289-303.
117. Pedersen, K. L.; Pedersen, S. N.; Hojrup, P.; Andersen, J. S.; Roepstorff, P.; Knudsen, J.; Depledge, M. H., Purification and characterization of a cadmium-

- induced metallothionein from the shore crab *Carcinus maenas* (L.). *Biochem. J.* **1994**, 297 ( Pt 3), 609-14.
118. Pedersen, S. N.; Pedersen, K. L.; Hojrup, P.; Depledge, M. H.; Knudsen, J., Primary structures of decapod crustacean metallothioneins with special emphasis on freshwater and semi-terrestrial species. *Biochem. J.* **1996**, 319 ( Pt 3), 999-1003.
119. Hunt, C. T.; Boulanger, Y.; Fesik, S. W.; Armitage, I. M., NMR analysis of the structure and metal sequestering properties of metallothioneins. *Environ. Health Perspect.* **1984**, 54, 135-45.
120. Law, A. Y.; Cherian, M. G.; Stillman, M. J., A spectroscopic study of rat liver and *Scylla serrata* crab metallothioneins. *Biochim. Biophys. Acta* **1984**, 784, (1), 53-61.
121. Silvestre, F.; Duchene, C.; Trausch, G.; Devos, P., Tissue-specific cadmium accumulation and metallothionein-like protein levels during acclimation process in the Chinese crab *Eriocheir sinensis*. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* **2005**, 140, (1), 39-45.
122. Pedersen, S. N.; Pedersen, K. L.; Hojrup, P.; Knudsen, J.; Depledge, M. H., Induction and identification of cadmium-, zinc- and copper-metallothioneins in the shore crab *Carcinus maenas* (L.). *Comp. Biochem. Physiol. C Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.* **1998**, 120, (2), 251-9.
123. Overnell, J.; Good, M.; Vašák, M., Spectroscopic studies on cadmium (II)- and cobalt(II)-substituted metallothionein from the crab *Cancer pagurus*. Evidence for one additional low-affinity metal-binding site. *Eur. J. Biochem.* **1988**, 172, (1), 171-7.
124. Overnell, J., Occurrence of cadmium in crabs (*Cancer pagurus*) and the isolation and properties of cadmium metallothionein. *Environ. Health Perspect.* **1986**, 65, 101-5.
125. Sparla, A. M.; Overnell, J., The binding of cadmium to crab cadmium metallothionein. A polarographic investigation. *Biochem. J.* **1990**, 267, (2), 539-40.
126. Brouwer, M.; Brouwer-Hoexum, T., Interaction of copper-metallothionein from the American lobster, *Homarus americanus*, with glutathione. *Arch. Biochem. Biophys.* **1991**, 290, (1), 207-13.
127. Muñoz, A.; Petering, D. H.; Shaw, C. F., 3rd, The requirements for stable metallothionein clusters examined using synthetic lobster domains. *Mar. Environ. Res.* **2000**, 50, (1-5), 93-7.
128. Engel, D. W.; Brouwer, M.; Mercaldo-Allen, R., Effects of molting and environmental factors on trace metal body-burdens and hemocyanin concentrations in the American lobster, *Homarus americanus*. *Mar. Environ. Res.* **2001**, 52, (3), 257-69.
129. Muñoz, A.; Petering, D. H.; Shaw, C. F., 3rd, Structure-reactivity relationships among metallothionein three-metal domains: role of non-cysteine amino acid residues in lobster metallothionein and human metallothionein-3. *Inorg. Chem.* **2000**, 39, (26), 6114-23.
130. Brouwer, M.; Brouwer-Hoexum, T., Glutathione-mediated transfer of copper(I) into American lobster apohemocyanin. *Biochemistry* **1992**, 31, (16), 4096-102.
131. Chou, C. L.; Guy, R. D.; Uthe, J. F., The reactivity of EDTA, copper ion, and copper citrate with metallothioneins isolated from the digestive gland of cadmium-contaminated lobster (*Homarus americanus*). *Sci. Total Environ.* **1991**, 105, 61-71.
132. Chou, C. L.; Guy, R. D.; Uthe, J. F., Isolation and characterization of metal-binding proteins (metallothioneins) from lobster digestive gland (*Homarus americanus*). *Sci. Total Environ.* **1991**, 105, 41-59.



