



Universitat Autònoma  
de Barcelona

**Anàlisi comparativa de les propietats coordinants  
de MT2 i MT3 envers Zn, Cd i Cu respecte altres  
isoformes de MT de mamífer (MT1 i MT4)**

Ester Artells  
Tesi Doctoral  
Programa de Doctorat en Genètica

Dirigida per Mercè Capdevila i Sílvia Atrian  
Departament de Química  
Facultat de Ciències

Any 2011



Memòria presentada per aspirar al Grau de Doctor per Ester Artells

Vist i plau

Dra. Mercè Capdevila

Dra. Sílvia Atrian

Bellaterra, 28 d'abril del 2011



*A Consuelo, perquè sense ella no hagués arribat on he arribat.*

*A l'avi Jaume, no calen perquè.*



## AGRAÏMENTS

Ara fa quatre anys vaig entrar al despatx de la Dra. Mercè Capdevila per fer-li una consulta i en vaig sortir amb una proposta encara millor del que jo havia pensat. Mercè, et voldria agrair de tot cor, no només la teva confiança depositada, sinó també el rescat *in extremis* de la meva pròpia. En aquests anys m'has obert al món de la química, m'has aconsellat i m'has ensenyat, mostrant-me que no només ets una excel·lent directora, sinó també una gran persona.

Els meus estudis de biologia van afavorir que pogués tocar tots els camps d'aquest treball interdisciplinari. Així, vaig tenir la sort de participar activament en la clonació i producció de les "meves" proteïnes en el laboratori de la UB dirigit per la Dra. Sílvia Atrian. Sílvia, et vull donar les gràcies, per acceptar ser la codirectora d'aquest treball, per l'acolliment, l'atenció, els consells, tant personals com de treball, la dedicació i l'ensenyament que m'has donat des del primer dia. La teva forma de ser directa i incansable propicien que la feina avanci a molt bon ritme en aquest grup mixt químic-biològic.

Des del primer dia al departament de química, el Dr. Òscar Palacios va estar recolzant-me. Òscar, voldria agrair-te tot el temps i la paciència que has tingut amb mi, per ensenyar-me aquest món de la química, tant desconegut pels biòlegs. Gràcies per totes les xerrades sobre ICP i sobre Masses, i també les altres xerrades que no hi tenien res a veure. Tampoc em puc oblidar del Dr. Roger Bofill, l'altre professor de l'equip de recerca. Roger, tu també has participat a que aquests anys amb vosaltres m'hagi sentit molt a gust i estic segura que trobaré a faltar molts dels teus comentaris.

Els estudis realitzats en aquest treball han requerit la utilització d'equips en el Servei d'Anàlisi Química de la UAB. He d'agrair a tot l'equip del Servei i en especial a l'Alba i l'Ignasi l'ajuda i col·laboració en les mesures. També s'han utilitzat els Serveis Científic-Tècnics de la UB, on l'Eli i el Paco han estat molt atents i interessats en les meves mesures i utilització del laboratori, sempre apunt per donar un cop de mà o un consell.

El dia a dia en els dos laboratoris, amb els companys d'hores i fatigues, la "xente de química": Rubén, que ja has "creuat el txarco" i continues amb els teus comentaris tant àcids com encertats. Silvi i Cata, que tant bones estones i alegries m'heu donat entre DCs i cafès. Mireia, la "nova adquisició" amb les idees ben clares, ànims per una bona continuació amb un peu a cada "puesto". La "xente biòloga": la Miriam, que vas marxar físicament del laboratori però virtualment hem continuat amb els nostres cafès "skyperos" de suport moral mutu. El Freddy, tot i que jo t'havia d'ensenyar moltes coses, vas passar de ser un alumne avantatjat a un professor expert de tantes situacions. I la Maria, que vas arribar més tard i has esdevingut absolutament imprescindible.

També vull agrair l'ajuda i recolzament a tots els xics i xiques de la Unitat de Química Inorgànica de la UAB, amb un especial per al Dani, Nacho, Oriol, Joan, Gemma, Laia, Leo... i fins i tot al Fran encara que mai va posar l'aire condicionat a més de 10 graus. Des del primer dia a la unitat em va fer sentir una química més sense ser-ho. Pel que fa al Departament de Genètica de la UB, els laboratoris "colindants" i els dels pis de dalt, Montse, Noe, Gessamí, Alex, Esther, Marina, Pilar, Amanda... la llista no s'acabaria mai. Ha estat un plaer trobar amicitat i no només companys de feina en tots vosaltres.

Hem situo en el plànol més personal, la meva família que ha estat allà, com no, en tot moment. Mare, que has aguantat com una campiona els últims mesos de la redacció. Que des de sempre t'has sacrificat per els teus fills i potser mai t'hem arribat a dir el molt que t'agraïm el que has fet per nosaltres. No et vull donar només les gràcies, vull dir-te que, i per molt tòpic que sigui, ets la millor mare del món i sense tu no hagués arribat fins aquí. David, tete gran, tu i la Maryan, i també el meu nebot preferit, l'Arnau, també el Jordi, tete petit i la Sònia, el suport, comprensió i les bromes per treure ferro a les situacions, a distància i sense distància ha estat quan calia a l'ordre del dia. També vull agrair el costat que m'han fet el Pere i la Carme i les "nenes" Alba i Silvia, i la Baba, que ja et tornaré a explicar per milionèsima vegada el que estudio, perquè ja sé que encara no t'ha quedat clar. També un petit gràcies de passada, com sovint ens trobem, al Leo i la Xeli, a la Patri i l'Enriqueta.

No puc oblidar-me de la "família adoptiva", és a dir, dels meus Amics. Laura, tu ets la meva Amiga, en majúscules. La teva Amistat no té preu, les xerrades infinites, o no tant, els riures i els plors que hem compartit... no tinc prou paraules per expressar el que voldria dir-te. Només et demano que aquesta Amistat continuï a fer-se més i més forta amb els anys, i que no la perdem ara que marxo a fora. Jordi, cuida'm la meva Amiga, tu, que també ets un Amic, no sé què faria sense vosaltres. Sia, de moment no entens gaires cosetes, però m'has permès desconnectar moltíssim durant aquests últims temps. Francisco, aviat serà el teu torn, i a més de les gràcies de ser com ets, també et vull donar ànims per la teva "recta final".

En la distància, però al meu costat quan a calgut, David i Rosa, pilars indispensables per la reconstrucció. Sou la viva definició del que vol dir amistat: potser no ens veiem sovint, però si cal, sou allà. *Alejandra, quién lo iba a decir que terminaríamos teniendo esta relación, que aunque yo he desaparecido durante un tiempo, ahí estás tú, dando ánimos y apechugando con lo que sea.*

I encara més lluny, donaré les gràcies a l'inventor del ADSL, Mery y Arlencita, *pronto hará 10 años que nos conocimos y convivimos, en este tiempo nos hemos visto quizá un par de veces... ¿y qué? Cada una de nosotras sabemos de las otras dos, y este trío tiene tantos lazos entrelazados que cuando una decae, las otras dos la remontan. Niñas, os quiero un montón.*

Només un petit merci a la comunitat de *debianistes*. *Celà serait une longue liste parmi laquelle les noms de Ashgenesis, debianhadic, fran.b, ggoodluck47, mattotop, lol et Ricardo ressortent. Son support moral a été mille fois plus important que le support technique, merci à tous.*

Tampoc puc oblidar els *lyonnais*, especialment als *frères Coiffard*. *Clems, tu mérites une place dans mon cœur ainsi que ton frère, Damien, vous avez été d'une grande aide dès la première année où j'ai touché le sol français. Ne changez jamais!*

I finalment, però no menys important, Julien, *ça fera bientôt 7 ans que tu me supportes, que tu es toujours à mes côtés même si la moitié du temps, ça se passe par skype. Ta compréhension et ta tendresse ont fait changer mon "je" par un "nous" qui devient de plus en plus fort au fil du temps. Ça c'est un oui pour toujours, tu le sais.*



*«La chimie du laboratoire et la chimie du corps vivant sont soumises aux mêmes lois, il n'y a pas deux chimies. La vie n'a pas de chimie spéciale, mais si le savant dans son laboratoire et l'être vivant dans l'intimité de ses cellules effectuent l'un et l'autre des travaux chimiques, il semble bien qu'ils travaillent dans des conditions différentes et avec des outils différents.»*

**Claude Bernard (1813-1878)**



## ABREUJAMENTS I ACRÒNIMS

**Aa / aas:** Aminoàcid / aminoàcids

**A $\beta$ :** Pèptid beta-amiloide

**cDNA:** Àcid desoxiribonucleic complementari

**Cys:** Cisteïna

**DC:** Dicroïsme circular

**DNA:** Àcid desoxiribonucleic

**dNTP:** Desoxi-nucleòtid trifosfat

**Eq:** Equivalent molar

**ESI-MS:** Espectrometria de masses amb ionització per electrosprai

**FPLC:** *Fast protein liquid chromatography* (cromatografia líquida ràpida de proteïnes)

**GIF:** *Growth Inhibitory Factor* (factor inhibidor del creixement neuronal)

**His:** Histidina

**ICP-OES / ICP-AES:** Espectrometria d'emissió òptica / atòmica de plasma acoblat per inducció

**M:** Metall

**MT / MTs:** Metal·lotioneïna / metal·lotioneïnes

**UV-Vis:** Espectres d'absorció d'Ultravioleta-visible

**MRE:** *Metal response element* (element de resposta a metall)

**Pro:** Prolina

**PCR:** *Polymerase chain reaction* (reacció en cadena de la polimerasa)

## NOMENCLATURA DE LES MTs

S'anomenen **MT1**, **MT2**, **MT3** i **MT4** cadascuna de les 4 isoformes de MT de mamífer.

Segons l'organisme d'on provenen, s'indica amb una lletra minúscula al davant del nom, així s'indica **m** (*murine*), **h** (*human*), **r** (*rat*). Per exemple, **mMT2** és la isoforma MT2 de ratolí.

Per indicar un dels dominis de la proteïna, s'inclou la lletra grega corresponent,  **$\alpha$**  o  **$\beta$** , davant el nom. Per exemple,  **$\beta$ mMT2** és el domini  $\beta$  de la isoforma MT2 de ratolí.



# INDEX

<b>1. INTRODUCCIÓ .....</b>	<b>3</b>
<b>1.1 UNA MICA D'HISTÒRIA: QUÈ SÓN LES MTs?.....</b>	<b>3</b>
<b>1.2 ESTRUCTURA DELS COMPLEXOS METALL-MT I CLASSIFICACIÓ DE LES METAL-LOTIONEÏNES (MTs) ..</b>	<b>5</b>
1.2.1 Primera classificació.....	8
1.2.2 Classificació taxonòmica de les MTs.....	9
1.2.3 Classificació de les MTs segons la seva preferència metàl·lica Zn-Cu (divalents/monovalents) ..	10
<b>1.3 FUNCIONS DE LES METAL-LOTIONEÏNES .....</b>	<b>13</b>
1.3.6 Destoxicació de metalls pesants.....	14
1.3.1 Homeòstasi de metalls intracel·lulars.....	15
1.3.2 Antioxidants.....	15
1.3.3 Xaperones.....	16
1.3.4 Paper antiapoptòtic.....	17
1.3.5 Protecció i regeneració.....	17
<b>1.4 LES METAL-LOTIONEÏNES DE MAMÍFER.....</b>	<b>19</b>
1.4.1 Les MTs de mamífer: isoformes i patrons de seqüència .....	19
1.4.2 Patrons d'expressió tissulars i temporals. Preferències d'inducció gènica .....	21
1.4.3 Preferències d'enllaç a metalls pesants en les MTs de mamífer .....	22
1.4.3 La isoforma MT2 de mamífer .....	24
1.4.3.1 GENÈTICA I FISIOLOGIA, CARACTERÍSTIQUES DIFERENCIALS DE MT2 RESPECTE LA ISOFORMA MÉS PROPERA: MT1 .....	24
1.4.3.2 CARACTERÍSTIQUES ESTRUCTURALS I DELS COMPLEXOS METÀL·LICS DE MT2.....	26
1.4.4 La isoforma MT3 de mamífer .....	29
1.4.4.1 GENÈTICA I FISIOLOGIA, CARACTERÍSTIQUES DIFERENCIALS DE MT3 .....	29
1.4.4.2 CARACTERÍSTIQUES ESTRUCTURALS I DELS COMPLEXOS METÀL·LICS DE MT3.....	32
<b>2. OBJECTIUS .....</b>	<b>37</b>
<b>3. RESULTATS.....</b>	<b>41</b>
<b>3.1 CLONACIÓ DELS cDNAs I SÍNTESI DE PROTEÏNES RECOMBINANTS.....</b>	<b>43</b>
3.1.1 Amplificació de les regions codificants per PCR .....	44
3.1.2 Clonació, transformació i seqüenciació .....	46
3.1.3 Produccions a escala analítica .....	62
<b>3.2 ESTUDI DE LA COORDINACIÓ METÀL·LICA PER PART DE LA MT2 DE RATOLÍ.....</b>	<b>65</b>
3.2.1 Caracterització dels complexos M-mMT2 (M= Zn(II), Cd(II) i Cu(I)) biosintetitzats .....	66
3.2.1.1 mMT2 .....	66
3.2.1.2 $\beta$ mMT2 .....	72
3.2.1.3 $\alpha$ mMT2 .....	75
3.2.1.4 VARIACIÓ AMB EL TEMPS DELS COMPLEXOS Cd-mMT2, Cd- $\beta$ mMT2 i Cd- $\alpha$ mMT2.....	78
3.2.2 Caracterització dels complexos M-mMT2 (M=Zn(II), Cd(II) o Cu(I)) formats in vitro.....	81
3.2.2.1 VALORACIÓ DE Zn <sub>7</sub> -mMT2, Zn <sub>3</sub> - $\beta$ mMT2 I Zn <sub>4</sub> - $\alpha$ mMT2 AMB Cd(II).....	81
3.2.2.3 VALORACIÓ DE Zn <sub>7</sub> -mMT2, Zn <sub>3</sub> - $\beta$ mMT2 I Zn <sub>4</sub> - $\alpha$ mMT2 AMB Cu(I).....	87
3.2.2.4 ACIDIFICACIÓ I RENEUTRALITZACIÓ DELS COMPLEXOS Cd-mMT2, Cd- $\beta$ mMT2 i Cd- $\alpha$ mMT2 .....	95
<b>3.3 ESTUDI DE LA COORDINACIÓ METÀL·LICA PER PART DE LA MT3 DE RATOLÍ.....</b>	<b>101</b>
3.3.1 Caracterització dels complexos M-mMT3 (M= Zn(II), Cd(II) i Cu(I)) biosintetitzats .....	102
3.3.1.1 mMT3 .....	102
3.3.1.2 $\beta$ mMT3 .....	106
3.3.1.3 $\alpha$ mMT3 .....	109
3.3.2.1 VARIACIÓ AMB EL TEMPS DELS COMPLEXOS Cd-mMT3, Cd- $\beta$ mMT3 i Cd- $\alpha$ mMT3.....	112
3.3.2 Caracterització dels complexos M-mMT3 (M=Zn(II), Cd(II) o Cu(I)) formats in vitro.....	117

3.3.2.1 VALORACIÓ DE Zn-mMT3, Zn-βmMT3 I Zn <sub>4</sub> -αmMT3 AMB Cd(II) .....	117
3.3.2.2 VALORACIÓ DE Zn-mMT3, Zn-βmMT3 I Zn <sub>4</sub> -αmMT3 AMB Cu(I) .....	123
3.3.2.3 ACIDIFICACIÓ I RENEUTRALITZACIÓ DELS COMPLEXOS Cd-mMT3, Cd-βmMT3 I Cd-αmMT3 .....	135
<b>4. DISCUSSIÓ .....</b>	<b>143</b>
<b>4.1 CLASSIFICACIÓ DE mMT2 I mMT3 RESPECTE EL SEU COMPORAMENT ENVERS Zn(II), Cd(II) I Cu(I) .....</b>	<b>144</b>
4.1.1 Preferències de coordinació metàl·lica de mMT2 .....	144
4.1.1.1 PROPIETATS COORDINANTS DE mMT2 ENVERS Zn(II) .....	144
4.1.1.2 PROPIETATS COORDINANTS DE mMT2 ENVERS Cd(II) .....	146
4.1.1.3 PROPIETATS COORDINANTS DE mMT2 ENVERS Cu(I) .....	149
4.1.2 Preferències de coordinació metàl·lica de mMT3 .....	151
4.1.2.1 PROPIETATS COORDINANTS DE mMT3 ENVERS Zn(II) .....	151
4.1.2.2 PROPIETATS COORDINANTS DE mMT3 ENVERS Cd(II) .....	152
4.1.2.3 PROPIETATS COORDINANTS DE mMT3 ENVERS Cu(I) .....	153
4.1.3 El conjunt paradigmàtic MT1/MT2: igual o diferents? .....	154
4.1.4 La MT del Sistema Nerviós: mMT3 .....	157
<b>4.2 CONSIDERACIÓ DE LES 4 MTs DE MAMÍFER EN LA CLASSIFICACIÓ GLOBAL DE LES MTS COM A Zn- O Cu-TIONEÏNES .....</b>	<b>161</b>
4.2.1 Les 4 MT de mamífer: ordenació respecte la seva preferència metàl·lica i possible significat biològic. ....	161
4.2.2 El sistema MT de mamífer respecte la resta de MTs: forces de diferenciació/selecció .....	163
<b>5. CONCLUSIONS .....</b>	<b>169</b>
<b>6. MATERIALS I MÈTODES .....</b>	<b>173</b>
<b>6.1 ENGINYERIA GENÈTICA .....</b>	<b>174</b>
6.1.1 Síntesi de segments de DNA per PCR .....	174
6.1.2 Clonació i transformació bacterianes. Seqüenciació del DNA. ....	177
6.1.2.1 EL SISTEMA D'EXPRESSION pGEX .....	177
6.1.2.2 PREPARACIÓ DEL VECTOR I L'INSERT .....	178
6.1.2.3 INSERCIÓ DE LA SEQÜÈNCIA EN EL VECTOR (CLONACIÓ) .....	181
6.1.2.4 OBTENCIÓ DE COLÒNIES BACTERIANES POSITIVES .....	181
6.1.2.5 SEQÜENCIACIÓ I TRANSFORMACIÓ EN LA SOCA DE PRODUCCIÓ FINAL .....	184
6.1.3 Síntesi i purificació de proteïnes recombinants .....	185
6.1.3.1 TEST DE PRODUCCIÓ. SÍNTESI A ESCALA ANALÍTICA .....	185
6.1.3.1 PRODUCCIÓ I PURIFICACIÓ DE PROTEÏNES RECOMBINANTS .....	187
6.1.3.2 FPLC: <i>FAST PROTEIN LIQUID CHROMATOGRAPHY</i> .....	189
6.1.4 Solucions utilitzades .....	191
<b>6.2 QUÍMICA DE COORDINACIÓ .....</b>	<b>197</b>
6.2.1 Mètodes espectromètrics .....	197
6.2.1.1 ICP-OES ( <i>INDUCTIVELY COUPLED PLASMA – OPTICAL EMISSION SPECTROMETRY</i> ) .....	197
6.2.1.2 ESI-MS-TOF ( <i>ELECTROSPRY IONIZATION – MASS SPECTROMETRY – TIME OF FLY</i> ) .....	200
6.2.2 Mètodes espectroscòpics .....	203
6.2.2.1 DC ( <i>CIRCULAR DICHROISM</i> ) .....	203
6.2.2.2 UV-VIS ( <i>ULTRAVIOLET-VISIBLE</i> ) .....	205
6.2.3 Utilització del DC i del UV-Vis en l'estudi de les MTs .....	206
6.2.3.1 VALORACIONS DE LES FORMES Zn-MT AMB Cd(II) I Cu(I) .....	206
6.2.3.2 ACIDIFICACIÓ I RENEUTRALITZACIÓ DE LES FORMES Cd-MT .....	207
6.2.3.3 EVOLUCIÓ AMB EL TEMPS .....	208
<b>7. BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>211</b>
<b>ANNEX: .....</b>	<b>223</b>