133. Engel, D. W.; Brouwer, M., Cadmium and copper metallothioneins in the American lobster, *Homarus americanus*. *Environ. Health Perspect.* **1986**, 65, 87-92.
134. Brouwer, M., Role of metallothionein in intracellular metal metabolism and in activation of copper- and zinc-dependent proteins. *Adv. Inorg. Biochem.* **1996**, 11, 235-260.
135. Brouwer, M.; Schlenk, D.; Ringwood, A. H.; Brouwer-Hoexum, T., Metal-specific induction of metallothionein isoforms in the blue crab *Callinectes sapidus* in response to single- and mixed-metal exposure. *Arch. Biochem. Biophys.* **1992**, 294, (2), 461-8.
136. Brouwer, M.; Brouwer, T. H., Biochemical defense mechanisms against copper-induced oxidative damage in the blue crab, *Callinectes sapidus*. *Arch. Biochem. Biophys.* **1998**, 351, (2), 257-64.
137. Cols, N. Enginyeria de proteïnes i pèptids quelants de metalls pesants. Universitat de Barcelona, Barcelona, **1996**.
138. Hanahan, D., Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **1983**, 166, (4), 557-80.
139. Sambrook, J.; Fritsch, E. F.; Maniatis, T., *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2a ed.; Cold Spring Harbor Laboratory: Cold Spring Harbor, **1989**.
140. Esteban, L., *La espectrometría de masas en imágenes*. ACK Editores, DL: Madrid, 1993.
141. Hofstadler, S. A.; Bakhtiar, R.; Smith, R. D., Electrospray ionization mass spectroscopy: Part I. Instrumentation and spectral interpretation. *J. Chem. Educ.* **1996**, 73, A82-A88.
142. Birchmeier, W.; Christen, P., Chemical evidence for syncatalytic conformational changes in aspartate aminotransferase. *FEBS Lett.* **1971**, 18, (2), 209-213.
143. Riddles, P. W.; Blakeley, R. L.; Zerner, B., Reassessment of Ellman's reagent. *Methods Enzymol.* **1983**, 91, 49-60.
144. Stryer, L., *Bioquímica*. Reverté: Barcelona, **1982**.
145. Shaw, C. F., 3rd; Savas, M. M.; Petering, D. H., Ligand substitution and sulfhydryl reactivity of metallothionein. *Methods Enzymol.* **1991**, 205, 401-14.
146. Pedersen, A. O.; Jacobsen, J., Reactivity of the thiol group in human and bovine albumin at pH 3--9, as measured by exchange with 2,2'-dithiodipyridine. *Eur. J. Biochem.* **1980**, 106, (1), 291-5.
147. Val Holde, K. E., *Bioquímica física*. Alhambra: Madrid, **1979**.
148. Vašák, M., Metal removal and substitution in vertebrate and invertebrate metallothioneins. In *Methods Enzymol.*, Riordan, J. F.; Vallee, B. L., Eds. **1991**; Vol. 205, pp 452-8.
149. Hwang, T. L.; Shaka, A. J., Water suppression that works. Excitation sculpting using arbitrary wave-forms and pulsed-field gradients. *J. Magn. Reson., Ser. A* **1995**, 112, (2), 275-279.
150. Cols, N.; Romero-Isart, N.; Capdevila, M.; Oliva, B.; González-Duarte, P.; González-Duarte, R.; Atrian, S., Binding of excess cadmium(II) to Cd7-metallothionein from recombinant mouse Zn7-metallothionein 1. UV-VIS absorption and circular dichroism studies and theoretical location approach by surface accessibility analysis. *J. Inorg. Biochem.* **1997**, 68, (3), 157-66.
151. Capdevila, M.; Cols, N.; Romero-Isart, N.; González-Duarte, R.; Atrian, S.; González-Duarte, P., Recombinant synthesis of mouse Zn3-beta and Zn4-alpha metallothionein 1 domains and characterization of their cadmium(II) binding capacity. *Cell. Mol. Life Sci.* **1997**, 53, (8), 681-8.

152. Hobbs, M. V.; Weigle, W. O.; Noonan, D. J.; Torbett, B. E.; McEvelly, R. J.; Koch, R. J.; Cardenas, G. J.; Ernst, D. N., Patterns of cytokine gene expression by CD4+ T cells from young and old mice. *J. Immunol.* **1993**, 150, (8 Pt 1), 3602-14.
153. D'Auria, S.; Carginale, V.; Scudiero, R.; Crescenzi, O.; Di Maro, D.; Temussi, P. A.; Parisi, E.; Capasso, C., Structural characterization and thermal stability of Notothenia coriiceps metallothionein. *Biochem. J.* **2001**, 354, (Pt 2), 291-9.
154. Valls, M.; Bofill, R.; Romero-Isart, N.; González-Duarte, R.; Abian, J.; Carrascal, M.; González-Duarte, P.; Capdevila, M.; Atrian, S., Drosophila MTN: a metazoan copper-thionein related to fungal forms. *FEBS Lett.* **2000**, 467, (2-3), 189-94.
155. Hartmann, H. J.; Weser, U., Copper-thionein from fetal bovine liver. *Biochim. Biophys. Acta* **1977**, 491, (1), 211-22.
156. Munger, K.; Germann, U. A.; Beltramini, M.; Niedermann, D.; Baitella-Eberle, G.; Kagi, J. H.; Lerch, K., (Cu,Zn)-metallothioneins from fetal bovine liver. Chemical and spectroscopic properties. *J. Biol. Chem.* **1985**, 260, (18), 10032-8.
157. Beltramini, M.; Lerch, K., Spectroscopic studies on Neurospora copper metallothionein. *Biochemistry* **1983**, 22, (9), 2043-8.
158. Capdevila, M.; Domenech, J.; Pagani, A.; Tio, L.; Villarreal, L.; Atrian, S., Zn- and Cd-metallothionein recombinant species from the most diverse phyla may contain sulfide (S<sup>2-</sup>) ligands. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2005**, 44, (29), 4618-22.
159. Rupp, H.; Weser, U., Circular dichroism of metallothioneins. A structural approach. *Biochim. Biophys. Acta* **1978**, 533, (1), 209-26.
160. Vašák, M.; Kagi, J. H. R., Spectroscopic properties of metallothionein. In *Metal ions in biological systems*, Sigel, H., Ed. Marcel Dekker Inc.: New York and Basel, 1983; Vol. 15, pp 213-273.
161. Vašák, M.; Kagi, J. H.; Hill, H. A., Zinc(II), cadmium(II), and mercury(II) thiolate transitions in metallothionein. *Biochemistry* **1981**, 20, (10), 2852-6.
162. Narula, S. S.; Armitage, I.; Brouwer, M.; Enghild, J., Establishment of two distinct protein domains in blue crab Callinectes sapidus metallothionein-I through heteronuclear (1H-113Cd) and homonuclear (1H-1H) correlation NMR experiments. *Magn. Reson. Chem.* **1993**, 31, S96-S103.
163. Domenech, J.; Palacios, O.; Villarreal, L.; González-Duarte, P.; Capdevila, M.; Atrian, S., MTO: the second member of a Drosophila dual copper-thionein system. *FEBS Lett.* **2003**, 533, (1-3), 72-8.
164. Ellman, G. L., Tissue sulfhydryl groups. *Arch. Biochem. Biophys.* **1959**, 82, (1), 70-7.
165. Winge, D. R., Copper coordination in metallothionein. *Methods Enzymol.* **1991**, 205, 458-69.
166. Pagani, A.; Villarreal, L.; Capdevila, M.; Atrian, S., The Saccharomyces cerevisiae Crs5 Metallothionein metal-binding abilities and its role in the response to zinc overload. *Mol. Microbiol.* **2007**, 63, (1), 256-69.
167. Vašák, M., Spectroscopic studies on cobalt(II) metallothionein: evidence for pseudotetrahedral metal coordination. *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, 102, (11), 3953-3955.
168. Good, M.; Vašák, M., Iron(II)-substituted metallothionein: evidence for the existence of iron-thiolate clusters. *Biochemistry* **1986**, 25, (26), 8353-6.
169. Ding, X. Q.; Butzlaff, C.; Bill, E.; Pountney, D. L.; Henkel, G.; Winkler, H.; Vašák, M.; Trautwein, A. X., Mossbauer and magnetic susceptibility studies on iron(II) metallothionein from rabbit liver. Evidence for the existence of an unusual type of [M3(CysS)9]3- cluster. *Eur. J. Biochem.* **1994**, 220, (3), 827-37.