# RELACIÓ DE FIGURES

## 1. INTRODUCCIÓ

### 1.1 Una mica d'història: què són les MTs?

### 1.2 Estructura dels complexos metall-MT i classificació de les metal·lotioneïnes (MTs)

Figura 1: Representació de l'estructura tridimensional d'algunes metal·lotioneïnes. 6

### 1.3 Funcions de les metal·lotioneïnes

Figura 2: Funcions de les MTs de mamífer a diferents nivells. 13

Figura 3: Mecanisme d'activació de l'expressió del gen de MT. 14

### 1.4 Les metal·lotioneïnes de mamífer

Figura 4: Esquema del *clúster* de les MTs de mamífer. 19

Figura 5: Model de l'evolució genètica de les MTs. 20

Figura 6: Alineament de les seqüències de les 4 isoformes de MT de ratolí. 20

Figura 7: Estructura tridimensional de la isoforma MT2 de rata. 27

Figura 8: Clústers metàl·lics formats per metalls divalents en les MTs de mamífer. 27

Figura 9: Estructura proposada per als clúster metàl·lics en MT2 i MT3. 32

Figura 10: Estructura tridimensional de  $\alpha$ MT3. Superposició dels dominis  $\alpha$  de MT3 i MT2. 33

## 2. OBJECTIUS

## 3. RESULTATS

Figura 11: Esquema general de la metodologia d'estudi duta a terme per a cada MT. 42

### 3.1 Clonació dels cDNAs i síntesi de proteïnes recombinants

Figura 12: Procés per obtenir les metal·lotioneïnes recombinants. 43

Figura 13: *Primers* per a les PCR. 44

Figura 14: Posició dels *primers* per la PCR en el cDNA de mMT2. 45

Figura 15: Seqüència codificant de la proteïna per a la producció de mMT2. 48

Figura 16: Seqüència codificant de la proteïna per a la producció de mMT3. 49

Figura 17: Seqüència de les proteïnes recombinants mMT2 i mMT3. 49

### 3.2 Estudi de la coordinació metàl·lica per part de la MT2 de ratolí

Figura 18: Espectres d'ESI-MS Zn-mMT2. 66

Figura 19: Comparació dels espectres de DC de Zn-mMT2. 68

Figura 20: Espectres de ESI-MS de Cd-mMT2. 69

Figura 21: Comparació dels espectres de DC de Cd-mMT2. 69

Figura 22: Espectres d'ESI-MS de Cu-mMT2 a oxigenació normal. 69

Figura 23: Espectres d'ESI-MS de Cu-mMT2 a baixa oxigenació. 71

Figura 24: Comparació dels espectres de DC de Cu-mMT2. 72

Figura 25: Espectre d'ESI-MS de Zn- $\beta$ mMT2. 72

Figura 26: Espectres d'ESI-MS de Cd- $\beta$ mMT2. 74

Figura 27: Comparació dels espectres de DC de Cd- $\beta$ mMT2 i de Cu- $\beta$ mMT2. 75

Figura 28: Espectres d'ESI-MS de Cu- $\beta$ mMT2. 75

Figura 29: Espectre d'ESI-MS de Zn- $\alpha$ mMT2. 76

Figura 30: Espectres d'ESI-MS Cd- $\alpha$ mMT2. Comparació dels espectres de DC. 76

Figura 31: Evolució dels espectres de DC de Cd-mMT2. 78

Figura 32: Evolució dels espectres de DC de Cd- $\beta$ mMT2. Comparació dels espectres de DC. 79

Figura 33: Evolució dels espectres de DC de Cd- $\alpha$ mMT2. 79

Figura 34: Gràfica d'absorció d'UV-Vis a 250 nm de Zn-mMT2 en funció dels equivalents de Cd(II) afegits. Comparació dels espectres de DC de Cd-mMT2 biosintetitzat amb els obtinguts *in vitro*. 81

Figura 35: Comparació dels espectres de DC de Cd- $\beta$ mMT2 biosintetitzat amb els obtinguts *in vitro*. 83

Figura 36: Comparació dels espectres de DC de Cd- $\alpha$ mMT2 biosintetitzat amb els obtinguts *in vitro*. 85

Figura 37: Espectres d'ESI-MS després de l'addició de Cu(I) a Zn <sub>7</sub> -mMT2.	87
Figura 38: Comparació dels espectres de DC de Cu-mMT2 biosintetitzat amb els obtinguts <i>in vitro</i> .	87
Figura 39: Comparació dels espectres de DC de Cu-βmMT2 biosintetitzat amb els obtinguts <i>in vitro</i> .	91
Figura 40: Comparació dels espectres de DC de Cu-αmMT2 biosintetitzat amb els obtingudes <i>in vitro</i> .	93
Figura 41: Comparació dels espectres de DC de Cd-mMT2 en el procés d'acidificar i reneutralitzar. Gràfica d'absorció d'UV-Vis a 250 nm en funció del pH del medi.	95
Figura 42: Comparació dels espectres de DC de Cd-βmMT2 en el procés d'acidificar i reneutralitzar. Gràfica d'absorció d'UV-Vis a 250 nm en funció del pH del medi.	97
Figura 43: A: Comparació dels espectres de DC de Cd-αmMT2 en el procés d'acidificar i reneutralitzar. Gràfica d'absorció d'UV-Vis a 250 nm en funció del pH del medi.	99

### 3.3 Estudi de la coordinació metàl·lica per part de la MT3 de ratolí

Figura 44: Espectres d'ESI-MS de Zn-mMT3.	102
Figura 45: Comparació dels espectres de DC de Zn-mMT3.	104
Figura 46: Comparació dels espectres de DC de diferents biosíntesis de Zn-mMT3.	104
Figura 47: Espectre d'ESI-MS de Cd-mMT3. Comparació dels espectres de DC.	105
Figura 48: Espectres d'ESI-MS de Cu-mMT3. Comparació dels espectres de DC.	106
Figura 49: Espectre d'ESI-MS de Zn-βmMT3.	106
Figura 50: Espectres d'ESI-MS de Cd-βmMT3.	108
Figura 51: Comparació dels espectres de DC de Cu-βmMT3.	108
Figura 52: Espectres d'ESI-MS de Cu-βmMT3.	109
Figura 53: Comparació dels espectres de DC de Cu-βmMT3.	109
Figura 54: Espectre d'ESI-MS de Zn-αmMT3.	109
Figura 55: Espectres d'ESI-MS de Cd-αmMT3. Comparació dels espectres de DC.	110
Figura 56: Espectre d'ESI-MS de Cu-αmMT3. Comparació dels espectres de DC.	112
Figura 57: Evolució dels espectres de DC de Cd-mMT3.	112
Figura 58: Comparació de l'evolució dels espectres de DC de Cd-mMT3.	113
Figura 59: Evolució dels espectres de DC de Cd-βmMT3. Comparació de l'evolució dels espectres de DC.	113
Figura 60: Comparació de l'evolució dels espectres de DC de Cd-βmMT3.	114
Figura 61: Evolució dels espectres de DC de Cd-αmMT3. Comparació dels espectres de DC.	114
Figura 62: Comparació de l'evolució dels espectres de DC de Cd-αmMT3.	115
Figura 63: Comparació dels espectres de DC de Cd-mMT3 biosintetitzat amb els obtinguts <i>in vitro</i> .	117
Figura 64: Comparació dels espectres de DC de Cd-βmMT3 biosintetitzat amb els obtinguts <i>in vitro</i> .	119
Figura 65: Comparació de l'evolució dels espectres de DC de Cd-βmMT3 biosintetitzat amb els obtinguts <i>in vitro</i> .	119
Figura 66: Comparació dels espectres de DC de Cd-αmMT3 biosintetitzat amb els obtinguts <i>in vitro</i> .	121
Figura 67: Comparació dels espectres de DC de Cu-mMT3 biosintetitzas amb els obtinguts <i>in vitro</i> .	123
Figura 68: Comparació dels espectres de DC de Cu-βmMT3 biosintetitzas amb els obtinguts <i>in vitro</i> .	127
Figura 69: Comparació dels espectres de DC de Cu-αmMT3 biosintetitzas amb els obtinguts <i>in vitro</i> .	131
Figura 70: Comparació dels espectres de DC de Cd-mMT3 en el procés d'acidificar i reneutralitzar. Gràfica d'absorció d'UV-Vis en funció del pH del medi.	135
Figura 71: Comparació dels espectres de DC de Cd-βmMT3 en el procés d'acidificar i reneutralitzar. Gràfica d'absorció d'UV-Vis en funció del pH del medi.	137
Figura 72: Comparació dels espectres de DC de Cd-αmMT3 en el procés d'acidificar i reneutralitzar.	139
Figura 73: Comparació dels espectres de DC de les dues fraccions de la biosíntesi de Cd-αmMT3 en el procés d'acidificar i reneutralitzar.	139

## 4. DISCUSSIÓ

### 4.1 Classificació de mMT2 i mMT3 respecte el seu comportament envers Zn(II), Cd(II) i Cu(I)

Figura 74: Comparació de l'espectre de DC de Zn-mMT2 i una Zn-MT típica. Comparació dels espectres de DC de Zn-mMT2, Zn-βmMT2 i Zn-αmMT2.	145
Figura 75: Comparació dels espectres de DC de Zn-mMT2 i Zn-ckMT1.	145
Figura 76: Comparació dels espectres de DC de Cd-mMT2, Cd-αmMT2 i Cd-βmMT2.	146
Figura 77: Comparació dels espectres de DC de Cd-βckMT1, Cd-βmMT1 i Cd-βmMT2.	147
Figura 78: Comparació dels espectres de DC de Cu-mMT2 i Cu-mMT4.	149



Figura 79: Comparació dels espectres de DC de Cu- $\beta$ mMT2 i Cu- $\beta$ mMT4.	150
Figura 80: Comparació dels espectres de DC de Zn- $\beta$ mMT3, Zn- $\beta$ ckMT1 i Zn- $\beta$ mMT2. Comparació dels espectres de Zn-mMT3, Zn- $\beta$ mMT3 i Zn- $\alpha$ mMT3.	152
Figura 81: Comparació dels espectres de DC de Cu-mMT3 i Cu-mMT1.	153
Figura 82: Comparació dels espectres de DC de Zn-mMT1 i Zn-mMT2.	155
Figura 83: Comparació dels espectres de DC de Zn-mMT3 Cd-mMT3.	158

#### **4.2 Consideració de les 4 MTs de mamífer en la classificació global de les MTs com a Zn- o Cu-tioneïnes**

Figura 84: Ordenació de les MTs de Zn-tioneïna genuïna a Cu-tioneïna genuïna.	165
---	-----

### **5. CONCLUSIONS**

### **6. MATERIALS I MÈTODES**

#### **6.1 Enginyeria genètica**

Figura 85: Esquema del cicle de PCR.	176
Figura 86: Gel d'agarosa.	177
Figura 87: Vector PGEX-4T-1.	178
Figura 88: Seqüències de reconeixement i punts de tall dels enzims de restricció.	179
Figura 89: Procés de digestió i desfosforil·lació anteriors a la clonació de l'insert en el vector.	180
Figura 90: Gel d'agarosa d'una anàlisi de restricció.	184
Figura 91: Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS.	187
Figura 92: Gel de poliacrilamida-SDS.	187
Figura 93: Equip de FPLC utilitzat per a la purificació de proteïnes.	190
Figura 94: Captura de pantalla de la gràfica indicada per l'ordinador acoblat al FPLC.	191

#### **6.2 Química de coordinació**

Figura 95: Flama d'argó de l'atomitzador.	198
Figura 96: Ionització per electroesprai (ESI).	201
Figura 97: Generació de la llum polaritzada en un pla.	204

### **7. BIBLIOGRAFIA**

### **ANNEX**



# RELACIÓ DE TAULES

## 1. INTRODUCCIÓ

### 1.1 Una mica d'història: què són les MTs?

### 1.2 Estructura dels complexos metall-MT i classificació de les metal·lotioneïnes (MTs)

Taula 1: Complexos metall-MT d'estructura tridimensional inclosa en el *Protein Data Bank* (PDB). 6

Taula 2: Classificació de les MTs segons Binz i Kägi. 9

### 1.3 Funcions de les metal·lotioneïnes

### 1.4 Les metal·lotioneïnes de mamífer

## 2. OBJECTIUS

## 3. RESULTATS

### 3.1 Clonació dels cDNAs i síntesi de proteïnes recombinants

Taula 3: Gels d'agarosa per a cDNAs de mMT2. 45

Taula 4: Gels d'agarosa per a cDNAs de mMT3. 46

Taula 5: Clonació i transformació bacterianes per a mMT2. 47

Taula 6: Clonació i transformació bacterianes per a mMT3. 48

Taula 7: Gel de poliacrilamida-SDS per a mMT2. 62

Taula 8: Gel de poliacrilamida-SDS per a mMT3. 62

### 3.2 Estudi de la coordinació metàl·lica per part de la MT2 de ratolí

Taula 9: Caracterització de les produccions de mMT2 en medis rics en Zn(II) i Cd(II). 67

Taula 10: Caracterització de les produccions de la mMT2 en medis rics en Cu(II). 70

Taula 11: Caracterització de les produccions de  $\beta$ mMT2 en medis rics en Zn(II), Cd(II) i Cu(II). 73

Taula 12: Caracterització de les produccions de  $\alpha$ mMT2 en medis rics en Zn(II), Cd(II) i Cu(II). 77

### 3.2 Estudi de la coordinació metàl·lica per part de la MT3 de ratolí

Taula 13: Caracterització de les produccions de mMT3 en medis rics en Zn(II), Cd(II) i Cu(II). 103

Taula 14: Caracterització de les produccions de  $\beta$ mMT3 en medis rics en Zn(II), Cd(II) i Cu(II). 107

Taula 15: Caracterització de les produccions de  $\alpha$ mMT3 en medis rics en Zn(II), Cd(II) i Cu(II). 111

## 4. DISCUSSIÓ

### 4.1 Classificació de mMT2 i mMT3 respecte el seu comportament envers Zn(II), Cd(II) i Cu(I)

Taula 16: Taula-resum de les diferències entre les isoformes mMT1 i mMT2. 157

### 4.2 Consideració de les 4 MT2 de mamífer en la classificació global de les MTs com a Zn- o Cu- tioneïnes

Taula 17: Resum de les característiques de les 4 MTs de mamífer. 162

## 5. CONCLUSIONS

## 6. MATERIAL I MÈTODES

### 6.1 Enginyeria genètica

Taula 18: Condicions de PCR. 175

### 6.2 Química de coordinació

Taula 19: Límits de detecció i longitud d'ona del ICP-OES. 199

Taula 20: Rectes patró normal i àcida del ICP-OES. 200

## **7. BIBLIOGRAFIA**

### **ANNEX**

Taula 21: Preparació de les rectes a mesurar.

224

# RELACIÓ DE LÀMINES

## 1. INTRODUCCIÓ

### 1.1 Una mica d'història: què són les MTs?

### 1.2 Estructura dels complexos metall-MT i classificació de les metal·lotioneïnes (MTs)

### 1.3 Funcions de les metal·lotioneïnes

### 1.4 Les metal·lotioneïnes de mamífer

## 2. OBJECTIUS

## 3. RESULTATS

### 3.1 Clonació dels cDNAs i síntesi de proteïnes recombinants

Làmina 1: Seqüenciació de mMT2.	50
Làmina 2: Seqüenciació de mMT2 en sentit invers.	51
Làmina 3: Seqüenciació de $\beta$ mMT2.	52
Làmina 4: Seqüenciació de $\beta$ mMT2 en sentit invers.	53
Làmina 5: Seqüenciació de $\alpha$ mMT2.	54
Làmina 6: Seqüenciació de $\alpha$ mMT2 en sentit invers.	55
Làmina 7: Seqüenciació de mMT3.	56
Làmina 8: Seqüenciació de mMT3 en sentit invers.	57
Làmina 9: Seqüenciació de $\beta$ mMT3.	58
Làmina 10: Seqüenciació de $\beta$ mMT3 en sentit invers.	59
Làmina 11: Seqüenciació de $\alpha$ mMT3.	60
Làmina 12: Seqüenciació de $\alpha$ mMT3 en sentit invers.	61

### 3.2 Estudi de la coordinació metàl·lica per part de la MT2 de ratolí

Làmina 13: Valoració de Zn-mMT2 amb Cd(II).	80
Làmina 14: Valoració de Zn- $\beta$ mMT2 amb Cd(II).	82
Làmina 15: Valoració de Zn- $\alpha$ mMT2 amb Cd(II).	84
Làmina 16: Valoració de Zn-mMT2 amb Cu(I).	86 / 88-89
Làmina 17: Valoració de Zn- $\beta$ mMT2 amb Cu(I).	90
Làmina 18: Valoració de Zn- $\alpha$ mMT2 amb Cu(I).	92
Làmina 19: Acidificació i reneutralització de Cd-mMT2.	94
Làmina 20: Acidificació i reneutralització de Cd- $\beta$ mMT2.	96
Làmina 21: Acidificació i reneutralització de Cd- $\alpha$ mMT2.	98

### 3.2 Estudi de la coordinació metàl·lica per part de la MT3 de ratolí

Làmina 22: Valoració de Zn-mMT3 amb Cd(II).	116
Làmina 23: Valoració de Zn- $\beta$ mMT3 amb Cd(II).	118
Làmina 24: Valoració de Zn- $\alpha$ mMT3 amb Cd(II).	120
Làmina 25: Valoració de Zn-mMT3 amb Cu(I).	122 / 124-125
Làmina 26: Valoració de Zn- $\beta$ mMT3 amb Cu(I).	126 / 128-129
Làmina 27: Valoració de Zn- $\alpha$ mMT3 amb Cu(I).	130 / 132-133
Làmina 28: Acidificació i reneutralització de Cd-mMT3.	134
Làmina 29: Acidificació i reneutralització de Cd- $\beta$ mMT3.	136
Làmina 30: Acidificació i reneutralització de Cd- $\alpha$ mMT3.	138 / 140

## **4. DISCUSSIÓ**

### **4.1 Classificació de mMT2 i mMT3 respecte el seu comportament envers Zn(II), Cd(II) i Cu(I)**

### **4.2 Consideració de les 4 MTs de mamífer en la classificació global de les MTs com a Zn- o Cu-tioneïnes**

## **5. CONCLUSIONS**

## **6. MATERIALS I MÈTODES**

### **6.1 Enginyeria genètica**

### **6.2 Química de coordinació**

## **7. BIBLIOGRAFIA**

### **ANNEX**

Rectes de regressió per al sofre.	225
Rectes de regressió per al zinc.	226
Rectes de regressió per al cadmi.	227
Rectes de regressió per al coure.	228

# **1. INTRODUCCIÓ**





## 1. INTRODUCCIÓ

### 1.1 UNA MICA D'HISTÒRIA: QUÈ SÓN LES MTs?

Margoshes i Vallee, l'any 1957, van injectar Cd(II) a cavalls i, en analitzar els extractes de còrtex renal, van trobar-hi unes proteïnes de baix pes molecular que contenien zinc, cadmi i sofre. Les van anomenar metal·lotioneïnes (MTs) a causa del seu elevat contingut en metall i residus de cisteïna<sup>[1-2]</sup>. No va ser fins 20 anys més tard quan es va conèixer la seva seqüència aminoacídica<sup>[3]</sup>. Pocs grups estudiaven aquestes proteïnes en aquella època, així, el primer congrés internacional de MTs es realitzà el 1978. No va ser fins al 1988 que es va detectar la MT3 en cervell de mamífer<sup>[4]</sup>, que en un primer moment es va anomenar GIF (*Growth Inhibitory Factor*) i uns anys més tard es va classificar com a membre de la família de les MTs<sup>[5-6]</sup>. Amb aquesta nova isoforma i el descobriment de la MT4 també de mamífer<sup>[7]</sup>, comença un creixement exponencial en l'estudi d'aquestes proteïnes en tot tipus d'organismes. En l'actualitat es compten quasi bé 12000 articles publicats d'estudis sobre les MTs de tots els organismes<sup>[8]</sup>.

Les MTs són presents en la major part d'organismes vius, tant en procariotes com en eucariotes. S'han trobat MTs en organismes unicel·lulars: cianobacteris, llevats, protozous i micobacteris<sup>[9]</sup> i en pluricel·lulars: vertebrats, invertebrats i plantes<sup>[10]</sup>. Actualment, en les bases de dades internacionals es troben descrites 1153 MTs, repartides en 389 famílies<sup>[11]</sup>, dins un total de 2593 seqüències de MT i proteïnes MT-*like* publicades<sup>[12]</sup>. Les característiques comunes de les MTs són les següents<sup>[13-14]</sup>:

- Baix pes molecular (2-12 kDa).
- Alt contingut de cisteïna (Cys), aproximadament un 30% del total d'aminoàcids.
- Gran capacitat de coordinació a ions metàl·lics.
- Baix nombre de residus hidrofòbics.
- Absència, en la majoria, de residus aromàtics.
- Motius cisteïnics característics: X-Cys-X-Cys-X, X-Cys-Cys-X o X-Cys-Cys-Cys-X (essent X un aminoàcid diferent a la cisteïna).

L'elevat contingut en Cys, característica principal d'aquestes proteïnes, és el responsable del seu enllaç a ions dels metalls pesants. Aquestes proteïnes coordinen naturalment Zn(II) i Cu(I), metalls essencials en els éssers vius, però també poden coordinar metalls tòxics, com Cd(II), Hg(II), Ag(I) o Pb(II)<sup>[15]</sup>.

En els estudis tradicionals de les MTs de mamífer, aquestes s'obtenien mitjançant la inducció de la seva síntesi en l'organisme i el seu posterior aïllament i purificació a partir dels òrgans on hi ha una major acumulació (ronyó i fetge). La producció de les MTs era induïda per injecció de solucions de sals de metalls pesants o de certes hormones, agents radicals oxidants o exposició a UV<sup>[16]</sup>, però aquest mètode presenta l'inconvenient, per una banda, d'un procés de purificació llarg i difícil i per l'altra, que les proteïnes obtingudes no tenen bons nivells de concentració i puresa. A més, aquest sistema no és aplicable a tots els organismes, i condiona l'ió metàl·lic amb el qual s'aïlla la MT en qüestió.

En la cerca de sistemes alternatius, una possibilitat utilitzada és la síntesi química de les cadenes peptídiques en suport sòlid. Aquest mètode, menys utilitzat que l'anterior, ha permès la caracterització de MTs de fongs<sup>[17-18]</sup>, de crustaci<sup>[19]</sup> i els dominis per separat de certes MTs de mamífer<sup>[17-18, 20-24]</sup>. La síntesi química presenta nombroses limitacions importants, com per exemple la dificultat de sintetitzar cadenes peptídiques llargues, i la necessitat de protegir els residus cisteínics per tal que no s'oxidin durant el procés.

Una millor alternativa ha estat la producció de proteïnes mitjançant les tècniques de DNA recombinant. Aquesta metodologia es basa en la transformació d'un bacteri amb un plasmidi preparat amb tota la informació necessària per a la síntesi de la MT desitjada, tal i com s'explicarà en el capítol 6 d'aquesta Tesi. D'aquesta manera s'aconsegueixen obtenir quantitats elevades de MTs recombinants, senceres o dels seus dominis per separat, d'elevada puresa i de propietats idèntiques a les MTs natives<sup>[24-26]</sup>.

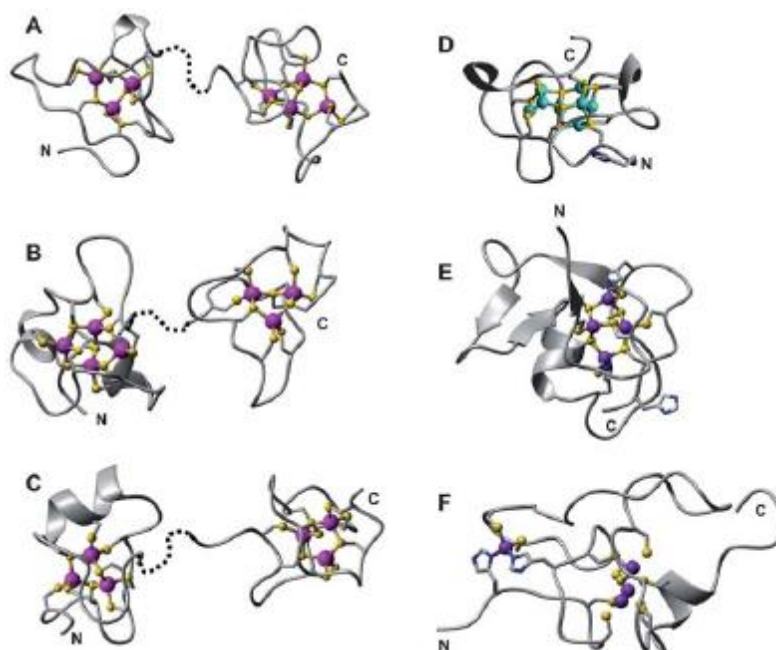
## 1.2 ESTRUCTURA DELS COMPLEXOS METALL-MT I CLASSIFICACIÓ DE LES METAL·LOTIONEÏNES (MTs)

La majoria de MTs, en absència de metall (forma apo) presenten una estructura desordenada o *random coil*<sup>[27]</sup> a excepció de certes MTs bacterianes<sup>[28]</sup>. Així doncs, la coordinació dels ions metàl·lics via enllaços M-SCys (o M-NHis), és el que determina el plegament de la MT. La formació de complexos M-MT estables només s'aconseguirà quan la cadena polipeptídica es replegui de manera que els àtoms de S<sub>Cys</sub> quedin disposats en una situació espacial determinada que pugui satisfer les geometries de coordinació específiques dels ions metàl·lics enllaçats, sense produir tensions excessives en la conformació de la proteïna<sup>[29]</sup>.

S'han determinat dos tipus de clústers metàl·lics en la unió de Zn(II) i Cd(II) a MTs, ambdós metalls imposant una coordinació tetraèdrica<sup>[15]</sup>. Un primer clúster metàl·lic és M<sub>3</sub>Cys<sub>9</sub>, amb tres S<sub>Cys</sub> pontals i sis de terminals, formant així un anell de sis membres. Aquests tipus d'anell s'observa en el domini β de les MTs de mamífer, en un dels dominis de l'eriçó de mar i en les MTs de crustaci (Figura 1). L'altre tipus de clúster metàl·lic és M<sub>4</sub>Cys<sub>11</sub>, característic del domini α de les MTs de mamífer i en l'eriçó de mar. Aquesta estructura és la fusió de dos anells de sis membres com els anteriors, que comparteixen dos enllaços, donant una estructura amb cinc S<sub>Cys</sub> pontals i sis de terminals<sup>[8]</sup>.

Pel que fa a la unió del Cu(I) amb les MTs, només es coneix l'estructura d'un clúster, en la MT de llevat Cup1<sup>[30]</sup>. El clúster M<sub>8</sub>Cys<sub>10</sub> conté deu Cys que s'uneixen cadascuna a 2 o 3 ions de Cu(I), però no hi ha residus S<sub>Cys</sub> terminals. Sis dels Cu(I) presenten una geometria de coordinació plano-trigonal, mentre els altres dos s'enllacen seguint una geometria lineal (digonal).

Degut a la flexibilitat de la cadena polipeptídica i a la fluctuació dinàmica dels ions metàl·lics coordinats a aquesta, només s'han resolt fins al moment poques estructures tridimensionals de MT mitjançant tècniques de Ressonància Magnètica Nuclear (NMR) o per difracció de raigs X (Taula 1).



**Figura 1:** Representació de l'estructura tridimensional d'algunes metal·lotioneïnes. Els àtoms de sofre es mostren en color groc, el cadmi en color magenta, el zinc en color violeta, el coure en cian i el nitrogen en blau. A: Cd<sub>7</sub>-MT2 de fetge de rata (*Rattus norvegicus*). B: Cd<sub>7</sub>-MTA d'eriçó de mar (*Strongylocentrotus purpureus*). C: Cd<sub>6</sub>-MT1 de cranc blau (*Callinectes sapidus*). D: Cu<sub>8</sub>-Cup1 de llevat (*Saccharomyces cerevisiae*). E: Zn<sub>4</sub>-SmtA de cianobacteri (*Synechococcus* PCC 7942). F: Domini II de blat (*Triticum aestivum*) amb el clúster Zn<sub>3</sub>Cys<sub>9</sub> i el lloc isolat Cys<sub>2</sub>His<sub>2</sub>.<sup>[8]</sup>

Metal·lotioneïna	Metalls units	Tècnica experimental
MT2 de rata ( <i>Rattus norvegicus</i> )	Cd <sub>3</sub> (β); Cd <sub>4</sub> (α); Cd <sub>5</sub> Zn <sub>2</sub> (sencera)	NMR, raigs X <sup>[31-32]</sup>
MT1 de ratolí ( <i>Mus musculus</i> )	Cd <sub>3</sub> (β); Cd <sub>4</sub> (α)	NMR <sup>[33]</sup>
MT3 de ratolí ( <i>Mus musculus</i> )	Cd <sub>4</sub> (α)	NMR <sup>[34]</sup>
MT2A de conill ( <i>Oryctolagus cuniculus</i> )	Cd <sub>3</sub> (β); Cd <sub>4</sub> (α)	NMR <sup>[35]</sup>
MT2 humana ( <i>Homo sapiens</i> )	Cd <sub>3</sub> (β); Cd <sub>4</sub> (α)	NMR <sup>[36]</sup>
MT3 humana ( <i>Homo sapiens</i> )	Cd <sub>4</sub> (α)	NMR <sup>[37]</sup>
MT de bacallà antàrtic ( <i>Notothenia coriiceps</i> )	Cd <sub>3</sub> (β); Cd <sub>4</sub> (α)	NMR <sup>[38]</sup>
MTA d'eriçó de mar ( <i>Strongylocentrotus purpuratus</i> )	Cd <sub>3</sub> (β); Cd <sub>4</sub> (α)	NMR <sup>[39]</sup>
MT1 de cranc blau ( <i>Callinectes sapidus</i> )	Cd <sub>3</sub> (β); Cd <sub>3</sub> (α)	NMR <sup>[40]</sup>
MT1 de llagosta americana ( <i>Homarus americanus</i> )	Cd <sub>3</sub> (β)	NMR <sup>[41]</sup>
Domini C-t de blat ( <i>Triticum aestivum</i> )	Zn <sub>4</sub> (β <sub>E</sub> -E <sub>C</sub> )	NMR <sup>[42]</sup>
Cu-MT de llevat ( <i>Saccharomyces cerevisiae</i> )	Cu <sub>7</sub> ; Ag <sub>7</sub> ; Cu <sub>8</sub>	NMR, raigs X <sup>[30, 43-44]</sup>
Cu-MT de fong ( <i>Neurospora crassa</i> )	Estructura peptídica sense metalls units	NMR <sup>[45]</sup>
SmtA de cianobactèria ( <i>Synechococcus</i> PCC 7942)	Zn <sub>4</sub>	NMR <sup>[46]</sup>

**Taula 1:** Complexos metall-MT d'estructura tridimensional inclosa en el *Protein Data Bank* (PDB)<sup>[8, 47-48]</sup>.

Tret de la MT de cianobacteri, que és monodominial<sup>[46]</sup>, les demés estructures tridimensionals conegudes de MTs enllaçades a metalls divalents presenten una estructura amb dos domini separats. En la major part dels casos, la resolució estructural s'ha fet per cada domini aïllat, i no a partir de la proteïna sencera. Tan sols Cd<sub>5</sub>Zn<sub>2</sub>-MT2 de rata, s'ha resolt com a proteïna sencera<sup>[32]</sup>.

En els darrers anys s'ha determinat, en alguns agregats metàl·lics de les MTs, la presència d'ions sulfur que completen l'esfera de coordinació dels metalls enllaçats. La participació d'ions sulfur ja havia estat demostrada en els agregats metàl·lics d'uns pèptids estretament relacionats amb les MTs: les fitoquelatines (PCs). Aquests pèptids es formen per síntesi enzimàtica a partir d'unitats de  $\gamma$ -glutamil-cisteïna, i coordinen metalls mitjançant Cys i lligands sulfur<sup>[49]</sup>.

La primera vegada que es va observar la participació de lligands sulfur (S<sup>2-</sup>) en els complexos metàl·lics de les MTs va ser pels agregats Cd-MtnA de *Drosophila melanogaster*<sup>[50]</sup>. Posteriorment, el grup de recerca on s'ha realitzat aquesta Tesi Doctoral, ha pogut determinar l'existència d'ions sulfur en els complexos Zn-MT i Cd-MT de diferents organismes com *Quercus suber* (l'alzina surera)<sup>[51]</sup>, el protozou *Tetrahymena pyriformis*<sup>[52]</sup>, Cup1 i CRS5 del llevat *Saccharomyces cerevisiae*<sup>[47, 53-54]</sup>, el musclo *Mytilus edulis*<sup>[55]</sup>, SpMTA de l'equinoderm *Strongylocentrotus purpuratus*<sup>[56]</sup>, MT2 del nemàtode *Caenorhabditis elegans*<sup>[57]</sup>, HpCuMT del cargol *Helix pomatia* (dades no publicades, de la Tesi de Sílvia Perez, del Departament de Química de la UAB), ckMT1 de pollastre<sup>[58]</sup> i mMT4 de ratolí<sup>[59]</sup>. Aquests ions sulfur, àcid-làbils, s'han detectat de forma més abundant en els complexos Cd-MT i els resultats indiquen la coexistència en una mateixa mostra d'agregats metall-MT amb ions sulfur i sense, encara que la presència dels lligands sulfur no sembla incrementar la capacitat coordinant dels pèptids<sup>[59-60]</sup>.

### 1.2.1 Primera classificació

La classificació de les proteïnes es realitza generalment segons la seva funcionalitat (per exemple, reductases, oxigenases i proteases). Però en el cas de les MTs, encara no s'ha determinat clarament quina és la seva funció fisiològica. Actualment hi ha diverses funcions en les quals les MTs poden estar implicades, que seran discutides en l'apartat següent.

La primera classificació proposada per les MTs es va donar durant el Segon Congrés Internacional de Metal·lotioneïnes, l'any 1985. Aquesta classificació, feta a partir de l'estructura primària de les MTs, comporta tres grans grups<sup>[61]</sup>:

- Classe I: MTs amb una gran homologia de seqüència amb la isoforma MT1 de ronyó de cavall, estructurades en dos dominis, tenen entre 59 i 63 aminoàcids, dels quals al voltant de 20 són Cys. Es troben la majoria de vertebrats i en alguns invertebrats.
- Classe II: MTs amb una gran heterogeneïtat de seqüència, que no els permet alinear-se entre si i amb la MT1 de cavall. Contenen gran quantitat de Cys i es troben en plantes, fongs, invertebrats i bacteris. En la seva majoria estan constituïdes per un sol domini.
- Classe III: MTs que no es poden classificar en cap de les altres dues classes. Són les anomenades cadistines, fitoquelatines i d'altres polipèptids de síntesis enzimàtica amb fórmula general  $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{Gly}$ . Es troben principalment en vegetals i organismes unicel·lulars.

Aquesta classificació, avui en dia desfasada, agrupa en les classes II i III tota una sèrie de proteïnes que no tenen cap relació entre elles, ni estructuralment ni evolutivament parlant. Així i tot, s'ha considerat rellevant citar-la per la seva importància històrica.

### 1.2.2 Classificació taxonòmica de les MTs

Més endavant, l'any 1999, es va proposar una altre sistema de classificació, aquesta vegada basat en similituds globals de les seqüències proteiques<sup>[62-63]</sup>. Aquesta ordenació, molt més detallada, divideix les MTs en famílies, subfamílies, subgrups, isoformes i subisoformes, donant lloc a tants tipus de MT com grups taxonòmics es coneixen (Taula 2).

FAMÍLIA	NOMBRE D'AAs	PATRÓ DE SEQÜÈNCIA	CARACTERÍSTIQUES
1. Vertebrats	60-68	K-x(1,2)-C-C-x-C-C-P-x(2)-C	Dos dominis, $\beta$ amb 9 Cys que uneix 3 metalls divalents i $\alpha$ amb 11 Cys que uneix 4 metalls divalents.
2. Mol·luscs	64-75	C-x-C-x(3)-C-T-G-x(3)-C-x-C-x(3)-C-x-C-K	La seqüència proteica es divideix en dos dominis, les estequiometries metall-MT són equivalents a les de vertebrat.
3. Crustacis	58-60	P-[GD]-P-C-C-x(3,4)-C-x-C	Dos dominis de característiques $\beta$ , amb 9 Cys que uneixen 3 metalls divalents.
4. Equinoderms	64-67	P-D-x-K-C-[V,F]-C-C-x(5)-C-x-C-x(4)-C-C-x(4)-C-C-x(4,6)-C-C	Dos dominis, $\alpha$ amb 11 Cys que uneix 4 metalls divalents i $\beta$ amb 9 Cys que uneix 3 metalls divalents.
5. Dípters	40-43	C-G-x(2)-C-x-C-x(2)-Q-x(5)-C-x-C-x(2)D-C-x-C	Es proposa amb un sol domini.
6. Nematodes	62-74	K-C-C-x(3)-C-C	Presenten aminoàcids no habituals en les MTs, com la Tyr.
7. Ciliats	105	Cap patró atribuït	Presència de múltiples triplets de Cys, un residu de Tyr conservat.
8. Fongs - I	25	C-G-C-S-x(4)-C-x-C-x(3,4)-C-x-C-S-x-C	Formen un sol agregat amb 3 metalls divalents.
9. Fongs - II	62	Formada per una sola MT del fong <i>Candida glabrata</i>	Un sol agregat metàl·lic de 18 Cys que coordinen 11-12 Cu.
10. Fongs - III	51	Formada per una sola MT del fong <i>Candida glabrata</i>	Un sol agregat metàl·lic de 16 Cys que coordinen 10 Cu.
11. Fongs - IV	55-56	C-X-K-C-X-C-x(2)-C-K-C	Presència d'un triplet de Cys i Phe i His conservades en l'extrem N-term.
12. Fongs - V	61	Formada únicament per la CUP1 de llevat	Un sol agregat metàl·lic amb 8 Cu.
13. Fongs - VI	69	Formada únicament per la CRS5 de llevat	Dos dominis amb estequiometries semblants a les de mamífer.
14. Procariotes	53-56	K-C-A-C-x(2)-C-L-C	Un sol domini que dimeritza per tal d'obtenir activitat biològica.
15. Plantes			Presenten dues regions riques en Cys separades per una regió sense Cys, anomenada espaiador. No hi ha dades de la seva estructura tridimensional. S'han classificat en 5 subfamílies.

Taula 2: Classificació de les MTs segons Binz i Kägi<sup>[56, 63-64]</sup>.

### 1.2.3 Classificació de les MTs segons la seva preferència metàl·lica Zn-Cu (divalents/monovalents)

L'any 2001, el grup de recerca en el qual s'ha realitzat aquesta Tesi Doctoral, va proposar un nou model de classificació de les MTs, basat tant en la seqüència aminoacídica, com en la preferència de la proteïna envers els ions essencials Zn(II) i Cu(I)<sup>[26]</sup>. Per realitzar aquesta classificació s'ha avaluat la capacitat coordinat de diverses MTs envers aquests dos ions metàl·lics, mitjançant la seva producció recombinant en medis de cultiu enriquits en aquests metalls, i l'estudi *in vitro* de la substitució Zn<sup>2+</sup>/Cd<sup>2+</sup> i Zn<sup>2+</sup>/Cu<sup>+</sup>, així com l'anàlisi qualitativa i quantitativa de la composició i estructura dels agregats metàl·lics formats *in vitro* al ser desplaçats els ions metàl·lics inicialment coordinats a cada MT. Així, es diferencien les MTs en dos grans grups:

- Zn-tioneïnes: MTs que en medis enriquits en Cu(II) donen lloc a espècies heterometàl·liques Zn<sup>II</sup>,Cu<sup>I</sup>-MT, i que, per tant, requereixen Zn(II) per a la seva estructuració.
- Cu-tioneïnes: MTs que en medis rics en Cu(II) donen lloc a espècies homometàl·liques Cu<sup>I</sup>-MT, i que, per tant, no requereixen Zn(II) per a la seva estructuració.