170. Higham, D. P.; Nicholson, J. K.; Overnell, J.; Sadler, P. J., NMR studies of crab and plaice metallothioneins. *Environ. Health Perspect.* **1986**, 65, 157-65.
171. Blindauer, C. A.; Polfer, N. C.; Keiper, S. E.; Harrison, M. D.; Robinson, N. J.; Langridge-Smith, P. R. R.; Sadler, P. J., Inert site in protein zinc cluster: isotope exchange by high resolution mass spectrometry. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 3226-3227.
172. Muñoz, A.; Laib, F.; Petering, D. H.; Shaw, C. F., 3rd, Characterization of the cadmium complex of peptide 49-61: a putative nucleation center for cadmium-induced folding in rabbit liver metallothionein IIA. *J. Biol. Inorg. Chem.* **1999**, 4, (4), 495-507.
173. Kelly, S. M.; Jess, T. J.; Price, N. C., How to study proteins by circular dichroism. *Biochim. Biophys. Acta* **2005**, 1751, (2), 119-39.
174. Wang, Y.; Mackay, E. A.; Kurasaki, M.; Kagi, J. H., Purification and characterisation of recombinant sea urchin metallothionein expressed in *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.* **1994**, 225, (1), 449-57.
175. Graminski, G. F.; Kubo, Y.; Armstrong, R. N., Spectroscopic and kinetic evidence for the thiolate anion of glutathione at the active site of glutathione S-transferase. *Biochemistry* **1989**, 28, (8), 3562-8.
176. Jensen, L. T.; Peltier, J. M.; Winge, D., Identification of a four copper folding intermediate in mammalian copper metallothionein by electrospray ionization mass spectrometry. *J. Biol. Inorg. Chem.* **1998**, 3, (6), 627-631.
177. Dallinger, R.; Chabicovsky, M.; Hodl, E.; Prem, C.; Hunziker, P.; Manzl, C., Copper in *Helix pomatia* (Gastropoda) is regulated by one single cell type: differently responsive metal pools in rhogocytes. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **2005**, 289, (4), R1185-95.
178. Lane, T. W.; Saito, M. A.; George, G. N.; Pickering, I. J.; Prince, R. C.; Morel, F. M., Biochemistry: a cadmium enzyme from a marine diatom. *Nature* **2005**, 435, (7038), 42.
179. Martelli, A.; Rousselet, E.; Dycke, C.; Bouron, A.; Moulis, J. M., Cadmium toxicity in animal cells by interference with essential metals. *Biochimie* **2006**, 88, (11), 1807-14.
180. Vallee, B. L., The function of metallothionein. *Neurochem. Int.* **1995**, 27, (1), 23-33.
181. Cherian, M. G., Metabolism of orally administered cadmium-metallothionein in mice. *Environ. Health Perspect.* **1979**, 28, 127-30.
182. Cousins, R. J., Metallothionein synthesis and degradation: relationship to cadmium metabolism. *Environ. Health Perspect.* **1979**, 28, 131-6.
183. Kagi, J. H.; Valee, B. L., Metallothionein: a cadmium- and zinc-containing protein from equine renal cortex. *J. Biol. Chem.* **1960**, 235, 3460-5.
184. Nettesheim, D. G.; Engeseth, H. R.; Otvos, J. D., Products of metal exchange reactions of metallothionein. *Biochemistry* **1985**, 24, (24), 6744-51.
185. Dallinger, R.; Wang, Y.; Berger, B.; Mackay, E. A.; Kagi, J. H., Spectroscopic characterization of metallothionein from the terrestrial snail, *Helix pomatia*. *Eur. J. Biochem.* **2001**, 268, (15), 4126-33.
186. Faller, P.; Vašák, M., Distinct metal-thiolate clusters in the N-terminal domain of neuronal growth inhibitory factor. *Biochemistry* **1997**, 36, (43), 13341-8.
187. Hasler, D. W.; Faller, P.; Vašák, M., Metal-thiolate clusters in the C-terminal domain of human neuronal growth inhibitory factor (GIF). *Biochemistry* **1998**, 37, (42), 14966-73.