Darrerament s'ha pogut observar que el major o menor grau d'oxigenació dels cultius d'*E.coli* enriquits en Cu(II), productors de les MTs recombinants, pot afectar la naturalesa homo- o heteronuclear dels complexos Cu<sup>I</sup>-MT finals<sup>[53]</sup>. A més, el fet que els lligands sulfur àcid-làbils es trobin bàsicament en els complexos amb ions divalents de les MTs classificades com a Cu-tioneïnes<sup>[53, 65]</sup>, ha portat a una revisió completa de totes les MTs estudiades per aquest grup de recerca en els darrers 15 anys. Així, s'ha pogut demostrar que existeix una gradació en les propietats d'enllaç metàl·lic de les MTs que permet ordenar-les des de les que s'anomenen Cu-tioneïnes genuïnes fins a les denominades Zn-tioneïnes genuïnes<sup>[47, 59]</sup>.



- Zn-tioneïnes genuïnes:
  - Es sintetitzen com a una única espècie quan són produïdes en medis rics en Zn(II) i com a mescla d'espècies en medis rics en Cu(II).
  - Contenen Zn(II) en ser produïdes en medis rics en Cd(II).
  - Són reticents al bescanvi Zn/Cd *in vitro*.
  - S'obtenen com a espècies heterometàl·liques Zn,Cu-MT en ser produïdes en medis rics en Cu(II), independentment del grau d'oxigenació del cultiu.
  
- Cu-tioneïnes genuïnes:
  - Es sintetitzen com a mescla d'espècies quan són produïdes en medis rics en Zn(II) i com a una única espècie en medis rics en Cu(II).
  - Contenen lligands S<sup>2-</sup> en ser produïdes en medis rics en Cd(II).
  - No mostren reticència al bescanvi Zn/Cd *in vitro*.
  - S'obtenen com a espècies homometàl·liques en ser produïdes en medis rics en Cu(II), independentment del grau d'oxigenació del cultiu.

Entre aquests dos extrems, s'observa una classificació gradual de les MTs segons les seves característiques desde Zn-tioneïnes genuïnes, MTs intermèdies i fins a Cu-tioneïnes genuïnes. Per exemple, les MTs intermèdies, en ser produïdes en medis rics en Cu(II), poden obtenir-se com a espècies homo- o heterometàl·liques, tot depenent del grau d'oxigenació del cultiu. Un altre punt a tenir en compte per a situar una MT en l'escala entre les Zn- i Cu-tioneïnes genuïnes és la relació entre el nombre de Cys i el nombre d'equivalents de Cu(I) necessaris per tal de reproduir *in vitro* les espècies Cu-MT ontingudes *in vivo*. La presència/absència de lligands sulfur en els complexos Cd-MT recombinants també dóna informació, ja que s'ha comprovat que el nombre de lligands sulfur augmenta amb el caràcter de Cu-tioneïna d'una determinada MT. En canvi, una Zn-tioneïna no necessita ions sulfur per formar complexos Cd-MT. Finalment, és conegut que les Zn-tioneïnes genuïnes donen lloc a formes Zn,Cd-MT quan la proteïna recombinant es produïda en medis rics en Cd(II).

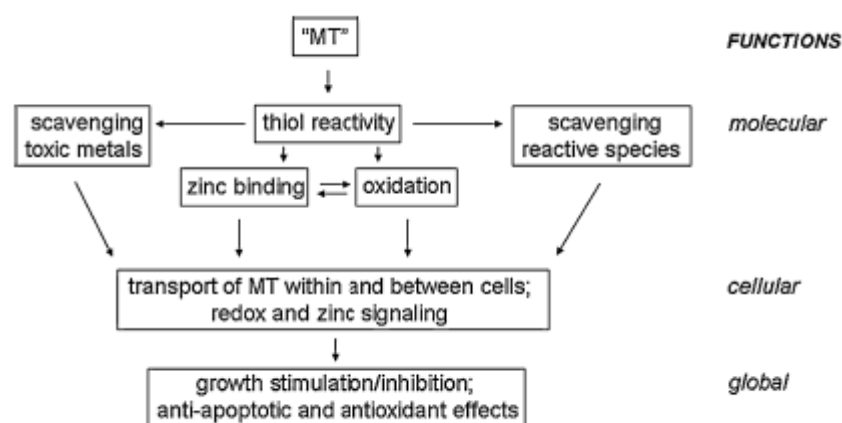
Aquesta gradació, ampliada a mesura que es coneixen les característiques de noves MTs, ha de permetre acabar relacionant totes les MTs així estudiades amb la seva funció fisiològica.



### 1.3 FUNCIONS DE LES METAL·LOTIONEÏNES

Després de més de 50 anys des del seu descobriment, les MTs es troben encara en ple debat científic sobre la seva funció fisiològica. Els estudis realitzats fins ara han posat en evidència la multi-funcionalitat d'aquestes proteïnes, o més ben dit, la seva participació en una gran varietat de vies metabòliques. Això no és sorprenent, per la diversitat de metalls que poden coordinar, la seva ubiqüitat i el fet que es troben en tots els organismes estudiats, cosa que porta a pensar en la seva aparició primerenca en l'evolució. Així, les MTs es troben implicades en moltes funcions cel·lulars i no sempre en relació amb els metalls pesants, tal i com podem veure en l'anàlisi de la seqüència dels promotors dels seus gens, on s'hi troben, a més d'elements de resposta a metalls, elements de resposta a glucocorticoides i a l'estrès oxidatiu<sup>[66]</sup>.

El fet que inicialment foren aïllades en resposta a metalls pesants xenobiòtics, en especial el Cd, va fer que se'ls atribuís com a funció la destoxicació de la cèl·lula, però la contaminació per metall pesant és un fet aïllat en la natura, i des d'un punt de vista evolutiu, massa recent per a explicar l'existència d'aquestes proteïnes en tots els organismes. En la Figura 2 s'indiquen les diferents funcions a diversos nivells en què actuarien les MTs de mamífer.



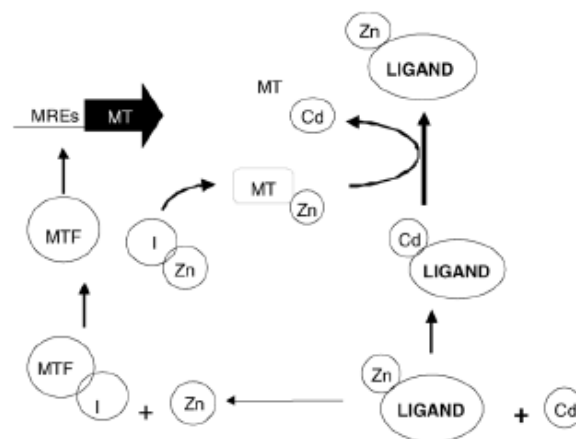
**Figura 2:** Funcions de les MTs de mamífer a diferents nivells<sup>[67]</sup>.

Seguidament s'exposaran de manera general les principals funcions en què es troben implicades les MTs i que s'han proposat fins ara.

### 1.3.6 Destoxicació de metalls pesants

De forma general, els metalls pesants són tòxics per als éssers vius, àdhuc els considerats metalls essencials són nocius a altes concentracions. Aquesta toxicitat és deguda principalment a la seva afinitat per enllaçar-se a macromolècules biològiques: interferint així amb enzims, alterant la membrana lipídica o interaccionant directament amb el DNA.

La capacitat de les MTs per unir aquests metalls, donada la seva afinitat d'enllaçar pels grups tiolat, produeix un desplaçament del Zn(II) que es troba en condicions fisiològiques unit a la MT. D'aquesta manera, la MT segresta els metalls xenobiòtics impedit la seva interacció amb estructures biològiques. El Zn(II) alliberat s'uniria al factor de transcripció MTF1, que és el responsable de la inducció de la síntesi de MT per metall (Figura 3)<sup>[68-70]</sup>. Posteriorment, les MTs amb el metall tòxic s'acumularien als lisosomes per a la seva eliminació<sup>[71]</sup>.



**Figura 3:** Mecanisme d'activació de l'expressió del gen de MT per desplaçament del Zn(II) inicialment enllaçat per un metall xenobiòtic ( $\text{Cd}^{2+}$  en aquest cas). MTF: Factor de transcripció depenent de metall. I: Inhibidor del factor de transcripció. MREs: Element de resposta a metall, en el promotor del gen de MT<sup>[71]</sup>.

La sobreexpressió de MT confereix resistència a metalls pesants<sup>[72]</sup>, però el fet que les diferents isoformes de MT d'un mateix organisme presentin patrons d'expressió diferencials, indica l'existència d'una especialització funcional en què una isoforma seria responsable de la destoxicació mentre que l'altra ho seria de l'homeòstasi de metalls<sup>[71]</sup>. Així, com ja s'ha indicat, les MTs no poden ser considerades únicament com a destoxicadores, sinó que tenen un paper actiu en el metabolisme.

### **1.3.1 Homeòstasi de metalls intracel·lulars**

En condicions fisiològicament normals, els metalls coordinats per les MTs són el Zn(II) i el Cu(I). Aquests metalls juguen papers essencials en el metabolisme, actuant com a cofactors enzimàtics o proteics, però la concentració de l'ió metàl·lic "lliure" en la cèl·lula s'ha de mantenir molt baixa, i per tant, el control de la seva homeòstasi és molt important. Així, s'ha proposat que les MTs tindrien la funció de "tamponar" el Zn(II), interactuant amb d'altres proteïnes per tal de transferir el Zn necessari per a les diferents reaccions del metabolisme<sup>[28, 73]</sup>. Diversos estudis han demostrat interaccions i transferència de Zn(II) entre MT i diferents proteïnes, com la fosfatasa alcalina, la carboxipeptidasa A, la sorbitol deshidrogenasa i la glicerol fosfat deshidrogenasa<sup>[74-77]</sup>. Per al coure, tot i que el gen de les MTs no s'indueix directament per aquest metall, també s'ha demostrat la implicació de les MTs en la regulació de la seva concentració intracel·lular<sup>[78-79]</sup>.

També s'ha observat la implicació de les MTs en la regulació de l'absorció per la cèl·lula de Zn i Cu<sup>[80]</sup>, la seva distribució, emmagatzematge i alliberament en els diferents compartiments cel·lulars<sup>[67, 75, 81-84]</sup>.

Altres estudis relacionen directament la quantitat de Zn en teixits o òrgans, amb nivells d'expressió de mRNA de MT<sup>[85-87]</sup>. Per exemple, en mamífers, els gens de certes MTs són induïts de manera contínua en les zones del Sistema Nerviós Central (SCN) on hi ha una concentració de Zn(II) alta, com l'hipocamp i la glàndula pineal<sup>[88-90]</sup>. L'expressió gènica i les accions metabòliques de les MTs de mamífer serà tractada més en profunditat en el capítol 1.4 d'aquesta Tesi Doctoral.

### **1.3.2 Antioxidants**

Les espècies reactives de l'oxigen (ROS de l'anglès *Reactive Oxygen Species*) són molècules que es produeixen en les cèl·lules com a resultat de reaccions d'oxidació-reducció on hi intervé l'oxigen. En la cèl·lula s'ha observat la presència d'espècies reactives d'oxigen (ROS) i de nitrogen (RNS) després de l'exposició a UV, com a producte de reaccions catalitzades per metalls presents en l'atmosfera com a pol·luents, produïts pels glòbuls blancs durant la inflamació i també en la mitocòndria

com a residu de vies metabòliques<sup>[91]</sup>. Els danys produïts en les cèl·lules per aquests oxidants afecten tant a lípids, com proteïnes o el DNA.

El paper antioxidant de les MTs ha estat àmpliament estudiat. Així, s'ha detectat la intervenció directa de les MTs en l'eliminació dels radicals lliures en reaccionar-hi directament per formar ponts disulfur entre Cys i alliberant el Zn de la seva estructura donant-lo a enzims antioxidants els quals necessiten aquests metalls per funcionar, com per exemple la superòxid-dismutasa (SOD)<sup>[81, 84, 92-95]</sup>. A més, també s'ha detectat que una sobreexpressió de les MTs, lligada a l'estrès oxidatiu, confereix protecció enfront dels radicals oxidants<sup>[96-97]</sup>.

No totes les MTs reaccionen de la mateixa manera o intensitat davant els radicals lliures d'oxigen<sup>[98]</sup>, pel que fa a les MTs de mamífer, s'ha pogut observar aquesta diferenciació o preferència de reacció envers un o altre tipus de radical. A més, en funció de la localització cel·lular de la proteïna, aquesta actuarà com a reductor o com a oxidant<sup>[67, 99]</sup>. Les accions metabòliques de les MTs de mamífer s'indicaran més àmpliament en el capítol 1.4 d'aquesta Tesis Doctoral.

### **1.3.3 Xaperones**

Les "carrabines" o xaperones són un conjunt de proteïnes que tenen com a funció ajudar al plegament d'altres proteïnes durant la seva síntesis. Una de cada tres proteïnes conegudes conté metall com a cofactor<sup>[100]</sup> necessari per a la seva acció biològica. En els subapartats anteriors s'ha indicat que les MTs poden actuar com a reservori de zinc i transferir-lo a metal·loproteïnes i factors de transcripció. Així, una de les funcions proposades per a les MTs és la d'actuar com a xaperones moleculars, durant la síntesis de les proteïnes metal·lo-depenents. Això seria fet pels grups tiolat de les MTs, que s'oxidarien donant lloc a ponts disulfur i alliberant el metall que podria unir-se a la metal·loproteïna<sup>[101]</sup>. De fet, aquesta funcionalitat està lligada amb les funcions d'homeòstasis de metalls i antioxidant que s'acaben d'indicar<sup>[102]</sup>, ja que les xaperones no tant sols es sintetitzen de manera ubíqua, sinó que la seva expressió augmenta quan la cèl·lula es troba en una situació d'estrès, per exemple, per excés de metall, per augment de radicals oxidants i també en el cas de xoc tèrmic<sup>[103]</sup>. Aquesta acció com a xaperona de les MTs és una proposta encara recent i no prou estudiada,

però que augmenta la seva importància a mesura que s'incrementa el nombre d'estudis sobre aquestes proteïnes.

#### **1.3.4 Paper antiapoptòtic**

L'apoptosi o mort cel·lular programada, és essencial per a la supervivència i el desenvolupament dels organismes multicel·lulars. Una disfunció apoptòtica porta a un nombrós tipus de malalties, com ara l'Alzheimer, la Corea de Huntington, el Parkinson, malalties autoimmunes, isquèmies, malalties cardiovasculars i càncer. S'ha determinat la implicació de les MTs en la regulació de l'apoptosi<sup>[92]</sup>, com per exemple, mitjançant cultius cel·lulars modificats de manera que no contenen MTs<sup>[104]</sup>, observant una inhibició de la fragmentació del DNA en relació amb una major expressió de MTs. De fet, s'ha observat una relació entre les MTs i la proteïna p53, un factor de transcripció amb un paper molt important en el manteniment de la integritat del genoma, però sembla que les MTs actuen per diferents vies en la regulació de l'apoptosi<sup>[93]</sup>.

#### **1.3.5 Protecció i regeneració**

En les funcions ja indicades d'antioxidants, xaperones i regulació de la mort cel·lular programada hi ha implícit el paper de protecció cel·lular de les MTs. Les MTs s'expressen com a resposta a múltiples factors que afecten a la cèl·lula, davant l'estrès de diferents tipus així com en conjunció amb la resposta immunitària, com a resposta a multiplicitat de factors<sup>[105]</sup>. En malalties neurodegeneratives, com per exemple l'Alzheimer, s'ha pogut determinar un paper protector, concretament de MT3<sup>[106-107]</sup>. Però no només realitzen funcions de protecció, sinó que també participen en la regeneració cel·lular, com s'ha vist en estudis de criolesió en el sistema nerviós central<sup>[108-109]</sup>.





## 1.4 LES METAL·LOTIONEÏNES DE MAMÍFER

### 1.4.1 Les MTs de mamífer: isoformes i patrons de seqüència

Les MTs de mamífer han estat llargament estudiades i actualment es té un coneixement ampli d'aquestes proteïnes, tant a nivell biològic (expressió gènica, funcions en el metabolisme, situació en els diferents òrgans i teixits...) com químic (capacitat coordinant envers diferents metalls, caracterització dels agregats metàl·lics, estructura...).

En mamífers s'han aïllat 4 isoformes de MT, classificades en 4 subfamílies proteiques: m1, m2, m3 i m4. Els gens per les MT de mamífer es troben localitzats en un mateix *clúster* genètic, format per duplicació gènica. En aquest clúster es troben els 4 gens organitzats de la mateixa manera però amb diferents nivells de complexitat segons l'espècie. Així, en humans es localitzen fins a 13 subformes de MT1 mentre que en ratolí cada subfamília té un únic membre: MT1, MT2, MT3 i MT4. A nivell estructural, el gen té 3 exons, i les posicions donadores i acceptores dels introns estan conservades (Figura 4).

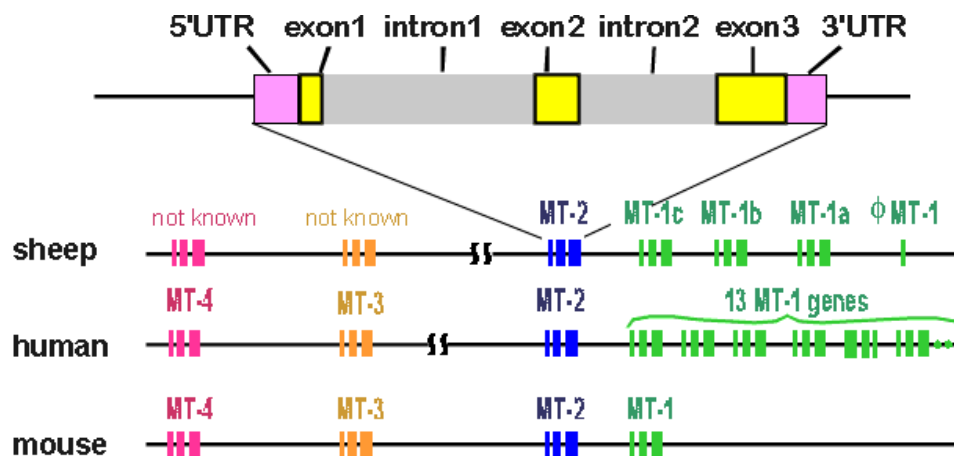


Figura 4: Esquema del *clúster* de les MTs de mamífer<sup>[110]</sup>.

Les relacions filogenètiques de les 4 subfamílies de MTs de mamífer presenten divergències evolutives respecte altres taxons. Es considera que les 4 MTs de vertebrats provenen d'un sol únic gen ancestral anomenat avMT. Pel que fa a MT1 i MT2, aquests gens són considerats paràlegs, apareguts després de la divergència dels mamífers (Figura 5)<sup>[110-111]</sup>.



la inserció del domini  $\alpha$ , amb una quinzena de canvis d'aminoàcid. Entre aquesta i mMT4 hi ha 25 aminoàcids diferents, a més dels 6 aminoàcids insertats en la mMT3. D'aquests, 10 canvis es troben en els motius C-X-C i C-X-Y-C, característics de les MTs: en 2 casos es produeix un canvi d'un aminoàcid neutre en mMT4 a un aminoàcid carregat en mMT3, en 3 casos en mMT4 hi ha un aminoàcid amb característiques d'hidrofobicitat i en 4 canvis d'aminoàcid es passa d'un de petit a un de gran.