188. Palumaa, P.; Eriste, E.; Njunkova, O.; Pokras, L.; Jornvall, H.; Sillard, R., Brain-specific metallothionein-3 has higher metal-binding capacity than ubiquitous metallothioneins and binds metals noncooperatively. *Biochemistry* **2002**, 41, (19), 6158-63.
189. Gehrig, P. M.; You, C.; Dallinger, R.; Gruber, C.; Brouwer, M.; Kagi, J. H.; Hunziker, P. E., Electrospray ionization mass spectrometry of zinc, cadmium, and copper metallothioneins: evidence for metal-binding cooperativity. *Protein Sci.* **2000**, 9, (2), 395-402.
190. Willner, H.; Vašák, M.; Kagi, J. H., Cadmium-thiolate clusters in metallothionein: spectrophotometric and spectropolarimetric features. *Biochemistry* **1987**, 26, (19), 6287-92.
191. Capasso, C.; Carginale, V.; Crescenzi, O.; Di Maro, D.; Spadaccini, R.; Temussi, P. A.; Parisi, E., Structural and functional studies of vertebrate metallothioneins: cross-talk between domains in the absence of physical contact. *Biochem. J.* **2005**, 391, (Pt 1), 95-103.
192. Nielson, K. B.; Atkin, C. L.; Winge, D. R., Distinct metal-binding configurations in metallothionein. *J. Biol. Chem.* **1985**, 260, (9), 5342-50.
193. Chung, R. S.; West, A. K., A role for extracellular metallothioneins in CNS injury and repair. *Neuroscience* **2004**, 123, (3), 595-9.
194. Hozumi, I.; Asanuma, M.; Yamada, M.; Uchida, Y., Metallothioneins and neurodegenerative diseases. *J. Health Sci.* **2004**, 50, (4), 323-331.
195. Penkowa, M.; Carrasco, J.; Giralt, M.; Molinero, A.; Hernandez, J.; Campbell, I. L.; Hidalgo, J., Altered central nervous system cytokine-growth factor expression profiles and angiogenesis in metallothionein-I+II deficient mice. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **2000**, 20, (8), 1174-89.
196. Giralt, M.; Penkowa, M.; Lago, N.; Molinero, A.; Hidalgo, J., Metallothionein-1+2 protect the CNS after a focal brain injury. *Exp. Neurol.* **2002**, 173, (1), 114-28.
197. Penkowa, M.; Tio, L.; Giralt, M.; Quintana, A.; Molinero, A.; Atrian, S.; Vašák, M.; Hidalgo, J., Specificity and divergence in the neurobiologic effects of different metallothioneins after brain injury. *J. Neurosci. Res.* **2006**, 83, (6), 974-84.
198. Jiang, L. J.; Vašák, M.; Vallee, B. L.; Maret, W., Zinc transfer potentials of the alpha - and beta-clusters of metallothionein are affected by domain interactions in the whole molecule. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **2000**, 97, (6), 2503-8.
199. Quintana, A.; Molinero, A.; Florit, S.; Manso, Y.; Comes, G.; Carrasco, J.; Giralt, M.; Borup, R.; Nielsen, F. C.; Campbell, I. L.; Penkowa, M.; Hidalgo, J., Diverging mechanisms for TNF-alpha receptors in normal mouse brains and in functional recovery after injury: From gene to behavior. *J. Neurosci. Res.* **2007**, 85, (12), 2668-85.
200. Orihuela, R.; Domenech, J.; Bofill, R.; You, C.; Mackay, E. A.; Kagi, J. H.; Capdevila, M.; Atrian, S., The metal-binding features of the recombinant mussel *Mytilus edulis* MT-10-IV metallothionein. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2008**.
201. Kagi, J. H.; Vallee, B. L., Metallothionein: a cadmium and zinc-containing protein from equine renal cortex. II. Physico-chemical properties. *J. Biol. Chem.* **1961**, 236, 2435-42.
202. Weser, U.; Rupp, H.; Donay, F.; Linnemann, F.; Voelter, W.; Voetsch, W.; Jung, G., Characterization of Cd, Zn-thionein (metallothionein) isolated from rat and chicken liver. *Eur. J. Biochem.* **1973**, 39, (1), 127-40.

203. Yu, X.; Wojciechowski, M.; Fenselau, C., Assessment of metals in reconstituted metallothioneins by electrospray mass spectrometry. *Anal. Chem.* **1993**, 65, (10), 1355-9.