#### **1.4.2 Patrons d'expressió tissulars i temporals. Preferències d'inducció gènica**

Els gens de les quatre isoformes de MT de mamífer, s'expressen a nivell basal, però la seva transcripció pot ser altament incrementada per certs estímuls<sup>[112]</sup>. De les quatre isoformes existents en mamífer, MT1 i MT2, s'expressen durant tot el desenvolupament i en tot tipus de cèl·lules. MT3 s'expressa en el SNC de manera constitutiva, sobretot en neurones però també en la glia, el pàncrees i en els òrgans reproductors masculins<sup>[68, 89]</sup>. Finalment, MT4 es troba únicament en l'epiteli estratificat escamós diferenciat (pell, llengua, esòfag) i durant el desenvolupament embrionari<sup>[7, 113]</sup>.

Els gens de les isoformes MT1 i MT2, a diferència de MT3 i MT4, són induïbles per una gran quantitat de factors, entre els quals destaquen metalls pesants, hormones, citoquines i factors d'estrés. Els gens de MT3 i MT4, en canvi, no presenten un augment de transcripció davant aquests estímuls<sup>[68]</sup>. Estudis realitzats en els promotors dels gens de les quatre isoformes de MT de mamífer han mostrat l'existència d'Elements de Resposta a Metall (MRE, per *Metal Response Element*), Elements de Resposta a Glucocorticoides (GRE, per *Glucocorticoid Response Element*) i Elements de Resposta a agents Antioxidants (ARE, per *Antioxidant Response Element*). Tot i que els promotors de mMT1 i mMT2 presenten una important similitud de seqüència<sup>[114]</sup>, les divergències existents entre ells, pel que fa al tipus i nombre d'elements a resposta a diferents estímuls expliquen les diferències observades en les preferències d'inducció d'aquests gens. Així, els gens de MT1 i MT2 de ratolí mostren una expressió coordinada i regulada per metalls i glucocorticoides, tot i que mMT1 presenta una taxa d'expressió més elevada<sup>[114-115]</sup>. En humans, on hi ha un major polimorfisme genètic, com ja hem indicat, només els gens MT1e i MT2a són induïbles

per glucocorticoides, mentre que tots els gens de les hMT de tipus 1 i 2 són induïdes per metall. També es troben diferències en el nivell d'expressió en les MT humanes (hMT), per exemple, hMT1a presenta una gran resposta al Cd mentre hMT2a s'expressa de forma més important en presència de Zn, Cu i glucocorticoides. A més, la transcripció del gen de hMT2a és unes 5 vegades més eficient que la de hMT1a<sup>[116-118]</sup>.

Pel que fa al gen de la isoforma MT3, la seva expressió no s'indueix pels mateixos estímuls que MT1 i MT2, tot i tenir diversos MRE en el seu promotor<sup>[119-120]</sup>. En un principi, aquesta isoforma es va considerar específica del SNC<sup>[119]</sup> i es va considerar que una regió del promotor del gen podria estar involucrada en la repressió de la seva expressió, de manera que el gen només s'expressaria en el cervell i de manera constitutiva<sup>[121]</sup>. Estudis posteriors han demostrat que la isoforma MT3 es troba també en altres òrgans i teixits de l'organisme. Així, s'ha detectat la proteïna o l'expressió genètica d'aquesta isoforma en ronyó, pròstata, bufeta, fetge, intestí, pàncrees, pulmó i aparell genital masculí<sup>[87, 89, 122-126]</sup>.

Finalment, pel que fa a la isoforma MT4, no hi ha molts estudis realitzats sobre la seva expressió des del seu descobriment<sup>[7]</sup>, que, com ja s'ha indicat, es redueix al teixit epitelial estratificat<sup>[4, 113]</sup>, on tindria un paper important en la regulació del Zn(II). En aquest epiteli, les isoformes MT1 i MT4 s'expressen de manera diferencial, en diferents estrats del mateix. Aquesta diferenciació espacial observada també en la placenta no ha estat encara explicada, però sembla que MT4 tindria un paper en la homeòstasi de metalls intracel·lulars molt important durant el desenvolupament, enfront un paper destoxicador de MT1<sup>[113]</sup>.

#### **1.4.3 Preferències d'enllaç a metalls pesants en les MTs de mamífer**

Les MTs de mamífer van ser descobertes enllaçades a Cd(II)<sup>[1]</sup> però poden unir-se a diferents ions metàl·lics, mono o divalents. La major part dels estudis de coordinació, preferència metàl·lica i estructura de les MTs de mamífer s'han realitzat amb MT1 i MT2, sovint sense diferenciar-les. MT3 és la isoforma més estudiada des del punt de vista funcional, tenint en compte les seves característiques diferencials i d'expressió en el SNC. En canvi, de la isoforma MT4 se n'han fet molt pocs estudis, tot i

ser la que presenta diferències aminoacídiques més importants respecte les altres tres isoformes.

Les isoformes MT2 i MT3 són l'objecte d'estudi d'aquesta tesis doctoral, per aquesta raó s'exposaran els coneixements actuals de la seva funcionalitat biològica i coordinació metàl·lica en els dos apartats següents, indicant aquí les característiques generals de les quatre isoformes i característiques específiques de MT1 i MT4.

Les metal·lotioneïnes de mamífer presenten, en presència de metall, una estructura tridimensional composta per dos dominis, un primer domini  $\beta$  que uneix 3 metalls divalents i un domini  $\alpha$  que uneix 4 metalls divalents, tal i com s'ha explicat en l'apartat 1.2 d'aquesta introducció. L'estructura dels complexos que contenen Cu(I) no ha estat encara resolta.

D'acord amb els resultats d'aquest grup de recerca, MT1 de ratolí és una Zn-tioneïna<sup>[26]</sup>, amb un domini  $\alpha$  que és també una Zn-tioneïna i un domini  $\beta$  amb característiques de Cu-tioneïna<sup>[127]</sup>. En els estudis dels complexos metàl·lics biosintetitzats en cultius d'*E. coli* suplementats amb Zn(II), s'obté Zn<sub>7</sub>-mMT1 com a espècie única, amb les mateixes característiques que els complexos nadius<sup>[25, 128]</sup>. En els estudis de substitució del Zn(II) pel Cd(II), en els complexos Zn<sub>7</sub>-mMT1, Zn<sub>4</sub>- $\alpha$ mMT1 i Zn<sub>3</sub>- $\beta$ mMT1 s'observa la formació dels complexos Cd<sub>7</sub>-mMT1, Cd<sub>4</sub>- $\alpha$ mMT1 i Cd<sub>3</sub>- $\beta$ mMT1, i que, en excés de Cd(II), els complexos Cd<sub>7</sub>-mMT1 i Cd<sub>3</sub>- $\beta$ mMT1 poden assolir estequiometries Cd/MT superiors<sup>[128-129]</sup>. La sobremetal·lació de MT1 s'ha descrit recentment en l'estudi de la isoforma MT1 humana, però en aquest cas, també s'observa la incorporació d'excés de Cd(II) en el domini  $\alpha$ <sup>[130]</sup>. En la biosíntesis d'aquesta isoforma en cultius d'*E. coli* rics en Cu(II) s'obtenen els complexos Cu<sub>7</sub>Zn<sub>3</sub>-mMT1, Cu<sub>4</sub>Zn<sub>1</sub>- $\beta$ mMT1 i Cu<sub>3</sub>Zn<sub>2</sub>- $\alpha$ mMT1<sup>[131-132]</sup>, però la seva estructura tridimensional és encara desconeguda.

Pel que fa als estudis de coordinació metàl·lica realitzats per aquest grup de recerca en la isoforma MT4 de ratolí, aquesta s'ha classificat com la primera Cu-tioneïna descrita en organismes superiors, amb els dos dominis presentant característiques de Cu-tioneïna<sup>[132-133]</sup>. En la biosíntesis en cultius d'*E. coli* enriquits en Zn(II) s'obtenen, com a espècies úniques, el complex Zn<sub>7</sub>-mMT4, el complex Zn<sub>3</sub>-

$\beta$ mMT4 i el complex  $Zn_4$ - $\alpha$ mMT4, però en els tres casos la quiralitat del complex és inferior a la dels complexos equivalents de mMT1. Quan es sintetitza mMT4 en cultius d'*E. coli* suplementats amb Cd(II), únicament el fragment  $\alpha$ mMT4 es sintetitza com una única espècie  $Cd_4$ - $\alpha$ mMT4, mentre que la proteïna sencera i el domini  $\beta$ mMT4 generen una barreja d'espècies heterometàl·liques que contenen  $Zn^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$  i  $S^{2-}$  en els seus agregats<sup>[60, 134]</sup>. Els estudis realitzats *in vitro* sobre la capacitat coordinant de mMT4 envers Cd(II) corroboren la baixa afinitat de mMT4 envers aquest metall divalent, és necessari afegir un excés considerable de Cd(II) als complexos  $Zn_7$ -mMT4,  $Zn_3$ - $\beta$ mMT4 i  $Zn_4$ - $\alpha$ mMT4 per tal d'obtenir com a espècies úniques les espècies homometàl·liques de Cd corresponents. Recerques posteriors realitzades per un altre grup de recerca, el qual ha biosintetitzat la isoforma mMT4 en cultius d'*E. coli* sense suplementar amb metall i afegint posteriorment Cd(II) a la proteïna, indiquen unes característiques d'unió de mMT4 al Cd(II) semblants a mMT1<sup>[135]</sup>, però s'ha de tenir en compte que fisiològicament, aquesta isoforma es troba dins la cèl·lula en presència de  $Zn^{2+}$ , de manera que segurament es trobarà en forma de complexos heterometàl·lics amb Zn(II). Pel que fa a la biosíntesis d'aquesta isoforma en medis rics en Cu(II), s'obtenen diferent tipus d'agregat metàl·lic segons el grau d'oxigenació del cultiu. D'aquesta manera, s'obtenen complexos heterometàl·lics  $Cu_7Zn_3$ -mMT4 o homometàl·lics  $Cu_{10}$ -mMT4 segons el cultiu estigui oxigenat de manera normal o baixa<sup>[132-133]</sup>.

### 1.4.3 La isoforma MT2 de mamífer

#### 1.4.3.1 GENÈTICA I FISIOLOGIA, CARACTERÍSTIQUES DIFERENCIALS DE MT2 RESPECTE LA ISOFORMA MÉS PROPERA: MT1

En la major part dels estudis de funcionalitat biològica de la isoforma MT2, aquesta es troba equiparada a la isoforma MT1. Al ser les dues isoformes més semblants en seqüència (Figura 6), trobant-se en els mateixos teixits i òrgans, tradicionalment s'han considerat com equivalents. Amb tot, s'han detectat diferències, tant a nivell d'expressió gènica com de reactivitat, que indueixen a matisar, o bé a proposar, una clara diferenciació funcional de cada isoforma. Efectivament, la isoforma MT1 humana mostra una inducció d'expressió gènica més important davant de Cd que hMT2<sup>[116]</sup>, i és més, els diferents gens del *clúster* genètic de les MTs humanes,

presenten una regulació diferencial<sup>[118]</sup>. Efectivament, aquesta regulació d'expressió gènica pot ser explicada per les diferències existents entre els promotors d'ambdós gens, que contenen diferent nombre i orientació de MRE i altres elements de resposta a estímuls<sup>[136]</sup>. En humans s'ha detectat que hMT2 és induïda per  $Zn^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$  i glucocorticoides en major mesura que hMT1, amb una gran resposta només per al  $Cd^{2+}$ <sup>[116-117]</sup>. En ratolí, en canvi, les diferències d'inducció del gen d'ambdues isoformes són molt més lleugeres que en humans, però mMT1 mostra una taxa d'expressió més elevada que mMT2 davant els mateixos metalls<sup>[114-115]</sup>.

De la mateixa manera, altres estudis realitzats en rata han detectat diferències d'expressió gènica entre els gens de les isoformes rMT1 i rMT2<sup>[90]</sup> de manera que es produiria la isoforma rMT1 en neurones i rMT2 en les cèl·lules de la glia, després de dany cerebral. Això estaria lligat a diferències en el medi intracel·lular, i en conseqüència, la isoforma rMT1 estaria implicada en la destoxicació a metall mentre que rMT2 s'ocuparia de l'homeòstasi de metalls fisiològics. Aquesta mateixa diferència en la preferència de metall:  $Cd^{2+}$  per a rMT1 i  $Cu^{+}$  per a rMT2, s'ha detectat també en tractaments amb  $CdCl_2$  en rates que pateixen LEC, una malaltia del fetge anàloga a la malaltia de Wilson humana<sup>[137]</sup>.

En les anàlisis de les funcions de les MTs en diferents tipus de malalties també s'han pogut observar diferències entre MT1 i MT2. Particularment, es detecta una major quantitat de MT2 que no pas de MT1 en cèl·lules cancerígenes, a més, MT2 uneix més Zn que MT1 en cèl·lules tumorals<sup>[138]</sup>. De fet, la interacció de MT2 amb la GMP (Guanosina mono-fosfat) i el DNA modificats per platí (un dels tractaments en contra el càncer) ha estat provada i seria una explicació a la resistència que presenten cèl·lules tumorals al tractament químic<sup>[139]</sup>.

Molts d'aquests estudis porten a pensar que les diferències aminoacídiques observades entre aquestes dues isoformes i indicades en l'apartat 1.4.1 d'aquesta introducció tenen una importància pel que fa a la seva reactivitat i, per tant, a la seva funcionalitat. Això mateix s'ha observat en estudis entre diferents taxons, en els quals s'ha comprovat que lleus canvis d'aminoàcid afecten a la reactivitat dels tiols i a l'intercanvi de metalls de les MTs ja que la molècula presenta una flexibilitat diferent<sup>[38, 140-142]</sup>. Específicament, en MT2 de hàmsster en la qual s'han canviat totes les

Lys del domini  $\alpha$  per glutamats, la isoforma disminueix la seva capacitat de protecció enfront de metalls<sup>[143-144]</sup>. Així doncs, de la mateixa manera que la conservació de la posició de les Cys en la seqüència de les MTs, la presència de Lys ha mostrat tenir una gran importància en la funcionalitat de la proteïna. S'acaba d'indicar que mantenen la capacitat destoxicadora en MT2 de hámster, en humans, es troben 8 Lys conservades en la seva seqüència, i és en una d'aquestes Lys per on l'ATP pot interaccionar amb la hMT2<sup>[145]</sup>. Aquesta interacció ATP-MT inicia la formació del cofactor del metabolisme Zn-ATP<sup>[82]</sup>. hMT1, en canvi, no presenta aquesta interacció<sup>[146]</sup>, portant a suposar que altres parts de la molècula han d'estar també implicades en la unió ATP-hMT2, ja que la Lys que s'ha considerat implicada en la interacció es troba conservada en ambdues isoformes. Aquesta diferència entre MT1 i MT2 respecte la interacció amb l'ATP no ha estat clarificada pels dos grups de recerca que han realitzat aquests estudis, els quals han considerat indistintament la utilització d'una o altra isoforma en els seus anàlisis.

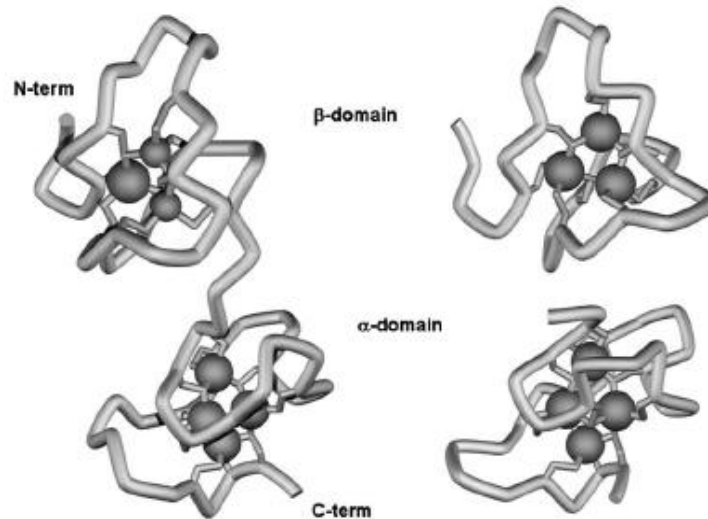
Finalment, en fetge de rates tractades amb Zn<sup>2+</sup>, s'ha detectat rMT2 acetilada i no acetilada, essent aquesta darrera més del 20% del total de la isoforma rMT2 present en la cèl·lula, en canvi, la isoforma rMT1 es troba únicament en la seva forma acetilada en els primers 7 aminoàcids N-terminal, que són idèntics en ambdues seqüències<sup>[147]</sup>. L'acetilació de la proteïna permet una regulació de la seva vida mitjana en la cèl·lula, de manera que rMT2 estaria regulada no només a nivell transcripcional sinó també a nivell traduccional, mentre que rMT1 no ho estaria.

#### 1.4.3.2 CARACTERÍSTIQUES ESTRUCTURALS I DELS COMPLEXOS METÀL·LICS DE MT2

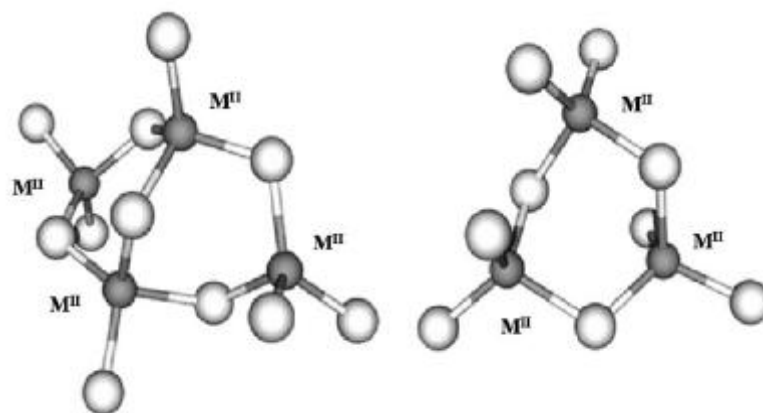
La primera estructura tridimensional resolta d'una MT de mamífer fou la de MT2 de rata (Figura 7), determinada mitjançant cristal·lografia (difracció de raigs X) en tant que Cd<sub>5</sub>Zn<sub>2</sub>-MT2, i per NMR pels dos dominis separats com a Cd<sub>3</sub>- $\beta$ MT2 i Cd<sub>4</sub>- $\alpha$ MT2, confirmant la unió de la proteïna sencera a 7 metalls divalents. Els nombrosos estudis estructurals de MT2 i dels seus dominis en diferents organismes han demostrat la gran semblança arquitectural entre les isoformes MT2 de diferents espècies de mamífer<sup>[31-32, 35-36, 148-156]</sup>. En l'enllaç a metalls divalents, les MTs de mamífer adopten una estructura anomenada *dumbbell-like* (semblant a una pesa) formada per un domini  $\beta$  N-terminal i un domini  $\alpha$  C-terminal connectats per una regió flexible *hinge* (frontissa)



constituïda per dues Lys, altament conservades, que es troben en la meitat de la cadena polipeptídica. Els dominis globulars contenen els clústers metàl·lics (Figura 8),  $M^{II}_3Cys_9$  en el domini  $\beta$  i  $M^{II}_4Cys_{11}$  en el domini  $\alpha$ .



**Figura 7:** Estructura tridimensional de la isoforma MT2 de rata, sencera (a l'esquerra), determinada per difracció de raigs X com a  $Cd_5Zn_2$ -MT2, i a la dreta la dels dos dominis per separat, determinades per NMR en solució aquosa, com a  $^{113}Cd_3$ - $\beta$ MT2 i  $^{113}Cd_4$ - $\alpha$ MT2. Figures adaptades de Brookhaven Protein Data Bank<sup>[72, 157]</sup>.



**Figura 8:** Esquema dels dos tipus de clústers metàl·lics formats per metalls divalents en les MTs de mamífer. Figures adaptades de Brookhaven Protein Data Bank<sup>[72, 157]</sup>.

La MT2, com totes les MTs, no s'estructura si no es troba unida a metall. S'han realitzat varis tipus d'anàlisi per determinar les característiques d'unió, tant de la proteïna sencera com dels dominis per separat, a diferents metalls. En aïllar MT2 nativa de fetge o ronyó de diferents espècies de mamífer, s'observen complexos  $Zn_7$ -MT2,  $Cd_7$ -MT2 o  $Zn_xCd_y$ -MT2, seguint  $x+y=7$ . Els complexos obtinguts són demetal·lats, per afegir diferents metalls i observar l'evolució de l'estructura a mesura que es forma

el nou complex, o bé s'estudia l'intercanvi de metalls en afegir-ne un de diferent al complex aïllat. D'aquesta manera, des de apo-MT2 humana, s'ha determinat que en presència de Zn(II) primer es forma un intermedi amb 4 metalls en la part C-terminal de la proteïna per, posteriorment, formar-se el clúster de 3 metalls, de manera cooperativa i seqüencial<sup>[158]</sup>. En sintetitzar els dos dominis separatament i afegint-hi Zn(II), s'ha pogut veure que en la unió al zinc, el domini  $\alpha$  és més estable termodinàmicament que el domini  $\beta$ , però el domini  $\beta$  intercanvia més ràpidament els metalls. Tot i que aquests dos dominis són independents, quan es troben units en la proteïna sencera, el domini  $\alpha$  influeix per tal d'estabilitzar el domini  $\beta$ <sup>[159-160]</sup>. Aquesta baixa estabilitat del domini  $\beta$  MT2 amb metalls divalents va ser corroborada amb la biosíntesis dels dominis mitjançant tècniques d'enginyeria genètica en cultius d'*E. coli* en els quals es va detectar l'expressió dels mRNA dels dos gens però només s'aconseguí aïllar el domini  $\alpha$  amb Cd(II)<sup>[161]</sup>. Un altre metall divalent que presenta característiques especials d'unió a MT2 és el mercuri. Com els anterior, s'uneix formant complexos Hg<sub>7</sub>-MT2 per substitució del Zn(II) en complexos Zn<sub>7</sub>-MT2 aïllats de fetge de conill<sup>[162]</sup>. Aquest metall en excés arriba a formar complexos Hg<sub>18</sub>-MT2, que presenten un CD característic i s'ha proposat que el complex formaria un domini únic per tal d'unir els 18 metalls<sup>[163]</sup>.

Pel que fa a metalls monovalents, concretament s'ha estudiat Cu<sup>+</sup> i Ag<sup>+</sup>. S'ha determinat la formació dels complexos Ag<sub>6</sub>-MT2, Ag<sub>12</sub>-MT2 i, com per al mercuri, Ag<sub>18</sub>-MT2 en afegir aquest metall a apo-MT2 aïllada de fetge de conill<sup>[164]</sup>. Tradicionalment es considera que les MTs de mamífer poden enllaçar 12 Cu<sup>+</sup><sup>[165]</sup>. Així, en diferents treballs, s'ha suggerit una distribució del metall en clústers del tipus Cu<sub>6</sub>(SCys)<sub>9</sub> pel domini  $\beta$  i Cu<sub>6</sub>(SCys)<sub>11</sub> pel domini  $\alpha$ <sup>[17, 24, 166]</sup>. Estudis posteriors de substitució de Cd(II) per Cu(II) han indicat la presència d'una barreja d'espècies Cu-MT2<sup>[158]</sup> i l'aparició de complexos heterometàlics Cd<sub>3</sub>Cu<sub>5</sub>-MT2 parcialment oxidats ja que en afegir Cu(II) a la solució la MT s'oxida, formant-se ponts disulfur entre Cys, i uneix el Cu(I) generat per la reducció del Cu(II)<sup>[167]</sup>. El mateix tipus d'estudi en el domini  $\alpha$  dona lloc a un complex heterometàlic d'estequiometria Cu<sub>4</sub>Cd<sub>1</sub>- $\alpha$ MT2, mentre que en el domini  $\beta$  s'aconseguiria substituir tot el Cd(II) per Cu(I)<sup>[161]</sup>.

Una darrera característica a indicar pel que fa a la isoforma MT2 de mamífer, és la observació de dímers. En les MTs s'han observat diferents tipus de mecanismes de dimerització de proteïna. Els dos més habituals són per oxidació del domini  $\alpha$ , formant-se ponts disulfur entre dos monòmers diferents, o bé per excés de metall, produint una dimerització pel domini  $\beta$ <sup>[33, 168]</sup>. Aquests dos tipus no són l'única manera en què es dona formació de dímers. Així, s'ha observat dimerització dels complexos Zn-MT2 i Cd-MT2 aïllats en fetge de conill<sup>[169-170]</sup>, sovint deguda a excés de metall<sup>[171-173]</sup> o a una alta concentració del complex, com s'ha pogut observar i determinar per NMR en el domini  $\alpha$ <sup>[174]</sup>. Una disminució del senyal en els espectres de DC és indicativa de la formació de dímers en la proteïna a mesura que s'afegeixen més equivalents de metall en la solució<sup>[175]</sup>. Els ions fosfat inorgànics tenen un paper important en la dimerització de les MTs i s'ha pogut observar com els fosfats indueixen la formació del dímer al mateix temps que l'estabilitzen<sup>[176]</sup>. Finalment, un darrer tipus de procés de dimerització observats en MT2 i en MT1 és degut a interaccions hidrofòbiques entre dominis, en funció de les condicions del medi en què es troben<sup>[177]</sup>.

#### **1.4.4 La isoforma MT3 de mamífer**

##### 1.4.4.1 GENÈTICA I FISIOLÒGIA, CARACTERÍSTIQUES DIFERENCIALS DE MT3

Des del seu descobriment, la isoforma MT3 de mamífer ja va revelar diferències importants respecte les altres isoformes. Principalment, aquesta MT s'expressava en el sistema nerviós central i semblava estar implicada en la malaltia d'Alzheimer, ja que la seva expressió es trobava molt reduïda en cervells amb aquesta malaltia<sup>[4-6, 119]</sup>. Posteriorment es va poder determinar que la baixa expressió del gen d'aquesta isoforma no era una causa directa d'aquesta malaltia<sup>[178]</sup>. De fet, la MT3 de mamífer és una de les més estudiades, degut sobretot al seu paper inhibidor del creixement neuronal, motiu pel qual en un primer moment es va anomenar GIF (per *Growth Inhibitory Factor*). Així, es va determinar que MT3 havia de tenir un paper important en el metabolisme del Zn, ja que estava present en les vesícules sinàptiques de les neurones que segresten zinc<sup>[88-89]</sup>. Recentment s'ha pogut observar una correlació entre la concentració de zinc i la d'aquesta isoforma en la pròstata lateral, contràriament al que s'observa per les isoformes MT1 i MT2<sup>[87]</sup>, i això podria estar

relacionat amb una major efectivitat de MT3 en la regulació del Zn degut a una major capacitat i plasticitat en la seva unió<sup>[179]</sup>.

S'ha de ressaltar que la majoria dels estudis realitzats sobre la funcionalitat de MT3 es centren en la capacitat d'inhibició del creixement neuronal, que es dona gràcies a un motiu diferencial en la seqüència primària d'aquesta MT respecte a la de les altres isoformes de mamífer (Figura 6). Concretament, al principi del domini  $\beta$  de MT3 es troba el motiu Cys(6)-Pro-Cys-Pro(9), a diferència de les altres isoformes, que en el lloc de P7 i P9 tenen altres aminoàcids de característiques químiques diferents. Aquesta part de la proteïna confereix la seva acció inhibidora de creixement<sup>[180-181]</sup>. Concretament les dues prolines són indispensables per aquesta funció com han demostrat estudis recents de mutagènesi, bé de les prolines per altres aminoàcids en MT3<sup>[182]</sup>, bé de canvi d'aminoàcids de MT1 per les prolines. En aquest últim cas, s'ha modificat la isoforma MT1 mutant els dos aminoàcids d'aquesta part de la seqüència per 2 prolines. S'ha observat que només amb aquest canvi, la isoforma MT1 adquireix les característiques funcionals de MT3<sup>[183]</sup>. No només aquesta seqüència és necessària per a l'activitat d'inhibició de creixement neuronal. S'ha observat que una mutació en el residu de glutàmic en posició 23 també fa perdre aquesta activitat<sup>[184]</sup> encara que es mantinguin les dues prolines, a més de la necessitat del domini  $\alpha$  i d'una importància del *linker* entre dominis, KKS, per tal d'estabilitzar el clúster del domini  $\beta$  i assegurar-ne la funcionalitat<sup>[185-186]</sup>.

El promotor de MT3 presenta elements de resposta a metall (MRE) com els dels gens de les altres isoformes de MT de mamífer, però no s'observa un augment de transcripció enfront els mateixos estímuls que MT1 i MT2<sup>[108-109, 187-189]</sup>. S'expressa en molts òrgans i teixits de l'organisme, es troba dins la cèl·lula i també en l'espai extracel·lular<sup>[87, 89, 107, 122-126, 190]</sup>. Amb tot, cal centrar-se en la funcionalitat de la isoforma MT3 en el cervell, ja que aquesta representa una tercera part del total de les MTs presents en el SNC<sup>[157]</sup>. Es considera que MT3 és sintetitzada primordialment en els astròcits, en baix nivell, però que augmenta en gran mesura quan es produeix una malaltia neurodegenerativa o un dany cerebral. En aquest moment, és secretada en l'espai extracel·lular, on actuaria sobre les neurones afectades, i, contràriament a

l'observat en els cultius *in vitro*, ajudaria a la recuperació en protegir enfront de radicals oxidants<sup>[191-192]</sup>.

En les malalties neurodegeneratives, com la malaltia d'Alzheimer (AD, per *Alzheimer's disease*), Zn<sub>7</sub>-MT3 interacciona directament amb el pèptid beta-amiloide (A $\beta$ ) que, en acumular-se en el cervell produeix els danys neuronals irreversibles característics d'aquesta malaltia<sup>[107, 193]</sup>. En interaccionar amb els A $\beta$ , redueix el Cu(II) que contenen a Cu(I), oxidant-se i formant ponts disulfur entre Cys. Això provoca l'alliberament del Zn(II), que passa al A $\beta$  i s'impedeix la formació de les fibres de A $\beta$ <sup>[106]</sup>. Així és que MT3 tindria un rol de protecció en el SNC. De fet, les fibres de A $\beta$  produeixen un gran nombre de radicals oxidants, de tipus òxid nítric (NO), i MT3 reacciona amb més efectivitat davant aquests radicals que MT1 o MT2<sup>[194]</sup>. MT3, en reaccionar amb NO alliberaria el Zn que conté, transformant els senyals d'estrès oxidatiu en senyals de Zn que portarien a actuar altres mecanismes de protecció de la cèl·lula, a més d'inhibir l'enzim responsable de la producció d'aquests radicals, la òxid nítric sintasa<sup>[81, 98]</sup>. Aquesta major reactivitat és deguda a les característiques estructurals de MT3. S'ha pogut determinar que en reaccionar amb NO, la isoforma es va desplegant progressivament<sup>[195]</sup> i, a més, la mutació en Glu23 indicada anteriorment afecta directament la seva reactivitat amb el NO<sup>[184]</sup>. Estudis recents han postulat el fet que la disminució de MT3 en la AD sigui deguda als A $\beta$ . D'aquesta manera, MT3 no es troba en suficient quantitat com per poder disminuir l'excés de NO i seria aquesta manca de protecció enfront de radicals oxidants el que afavoriria la mort neuronal<sup>[196]</sup>. La MT3 actua en associació amb altres proteïnes que també augmenten la seva expressió en cas de dany cerebral<sup>[192, 197-198]</sup>. En definitiva, MT3 té un paper clau en la protecció davant l'estrès oxidatiu<sup>[199]</sup>. El fet que s'hagi trobat un augment de la seva expressió en cas d'hipòxia, podria ajudar en la protecció del dany cel·lular produït en la posterior recuperació dels nivells d'oxigen, on es dona una elevada producció de radicals oxidants<sup>[95, 200]</sup>.

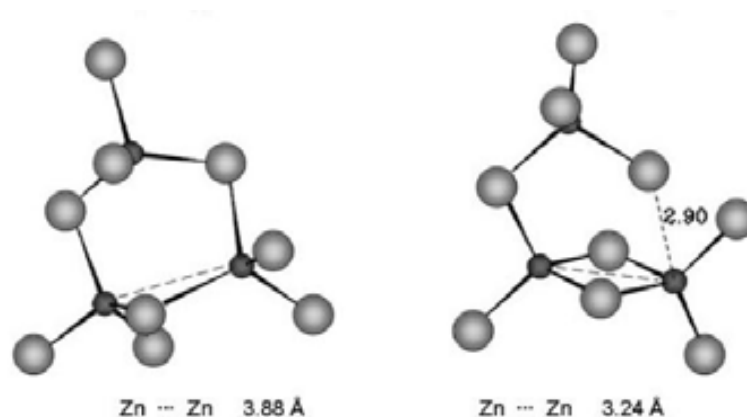
En resum, MT3 tindria un paper biològic diferent en funció de la situació i localització<sup>[190]</sup>. La funció distintiva és la inhibició del creixement neuronal (GIF) quan es troba en l'espai extracel·lular de cultius *in vitro*. MT3 tindria un paper de neuroprotecció, antagonitzant els efectes de les malalties neurodegeneratives i del

dany cerebral estimulant la supervivència neuronal<sup>[201]</sup> i, finalment, tindria un rol important en la homeòstasis del zinc i el coure en trobar-se en l'espai intracel·lular en neurones i altres teixits que presenten una gran quantitat d'aquests metalls<sup>[202]</sup>.

#### 1.4.4.2 CARACTERÍSTIQUES ESTRUCTURALS I DELS COMPLEXOS METÀL·LICS DE MT3

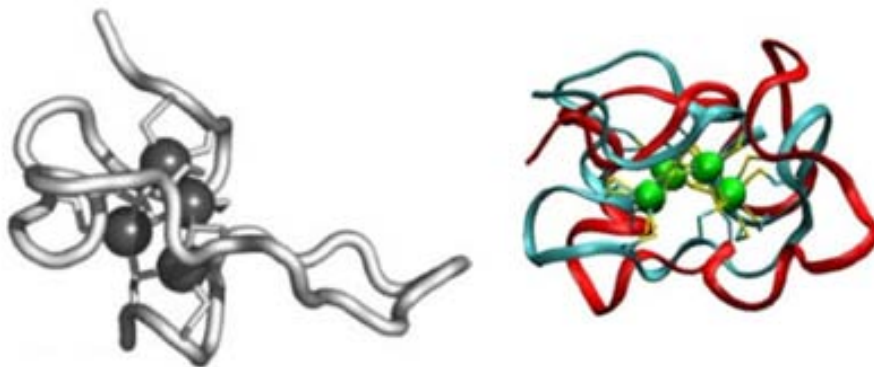
La isoforma MT3 de mamífer presenta, respecte a les altres isoformes, dues diferències principals, mantingudes en totes les MT3 de les diferents espècies del grup taxonòmic (Figura 6). Aquestes diferències són dos inserts, un en el domini  $\beta$ , que presenta una Thr en la posició 5, seguida del motiu C-P-C-P responsable de la funció GIF explicada en l'apartat anterior, i un segon insert de 6 aminoàcids en la part C-terminal de la proteïna. Aquestes insercions són les principals causants de les diferències observades de MT3 respecte MT1 i MT2 en els estudis sobre la seva estructura tridimensional.

L'estructura de MT3 amb metalls divalents consta de dos dominis formats per un clúster de 3 metalls en el domini  $\beta$  i un de 4 metalls en el domini  $\alpha$ <sup>[203-204]</sup>. Els clústers metall-tiolat  $Zn_3Cys_9$  del domini  $\beta$  de  $Zn_7$ -MT3 són semblants als que configuren el mateix domini de la  $Zn_7$ -MT2, però amb una distància entre els àtoms de zinc més petita (Figura 9), tal i com s'ha determinat per difracció de raigs X<sup>[205]</sup>. L'estructura del domini  $\beta$  de  $Cd_7$ -MT3 s'ha obtingut per simulació de dinàmica molecular *in silico*<sup>[206]</sup>. Segons aquesta predicció, el domini  $\beta$  de MT3 tindria un plegament idèntic al de MT2 amb només una diferència local en la Pro9, del motiu C-P-C-P que confereix l'activitat d'inhibició del creixement neuronal<sup>[207-208]</sup>.



**Figura 9:** Estructura proposada per al clúster  $Zn_3Cys_9$  en  $Zn_7$ -MT2 (esquerra) i en  $Zn_7$ -MT3 (dreta). Els metalls es representen com a esferes negres i les Cys com a esferes grises<sup>[202, 205]</sup>.

Pel que fa a l'estructura del domini  $\alpha$  de Cd<sub>7</sub>-MT3, s'ha determinat per NMR la seva semblança amb el mateix domini de Cd<sub>7</sub>-MT2, amb l'hexapèptid insertat en la seqüència que formaria una hèlix  $\alpha$ <sup>[34, 37]</sup> (Figura 10). Aquesta diferència confereix a la proteïna una major flexibilitat<sup>[207]</sup> i modificaria les interaccions inter-domini, és a dir, que aquesta inserció de 6 aas produeix un canvi estructural del domini  $\alpha$  de manera que interacciona amb el domini  $\beta$  modificant l'accés al clúster metall-tiolat respecte a les altres isoformes de MT de mamífer<sup>[208]</sup>.



**Figura 10:** Esquerra: Estructura tridimensional del domini  $\alpha$  de Cd<sub>7</sub>-MT3 determinada per NMR. Dreta: Superposició dels dominis  $\alpha$  de MT3(vermell) i MT2(blau).

Segons els autors l'estructura 3D de Cd<sub>7</sub>-MT3 determinada per RNM pot ser extrapolada a Zn<sub>7</sub>-MT3 si es considera que la substitució del zinc pel cadmi és isoestructural, tal i com s'ha fet en l'estructura de MT2. Malauradament això encara no s'ha pogut determinar clarament. En canvi, si que s'ha demostrat que el reemplaçament del Zn pel Cd no és cooperatiu i que en afegir 7 equivalents de Zn(II) o Cd(II) a la apo-MT3 s'obtenen barreges d'espècies amb diferents graus de metal·lació, mentre que en MT1 s'obté una única espècie M<sub>7</sub>-MT1.<sup>[209-210]</sup>

En el seu descobriment, MT3 fou aïllada en diferents espècies sempre com un complex heterometàl·lic, format generalment per 4 Cu(I) i 3 Zn(II)<sup>[211-213]</sup>. Aquesta característica diferencial va portar a pensar que la proteïna podia unir el coure durant la seva purificació i que en l'organisme es trobaria unida únicament a zinc, però es demostrà que MT3 *in vivo* pot unir els dos metalls<sup>[214]</sup>. Els estudis espectroscòpics per tal de caracteritzar la unió a diferents metalls d'aquesta proteïna han estat molt nombrosos. Així, en les espècies mixtes Cu,Cd-MT3 i Cu,Zn-MT3 s'han determinat

diferències importants entre els espectres de CD i de UV d'aquesta isoforma i els de MT1, que dona lloc sempre a complexos homometàl·lics<sup>[215]</sup>.