## RELACIÓ DE TAULES

### I. Introducció

Taula I.1.- MTs amb l'estructura 3D inclosa en el PDB	10
Taula I.2.- MTs amb triplets de cisteïnes	21
Taula I.3.- MTs de crustaci	24
Taula I.4.- MTs de <i>C. sapidus</i>	27

### II. Objectius

### III. Mètodes

Taula III.1.- Tractament dels ratolins criolesionats amb pèptid, proteïna o solució salina	68
--	----

### IV. Síntesi de les formes metal·lades de MTC mitjançant tècniques d'enginyeria genètica

Taula IV.1.- Dades de les síntesis de MTC en medi ric en Zn(II)	90
Taula IV.2.- Dades de les síntesis de MTC en medi ric en Cu(II)	97
Taula IV.3.- Dades de les síntesis de MTC en medi ric en Cu(II) i Zn(II)	101

### V. Obtenció de les formes holoMTC per reconstitució d'apoMTC amb diferents metalls

Taula V.1.- Dades d'apoMTC	109
Taula V.2.- Valors de pH, $\epsilon$ i D de la valoració de Cd <sub>8</sub> MTC amb HCl	120

### VI. Caracterització de les espècies metal·lades que forma MTC amb Cd(II) i Cu(I) mitjançant valoracions *in vitro*

Taula VI.1.- Espècies Cd <sub>x</sub> Zn <sub>y</sub> MTC de la valoració de ZnMTC amb Cd <sup>2+</sup>	137
---	-----

### VII. Caracterització estructural de <sup>113</sup>CdMTC

Taula VII.1.- Desplaçaments químics de <sup>113</sup> Cd de les mostres de MTC	157
--	-----

## **VIII. Paper dels dominis de la MT de mamífer en la resposta inflamatòria**

Taula VIII.1.- Dades de la síntesi de ZnMT-1 de ratolí i els seus dominis 170

## **IX. Discussió**

## **X. Conclusions**

## **XI. Bibliografia**

## RELACIÓ DE FIGURES

### I. Introducció

Figura I.1.- Complexació de la cisteïna amb un o dos ions metàl·lics	4
Figura I.2.- Dominis $\alpha$ i $\beta$ de les MTs de mamífer	4
Figura I.3.- Estructura 3D de diverses M(II)MTs	5
Figura I.4.- Estructura 3D de diverses Cu(I)MTs	6
Figura I.5.- Valoració per CD d'apoMT-4 amb ions Cd(II)	9
Figura I.6.- Estructures dels dominis $\alpha$ MT-1 i $\alpha$ MT-3	20
Figura I.7.- Alineació ClustalW de les seqüències de MTs	26

### II. Objectius

### III. Mètodes

Figura III.1.- Esquema d'obtenció i purificació de proteïna recombinant	35
Figura III.2.- Esquema d'obtenció del cDNA de la proteïna MTC	36
Figura III.3.- a) Regió de clonatge de pGEX-4T-1 i b) vextor pGEX	37
Figura III.4.- Tall en el DNA per enzims de restricció	39
Figura III.5.- Obtenció d'un clon (vector + cDNA)	40
Figura III.6.- Esquema de la reacció en cadena de la polimerasa	41
Figura III.7.- Creixement exponencial d'un cultiu bacterià	43
Figura III.8.- Esquema del procés de purificació de la proteïna	44
Figura III.9.- Imatge de l'escala horitzontal elevada	69
Figura III.10.- Imatge d'una rata en l'escala horitzontal elevada	70
Figura III.11.- Imatge de la barra giratòria	70

### IV. Síntesi de les formes metal·lades de MTC mitjançant tècniques d'enginyeria genètica

Figura IV.1.- Seqüència del cDNA de la MTC	81
Figura IV.2.- Digestió dels plasmidis pGEX-MTC i pGEX	83
Figura IV.3.- Gel de DNA dels fragments pGEX-MTC i pGEX	83
Figura IV.4.- Gel de poliacrilamida de GST i GST-MT	85
Figura IV.5.- Gel de poliacrilamida per l'eficiència de diferents soques	86
Figura IV.6.- Gel de poliacrilamida de la purificació de MTC	88

Figura IV.7.- Espectres ESI-MS d'apoMTC	91
Figura IV.8.- Espectre de ESI-MS de la mostra corresponent a SZn2	92
Figura IV.9.- Espectres de CD de ZnMTC, apoMTC, ZnMT1 i ZnMT-4	93
Figura IV.10.- Espectre UV d'apoMTC i ZnMTC	94
Figura IV.11.- Espectres de CD de MTC i MTH	94
Figura IV.12.- Espectre de ESI-MS de SCu1	98
Figura IV.13.- Espectres de CD de la SCu1, SCu2 i SCu3	99
Figura IV.14.- Espectre UV de SCu1, SCu2 i SCu3	99
Figura IV.15.- Espectres de CD diferents síntesis en medis rics en coure	102
Figura IV.16.- Espectre d'ESI-MS de SCuZn2	102