En la caracterització espectroscòpica de MT3 en la seva unió a metalls divalents, s'ha pogut comprovar que, com les altres MTs de mamífer, uneix 7 metalls divalents, 3 en el domini  $\beta$  i 4 en el domini  $\alpha$ <sup>[182, 204, 216]</sup>. Però, com s'ha indicat abans, a diferència de MT1, quan s'intenta reconstruir Zn-MT3 des de la proteïna demetal·lada, no s'obté una sola espècie amb 7 Zn(II), sinó una barreja d'espècies on Zn<sub>7</sub>-MT3 és majoritària i Zn<sub>5</sub>-MT3, Zn<sub>6</sub>-MT3 i Zn<sub>8</sub>-MT3 són minoritàries. Això mateix s'observa per Cd<sub>7</sub>-MT3<sup>[217-219]</sup>. La funcionalitat de MT3 està directament relacionada amb el tipus de metall que presenta en la seva estructura. Així, quan el domini  $\beta$  presenta una estructura Zn<sub>3</sub>- $\beta$ MT3, MT3 tindrà activitat GIF, tot i que el domini  $\alpha$  influeix en la correcta funcionalitat de la proteïna<sup>[180]</sup>. En estudis en els quals s'ha modificat la proteïna mitjançant enginyeria genètica, canviant els aas involucrats en l'activitat GIF per els aas existent en MT1 (que no presenta aquesta activitat), s'observen certs canvis en els espectres de DC, al mateix temps que la proteïna perd la seva funcionalitat<sup>[182, 220]</sup>. També s'ha pogut observar que la inserció de l'hexapèptid és la causant de la major estabilitat del domini  $\alpha$  amb 4 Cd(II) respecte les altres isoformes de mamífer<sup>[221]</sup>.

Estudis comparatius entre diferents isoformes de MT de mamífer enfront diferents metalls han arribat a la conclusió que, si bé MT3 presenta una gran estabilitat en la unió als metalls divalents, l'afinitat per aquests, en comparació amb MT2, és baixa<sup>[179]</sup>. Tot i que la isoforma MT3 té una alta capacitat d'unió a metall, fet que permet la unió d'un o dos metalls divalents de més si el metall es troba en excés, això, conjuntament amb la plasticitat de la molècula i la més baixa afinitat per als metalls divalents que les altres isoformes, permetrien una acció en l'homeòstasi del zinc en les zones on hi ha gran concentració d'aquest metall de manera més efectiva que altres isoformes. D'altra banda, MT3 tindria una major estabilitat enfront al coure, sobretot degut a la alta afinitat del domini  $\beta$  per aquest metall, respecte les isoformes MT1 i MT2<sup>[222]</sup>.

Així mateix, en la caracterització de MT3 en relació amb el coure, s'ha observat una diferenciació entre els dominis de preferència d'unió a metalls mono o divalents. De fet, quan s'incorpora Cu(I) a apo-MT3, s'observa la formació d'un complex



intermedi amb 4 Cu<sup>+</sup> molt estable, i posteriorment, en continuar afegint metall, es formen les espècies Cu<sub>6</sub>-MT3 i Cu<sub>12</sub>-MT3<sup>[223]</sup>. De fet, aquest intermedi amb 4 Cu(I) es troba en el domini β<sup>[224]</sup>. En certs estudis de substitució de zinc per coure en Zn<sub>7</sub>-MT3, s'utilitza Cu(II), que provoca l'oxidació de la proteïna formant ponts disulfur, deixant anar el zinc i incorporant Cu(I) a l'estructura. Aquest mecanisme pot explicar com reacciona MT3 per eliminar l'estrès oxidatiu i les fibres Aβ de la malaltia d'Alzheimer<sup>[193]</sup>.

En últim lloc, cal remarcar la diferenciació de preferència metàl·lica que presenten els dominis de la isoforma MT3. Segons els estudis realitzats, el domini β tindria una gran preferència per al coure, formant Cu<sub>4</sub>-βMT3 molt estables a l'aire, mentre que Cu<sub>6</sub>-βMT3 no ho seria tant<sup>[224]</sup>. El domini α, en canvi, tindria molta estabilitat en presència de 4 ions Zn<sup>2+</sup>, tot i que pot incorporar-ne més<sup>[225-227]</sup>.



## **2. OBJECTIUS**



## 2. OBJECTIUS

Durant molt de temps s'ha considerat que les isoformes de metal·lotioneïna de mamífer MT1 i MT2 eren totalment equivalents en funció, de manera que en molts treballs s'al·ludeix conjuntament a "MT1+MT2" o "MT1-2". Però, com ja s'ha indicat en la introducció d'aquest treball, s'ha observat que aquestes proteïnes no actuen de la mateixa manera enfront de diferents metalls, i tindrien una funcionalitat metabòlica no idèntica, indicis que són prou significatius per plantejar la necessitat d'un estudi de la capacitat coordinant de mMT2 i la seva comparació detallada amb mMT1. Per altra banda, s'ha decidit estudiar de la mateixa manera la proteïna mMT3, per tal de comparar-la també amb les altres isoformes de mamífer (4 en total), fet que ens permet comptar amb dades comparables totalment estandarditzades segons la nostra metodologia per a totes les MTs de ratolí.

Així doncs, els objectius d'aquest estudi han estat:

1. Clonar els cDNAs i produir les proteïnes recombinants MT2 i MT3 de ratolí així com els seus dos dominis,  $\beta$  i  $\alpha$ , per separat en medis rics en  $Zn^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$  i  $Cu^{2+}$ .
2. Estudiar les propietats de la coordinació metàl·lica d'ambdues proteïnes i els dominis  $\alpha$  i  $\beta$  corresponents, caracteritzant-ne els complexos biosintetitzats i els complexos formats *in vitro*.
3. Indicar les diferències i/o semblances de la mMT2 respecte la mMT1. Determinar la necessitat de la consideració separada d'ambdues proteïnes en altres estudis.
4. Relacionar les capacitats coordinants d'ambdues proteïnes amb els coneixements actuals de mMT1 i mMT4. Analitzar el significat biològic de les preferències metàl·liques de cada isoforma.
5. Incorporar les 4 MTs de ratolí a la classificació global de les MTs com a Zn- o Cu-tioneïnes. Relacionar la posició d'aquestes MTs en la gradació global, amb els seus patrons d'expressió gènica i les seves possibles funcions.

Aquesta Tesi s'ha realitzat en el si del Grup de Recerca Interuniversitari dirigit per les Dres. Mercè Capdevila, al Departament de Química de la Universitat Autònoma de Barcelona, i Sílvia Atrian al Departament de Genètica de la Universitat de Barcelona. En l'actualitat aquest grup mixt és reconegut per la Generalitat de Catalunya (SGR2009-01457), sota la denominació de "Metal·loproteïnes, Metal·lòmica i Xarxes de Resposta a Metalls".

La síntesi de regions de DNA codificants i la producció de les proteïnes recombinants han estat realitzades al Departament de Genètica de la UB. La caracterització espectroscòpica i espectromètrica dels complexos metall-proteïna així com la preparació dels complexos *in vitro* s'ha dut a terme al Departament de Química de la UAB.

### **3. RESULTATS**





### 3. RESULTATS

En aquest capítol es presenten els resultats de síntesis i caracterització de les metal·lotioneïnes MT2 i MT3 de ratolí, anomenades en aquest treball mMT2 i mMT3.

S'ha dividit aquest capítol en 3 seccions. En la primera es presenta l'obtenció, mitjançant tècniques de biologia molecular i enginyeria genètica de les proteïnes recombinants que s'han utilitzat en aquesta Tesi Doctoral. Seguidament s'expliquen les característiques de coordinació metàl·lica de mMT2 i, en la tercera part, s'indiquen les de mMT3. Aquests estudis permeten el coneixement de la preferència de coordinació metàl·lica de cada proteïna, donant pas a la inserció d'aquestes MT en la classificació general d'aquestes proteïnes realitzada pel nostre grup de recerca<sup>[59]</sup>.

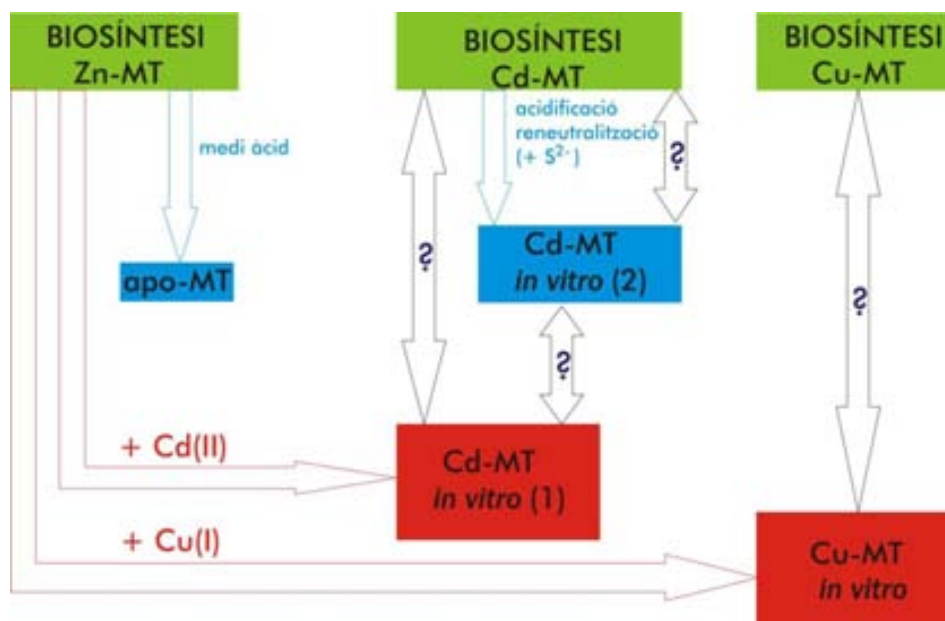
La Figura 11 il·lustra l'esquema experimental global seguit per a l'estudi de les MTs. Es sintetitza la MT a estudiar en medi ric en Zn(II), Cd(II) o Cu(II). Aquests tres tipus de producció s'analitzen per diferents tècniques:

- ICP-OES, per determinar el contingut en metall (Zn, Cd i/o Cu) i sofre de la mostra. Amb aquestes dades es determina la concentració de proteïna i les relacions globals metall/MT de cada mostra.
- ESI-MS, en medi àcid, per comprovar la identitat de la MT i la integritat de la cadena peptídica, i a pH 7 per determinar les diferents espècies presents en la preparació i la seva estequiometria exacta metall-MT.
- DC, que informa sobre el tipus de cromòfors presents i la quiralitat dels agregats metall-MT.

Seguidament es realitzen varis experiments *in vitro* per tal d'analitzar les propietats coordinants de les proteïnes recombinants sintetitzades:

- Anàlisi de l'intercanvi Zn/Cd en afegir Cd(II) als complexos Zn-MT de cada proteïna estudiada. Aquestes preparacions Cd-MT obtingudes *in vitro* es comparen amb les mostres Cd-MT obtingudes per biosíntesi en cultius d'*E. coli*.

- Anàlisi de l'intercanvi Zn/Cu en afegir Cu(I) als complexos Zn-MT de cada proteïna. Aquestes preparacions Cu-MT obtingudes *in vitro* es comparen amb les mostres Cu-MT obtingudes per enginyeria genètica.
- S'estudia el desplegament dels complexos Cd-MT biosintetitzats, acidificant el medi fins que aquests perden tots els Cd(II) inicialment coordinats i, posteriorment, aquestes mostres es reneutralitzen per observar el replegament dels nous complexos Cd-MT generats *in vitro*. Si els complexos Cd-MT biosintetitzats presenten espècies que contenen lligands sulfur, s'afegeix Na<sub>2</sub>S al final del procés de reneutralització. Els complexos Cd-MT generats en aquest procés es comparen amb els complexos Cd-MT recombinants i amb els resultants de les valoracions de les formes Zn-MT amb Cd(II).
- S'estudia l'estabilitat al llarg del temps dels complexos Cd-MT biosintetitzats tot analitzant la variació dels espectres de DC a diferents temps d'evolució.

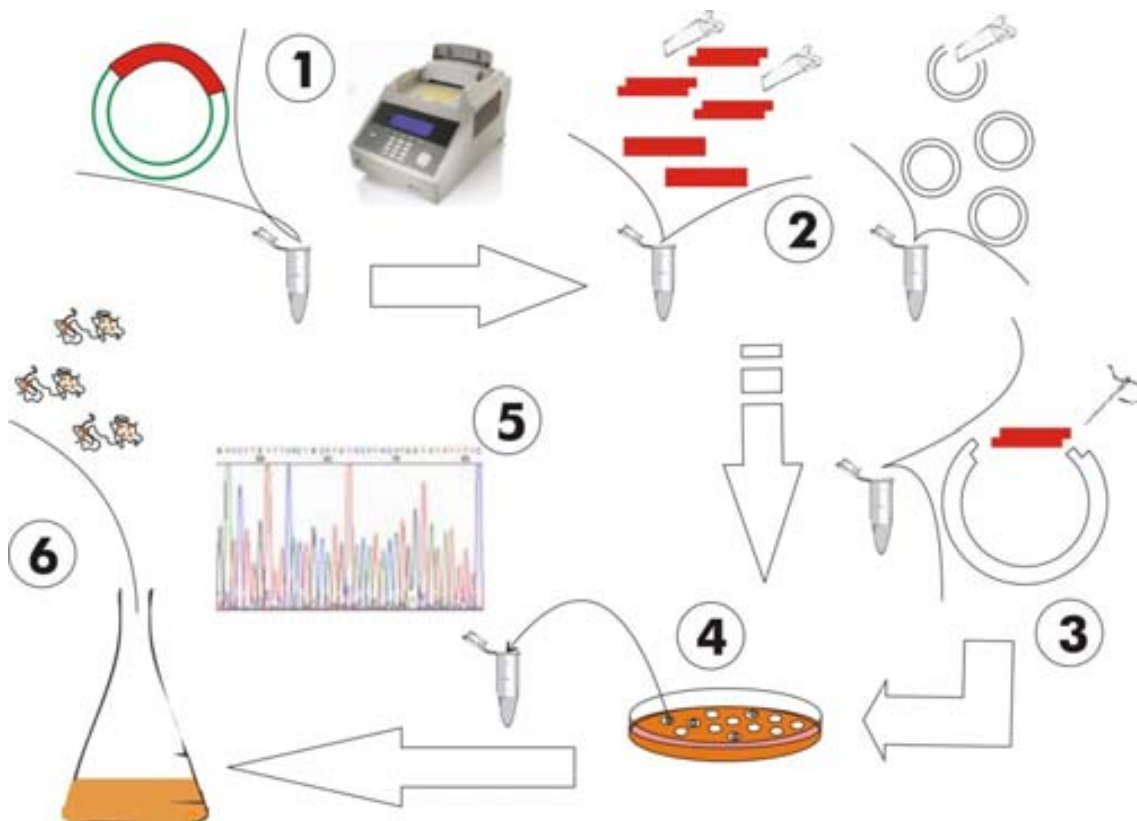


**Figura 11:** Esquema general de la metodologia d'estudi duta a terme per a cada MT.

### 3.1 CLONACIÓ DELS cDNAs I SÍNTESI DE PROTEÏNES RECOMBINANTS

Les tècniques utilitzades per a la producció i síntesi de les MTs així com els seus fragments s'expliquen detalladament en el capítol 6 d'aquesta Tesi. La metodologia segueix els passos que podem veure en la Figura 12, que permet aconseguir les proteïnes a partir de cèl·lules d'*E. coli* transformades amb un vector d'expressió induïble que conté la seqüència de DNA per expressar el gen de MT desitjat.

1. PCR per a l'amplificació de la seqüència desitjada (insert).
2. Digestió del vector i l'insert.
3. Inserció de la seqüència en el vector (clonació).
4. Comprovació de colònies bacterianes positives (aquelles que han introduït el vector amb l'insert).
5. Seqüenciació del clon actual per comprovar l'insert.
6. Transformació en la soca final i producció de proteïnes.

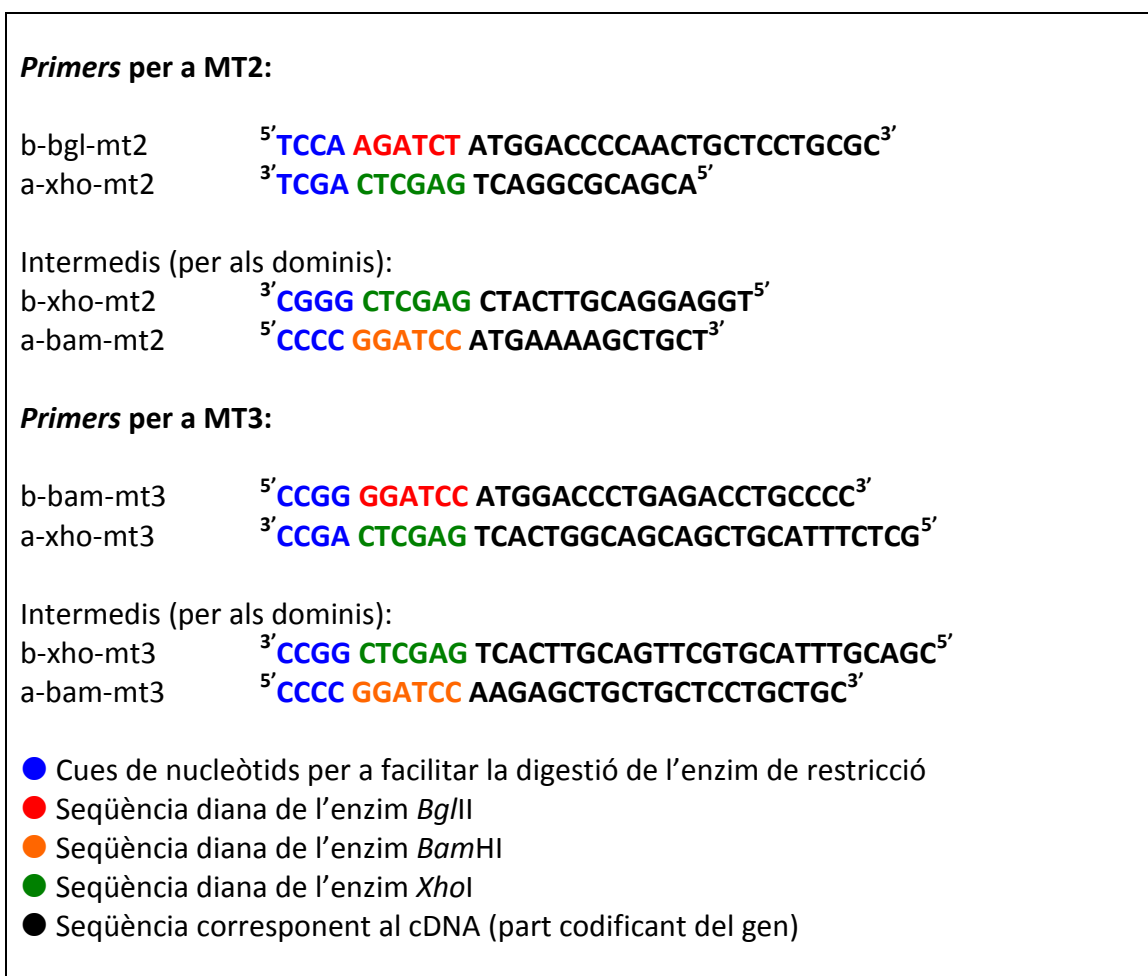


**Figura 12:** Esquema del procés per obtenir les metal·lotioneïnes recombinants.

### 3.1.1 Amplificació de les regions codificants per PCR

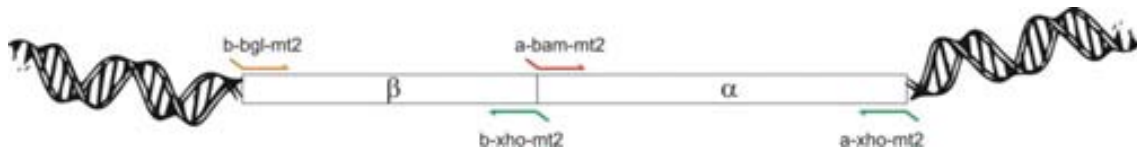
El cDNA codificant per a la proteïna MT2 de ratolí es trobava clonat en el vector pCMV-SPORT6, en la soca de *E. coli* DH10B i el cDNA de la proteïna MT3 de ratolí, en el vector pDNR-LIB, en la soca de *E. coli* DH10B TonA. Ambdues soques amb els corresponents plasmidis varen ser obtingudes comercialment a ImaGenes, clon IRAPp968F1045D per a mMT2 i IRALp962C1853Q per a mMT3.