## **V. Obtenció de les formes holoMTC per reconstitució d'apoMTC amb diferents metall**

Figura V.1.- Espectres d'absorció de la valoració d'apoMTC amb NaOH	110
Figura V.2.- Espectres electrònics de diferència d'apoMTC a diferents pHs	111
Figura V.3.- Valoració d'apoMTC amb NaOH ( $\epsilon$ en funció del pH)	111
Figura V.4.- Espectre ESI-MS de la reconstitució amb coure	112
Figura V.5.- Espectres ESI-MS de la reconstitució amb zinc	114
Figura V.6.- Espectre de CD de SZn2 i de la reconstitució amb zinc	115
Figura V.7.- Espectres ESI-MS de la reconstitució amb cadmi	118
Figura V.8.- Espectres de CD de Cd <sub>8</sub> MTC tractat amb Chelex	118
Figura V.9.- Espectres electrònics de Cd <sub>8</sub> MTC a diferents pHs	119
Figura V.10.- Grau d'alliberament del Cd <sup>2+</sup> respecte el pH	121
Figura V.11.- Determinació de Cys lliures en Cd <sub>7</sub> MTC i Zn <sub>6</sub> MTC	124

## **VI. Caracterització de les espècies metal·lades que forma MTC amb Cd(II) i Cu(I) mitjançant valoracions *in vitro***

Figura VI.1.- Espectres de masses de diverses valoracions de MTs	128
Figura VI.2.- Espectres de CD de diverses valoracions de MTs	129
Figura VI.3.- Espectres electrònics de diverses valoracions de MTs	129
Figura VI.4.- Espectres de ESI-MS de la valoració d'apoMTC amb Cd(II)	132
Figura VI.5.- Espectres de CD de la valoració d'apoMTC amb Cd(II)	133
Figura VI.6.- Espectres electrònics de la valoració d'apoMTC amb Cd(II)	134
Figura VI.7.- Espectres UV de diferència de la valoració amb Cd(II)	135

Figura VI.8.- Increment d'absorció en funció de Cd/MTC	135
Figura VI.9.- Espectres de CD i UV (D-E) de ZnMTC més Cd(II)	138
Figura VI.10.- Espectres de ESI-MS de la valoració d'apoMTC amb Cu <sup>+</sup>	142
Figura VI.11.- Espectres de CD i UV d'apoMTC més Cu <sup>+</sup>	143
Figura VI.12.- Espectres ESI-MS de ZnMTC més Cu <sup>+</sup>	146
Figura VI.13.- Espectres de CD de ZnMTC més Cu <sup>+</sup>	147
Figura VI.14.- Espectres electrònics de ZnMTC més Cu <sup>+</sup>	147
Figura VI.15.- Espectres UV de ZnMTC amb 13 i 15 equivalents de Cu <sup>+</sup>	148
Figura VI.16.- Espectres CD d'apoMTC + 9 Cu <sup>+</sup> i ZnMTC amb 12 Cu <sup>+</sup>	148
Figura VI.17.- Espectres de CD de ZnMTC més Cu <sup>+</sup> i SCu <sub>2</sub>	149

## **VII. Caracterització estructural de <sup>113</sup>CdMTC**

Figura VII.1.- Espectre ESI-MS deconvolucionat de <sup>113</sup> CdP10	154
Figura VII.2.- Comparació de les zones NH-H $\alpha$ dels espectres NOESY	156
Figura VII.3.- Espectres de <sup>113</sup> Cd directe de MTC1, MTC3 i P10	158
Figura VII.4.- Comparació dels espectres HSQC <sup>1</sup> H – <sup>113</sup> Cd	160

## **VIII. Paper dels dominis de la MT de mamífer en la resposta inflamatòria**

Figura VIII.1.- Representació de les variacions del pes dels ratolins	171
Figura VIII.2.- Aprenentatge de la prova de l'escala horitzontal	172
Figura VIII.3.- Resultats dels tests de la prova de l'escala horitzontal	173
Figura VIII.4.- Aprenentatge de la prova de la barra giratòria	174
Figura VIII.5.- Resultats dels tests de la prova de la barra giratòria	175
Figura VIII.6.- Pel·lícula autoradiogràfica del gel del RPA	176
Figura VIII.7.- Anàlisi de l'expressió gènica dels marcadors inflamatoris	176
Figura VIII.8.- Representació GFAP determinada per immunohistoquímica	178

## **IX. Discussió**

## **X. Conclusions**

## **XI. Bibliografia**



## ABREVIATURES i ACRÒNIMS

**3D:** tridimensional

**aa:** aminoàcid

**AAS:** espectroscòpia d'absorció atòmica

**CD:** dicroïsm circular

**CdMTC:** representa la proteïna MTC coordinada a Cd(II)

**cDNA:** DNA complementari (al mRNA)

**CNS:** sistema nerviós central

**COSY:** *correlation spectroscopy*

**CuMTC:** forma genèrica que indica l'espècie o conjunt d'espècies de MTC enllaçada exclusivament a Cu(I) (per exemple: Cu<sub>x</sub>MTC, Cu<sub>y</sub>MTC...)

**DEPC:** pirocarbonat de dietil

**DNA:** àcid desoxiribonucleic

**dNTP:** trifosfat de desoxinucleòtid

**dpl:** dies post lesió

**DTNB<sup>2-</sup>:** 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoat)

**DTP:** 2,2'-ditiopiridina

**DTT:** ditioneïtol

**ε:** coeficient d'extinció molar

**EDTA:** àcid etilendiaminatetraacètic

**ESI-MS:** espectrometria de masses amb ionització per electrospai

**FID:** *free induction decay*

**FPLC:** *fast-protein liquid chromatography* (cromatografia líquida d'alta resolució)

**GFAP:** proteïna glial fibrilar àcida

**GIF:** factor inhibidor del creixement

**GSH:** glutatió reduït

**GSSG:** glutatió oxidat

**GST:** glutatió S-transferasa

**HMQC:** *heteronuclear multiple quantum coherence*

**HSQC:** *heteronuclear single quantum coherence*

**ICP-AES:** espectroscòpia d'emissió atòmica amb plasma acoblat per inducció

**ID:** número d'identificació

**IPTG:** isopropil- $\beta$ -D-tio-galactòsid

**KO:** genoanul·lat (*knockout*)

**L:** lligand

**LMCT:** transferència de càrrega lligand-metall

**M:** metall

**mRNA:** RNA missatger

**MT:** metal·lotioneïna

**MTC:** metal·lotioneïna CuMT-II del cranc *Callinectes sapidus* (ID: Q9U620)

**MTP:** anió 2-piridinatiolat

**NMWL:** límit de pes molecular nominal

**NOESY:** *nuclear Overhauser effect spectroscopy*

**OD:** densitat òptica

**P10:** pèptid corresponent a l'extrem N-terminal de MTC, pèptid<sub>2-31</sub>, amb 10 cisteïnes. La seva seqüència és:

**PCGCG TSCCK GSGKC CCGST CNC TT CPSKQ**

**P11:** pèptid corresponent a l'extrem C-terminal de MTC, pèptid<sub>31-64</sub>, amb 11 cisteïnes. La seva seqüència és:

**QSCSNDGAC GSAQCCKTSC CCGADCKCSP CPMK**

**pb:** parell de bases

**PBS:** tampó fosfat en solució salina

**PCR:** reacció en cadena de la polimerasa

**PDB:** base de dades de proteïnes amb estructura tridimensional coneguda

**pKa:** logaritme decimal de la constant d'acidesa, canviat de signe ( $-\log_{10} K_a$ )

**Pwo pol:** polimerasa termoestable aïllada de *Pyrococcus woesei*

**RMN:** ressonància magnètica nuclear

**RNA:** àcid ribonucleic

**ROS:** espècies reactives d'oxigen

**RPA:** assaig de protecció de la ribonucleasa

**SDS:** dodecilsulfat de sodi

**SDS-PAGE:** electroforesi en gel de poliacrilamida amb SDS

**TC:** transferència de càrrega

**TCLM:** transferència de càrrega lligand – metall

**TNB<sup>2-</sup>:** anió 5-tio-2-nitrobenzoat



**TNF:** factor de necrosi tumoral

**TOCSY:** *total correlation spectroscopy*

**Tris:** 2-amino-2-hidroximetil-1,3-propandiol

**tRNA:** RNA de transferència

**UAB:** Universitat Autònoma de Barcelona

**UTP:** trifosfat d'uridina

**UV:** ultraviolat

**ZnMTC:** forma genèrica que indica l'espècie o conjunt d'espècies de MTC enllaçada exclusivament a Zn(II) (per exemple:  $Zn_xMTC$ ,  $Zn_yMTC$ ...)