Es va realitzar l'amplificació dels segments codificants per PCR. Els primers necessaris es van dissenyar a partir dels extrems de la seqüència a amplificar, afegint-hi la seqüència diana de l'enzim de restricció que permet la posterior clonació al *polylinker* del vector d'expressió (pGEX-4T). Les seqüència d'aquests primers estan indicades en la Figura 13.



**Figura 13:** Primers per a les PCR.

Per a mMT2 sencera s'han emprat els *primers* b-bgl-*mt2* i a-xho-*mt2*; per al domini  $\beta$ , els *primers* b-bgl-*mt2* i b-xho-*mt2* i per al domini  $\alpha$ , els *primers* a-bam-*mt2* i a-xho-*mt2*, tal i com s'indica en la Figura 14. Per a mMT3 sencera, els *primers* utilitzats són b-bam-*mt3* i a-xho-*mt3*; per al domini  $\beta$ , b-bam-*mt3* i b-xho-*mt3*, i finalment, per al domini  $\alpha$ , els *primers* a-bam-*mt3* i a-xho-*mt3*.

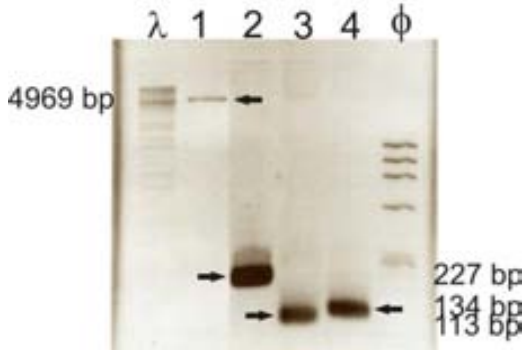


**Figura 14:** Esquema de la posició dels *primers* per la PCR en el cDNA de mMT2.

Un cop realitzada la PCR, es comprovà el resultat de l'amplificació en el gel d'agarosa, per tal de determinar que el producte de la PCR fos de la mida esperada, en parells de bases (bp). Els gels es mostren en la Taula 3 i la Taula 4.

mMT2	<i>primers</i>	gel d'agarosa	
sencera	b-bgl- <i>mt2</i> a-xho- <i>mt2</i>		Quantificació aproximada: pGEX: 14 ng / 5 $\mu$ l $\rightarrow$ 3 ng / $\mu$ l mMT2: 10 ng / 5 $\mu$ l $\rightarrow$ 2 ng / $\mu$ l $\beta$ mMT2: 20 ng / 5 $\mu$ l $\rightarrow$ 4 ng / $\mu$ l
domini $\beta$	b-bgl- <i>mt2</i> b-xho- <i>mt2</i>		
domini $\alpha$	a-bam- <i>mt2</i> a-xho- <i>mt2</i>		L'amplificació és inespecífica, per la qual cosa es retallà la banda d'amplificació que té la mida esperada.

**Taula 3:** Gels d'agarosa per a cDNAs de mMT2. Les fletxes indiquen les bandes on es troben els productes d'interès.  $\lambda$ : marcador de pes molecular Lambda DNA/*EcoRI*+*HindIII* Marker, 3 de Fermentas. 1: amplificació per PCR del cDNA de mMT2. 2: vector pGEX. 3: amplificació per PCR del cDNA de  $\beta$ mMT2. 4: amplificació per PCR del cDNA de  $\alpha$ mMT2, el requadre vermell indica la banda de gel retallada i purificada. L: marcador de pes molecular Low Molecular Weight DNA Ladder de New England BioLabs.

mMT3	primers	gel d'agarosa
sencera	b-bam-mt3 a-xho-mt3	 <p>Quantificació aproximada:</p> <p>pGEX: 53 ng / 5 <math>\mu</math>l      <math>\rightarrow</math> 10.6 ng / <math>\mu</math>l  mMT3: 1100 ng / 5 <math>\mu</math>l      <math>\rightarrow</math> 220 ng / <math>\mu</math>l  <math>\beta</math>mMT3: 220 ng / 5 <math>\mu</math>l      <math>\rightarrow</math> 44 ng / <math>\mu</math>l  <math>\alpha</math>mMT3: 220 ng / 5 <math>\mu</math>l      <math>\rightarrow</math> 44 ng / <math>\mu</math>l</p>
domini $\beta$	b-bam-mt3 b-xho-mt3	
domini $\alpha$	a-bam-mt3 a-xho-mt3	

**Taula 4:** Gels d'agarosa per a cDNAs de mMT3. Les fletxes indiquen les bandes on es troben els productes d'interès.  $\lambda$ : marcador de pes molecular Lambda DNA/*EcoRI*+*HindIII* Marker, 3 de Fermentas. 1: vector pGEX. 2: amplificació per PCR del cDNA de mMT3. 3: amplificació per PCR del cDNA de  $\beta$ mMT3. 4: amplificació per PCR del cDNA de  $\alpha$ mMT3.  $\phi$ : marcador de pes molecular  $\phi$ X174 DNA-*HAelIII* Digest de New England BioLabs.

### 3.1.2 Clonació, transformació i seqüenciació

El producte de PCR tenia una seqüència diana per a un enzim de restricció en cadascun dels extrems que va permetre la seva clonació en els plasmidis desitjats, com s'indica en el capítol 6.

Els resultats de la clonació i la transformació bacterianes es mostren en la Taula 5 i la Taula 6.

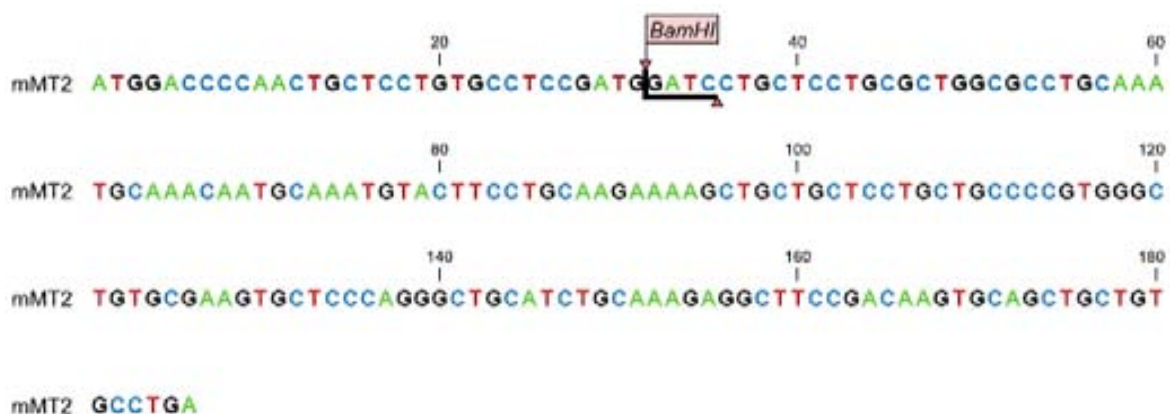
mMT2	CLONACIÓ	TRANSFORMACIÓ colònies positives
	enzims de restricció	
sencera	INSERT: <i>Bgl</i> III i <i>Xho</i> I VECTOR: <i>Bam</i> HI i <i>Xho</i> I	
domini β	En els últims 20' es desfosforil·la el vector.	
domini α	INSERT i VECTOR: <i>Bam</i> HI i <i>Xho</i> I  Quantificació aproximada: pGEX: 10 ng / 5 μl → 2 ng / μl αmMT2: 5 ng / 5 μl → 1 ng / μl	

**Taula 5:** Clonació i transformació bacterianes per a mMT2. En els gels d'agarosa, λ: marcador de pes molecular Lambda DNA/*Eco*RI+*Hind*III Marker, 3 de Fermentas. 1 a 12 i 14 a 23: digestió amb *Sca*I de l'extracció de cDNA de les colònies obtingudes en transformar cèl·lules d'*E. coli* DH5α amb el producte de la lligació de pGEX amb βmMT2. 13: digestió del vector pGEX sense insert. 24 i 25: digestió amb *Sca*I de l'extracció de cDNA de les colònies obtingudes en transformar cèl·lules d'*E. coli* DH5α amb el producte de la lligació de pGEX amb mMT2. φ: marcador de pes molecular φX174 DNA-HAeIII Digest de New England BioLabs. 26: insert de αmMT2 després de digerir. 27: vector pGEX. 28 a 30: digestió amb *Sca*I de l'extracció de cDNA de les colònies obtingudes en transformar cèl·lules d'*E. coli* DH5α amb el producte de la lligació de pGEX amb αmMT2. Les fletxes negres verticals indiquen els clons potencialment positius en relació amb el pGEX sense insert (fletxa vermella vertical). Les fletxes negres horitzontals indiquen les bandes de cDNA utilitzades per a la quantificació relativa.

mMT3	CLONACIÓ	TRANSFORMACIÓ colònies positives
	enzims de restricció	
sencera	INSERT i VECTOR: <i>Bam</i> HI i <i>Xho</i> I.  En els últims 20' es desfosforil·la el vector	
domini $\beta$		
domini $\alpha$		

**Taula 6:** Clonació i transformació bacterianes per a mMT3.  $\lambda$ : marcador de pes molecular Lambda DNA/*Eco*RI+*Hind*III Marker, 3 de Fermentas. 1: digestió del vector pGEX sense insert. 2 i 3: digestió amb *Sca*I de l'extracció de cDNA de les colònies obtingudes en transformar cèl·lules d'*E. coli* DH5 $\alpha$  amb el producte de la lligació de pGEX amb  $\alpha$ mMT3. 3 a 8: digestió amb *Sca*I de l'extracció de cDNA de les colònies obtingudes en transformar cèl·lules d'*E. coli* DH5 $\alpha$  amb el producte de la lligació de pGEX amb  $\beta$ mMT3. 9 a 18: digestió amb *Sca*I de l'extracció de cDNA de les colònies obtingudes en transformar cèl·lules d'*E. coli* DH5 $\alpha$  amb el producte de la lligació de pGEX amb mMT3. Les fletxes negres indiquen els clons potencialment positius en relació amb el pGEX sense insert (fletxa vermella).

Dels clons positius segons aquests criteris es va obtenir DNA plasmídic, que es va utilitzar per seqüenciar. Després, d'entre tots els clons seqüenciats, es van seleccionar aquells que tenien la seqüència correcta, que es mostra en la Figura 15 i la Figura 16 per a mMT2 i mMT3 respectivament. Els resultats de les seqüenciacions detallats es mostren en les làmines 1 a 6 per a mMT2 i 7 a 12 per a mMT3.



**Figura 15:** Seqüència codificant de la proteïna en el clon utilitzat per a la producció de MT2 de ratolí. S'indica la diana per a l'enzim de restricció *Bam*HI. Aquest punt de tall intern a la seqüència va propiciar que els primers per aquest cDNA el del domini  $\beta$  es clonessin per al lloc de restricció *Bgl*II.



```

                20                40                60
mMT3  ATGGACCCTGAGACCTGCCCTGTCCTACTGGTGGTTCCTGCACCTGCTCGGACAAATGC
                80                100               120
mMT3  AAGTGCAAGGGCTGCAAATGCACGAACTGCAAGAAGAGCTGCTGCTCCTGCTGCCCTGCC
                140               160               180
mMT3  GGATGTGAGAAAGTGTGCCAAGGACTGTGTGTGCAAAGGTGAAGAGGGGGCCAAGGCAGAG
                200
mMT3  GCCGAGAAATGCAGCTGCTGCCAGTGA

```

**Figura 16:** Seqüència codificant de la proteïna en el clon utilitzat per a la producció de mMT3.

La traducció d'aquestes seqüències de DNA a proteïna permet comprovar que les proteïnes produïdes tindran la seqüència esperada, indicada en la Figura 17.

```

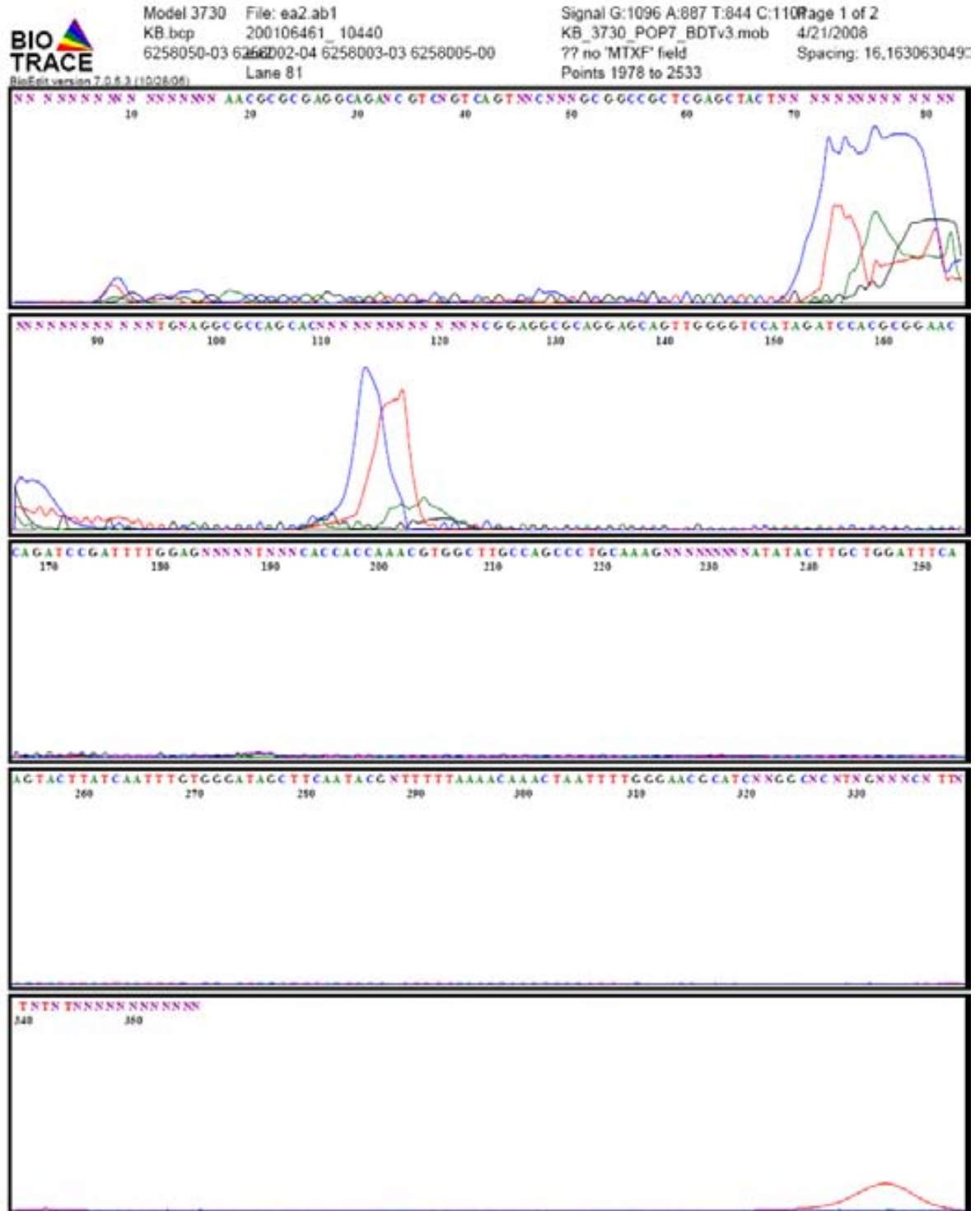
                20                40                60
mMT2-prot  MDPN-CSCAS DGSCSCAGAC KCKQCKCTSC KKSCCSCPV GCA-KCSQGC ICK-----E ASDKSCCA* 62
mMT3-prot  MDPETCPPT GGSCTCSDKC KCKGCKCTNC KKSCCSCPV GCEK-CAKDC VCKGEEGAKA EAEKSCCQ* 69

```

**Figura 17:** Seqüència aminoacídica de les proteïnes recombinants MT2 i MT3 de ratolí. Els aminoàcids estan acolorits segons les seves propietats: en blau els que tenen càrrega positiva, en vermell els que tenen càrrega negativa, en verd els aminoàcids neutres polars i en negre els apolars. Les ratlles indiquen els GAPS o "buits de seqüència".

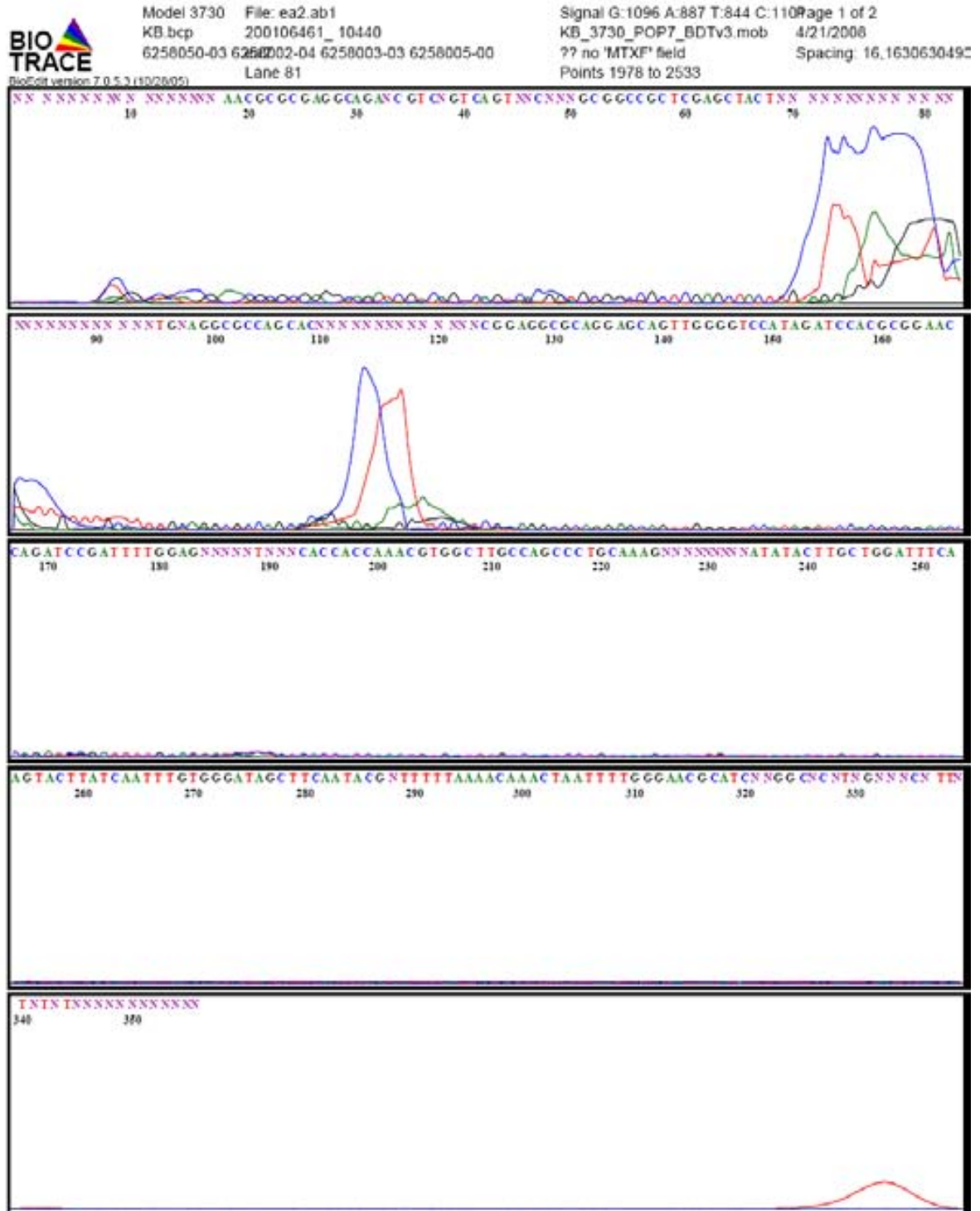


## LÀMINA 2. Seqüenciació de mMT2 en sentit invers



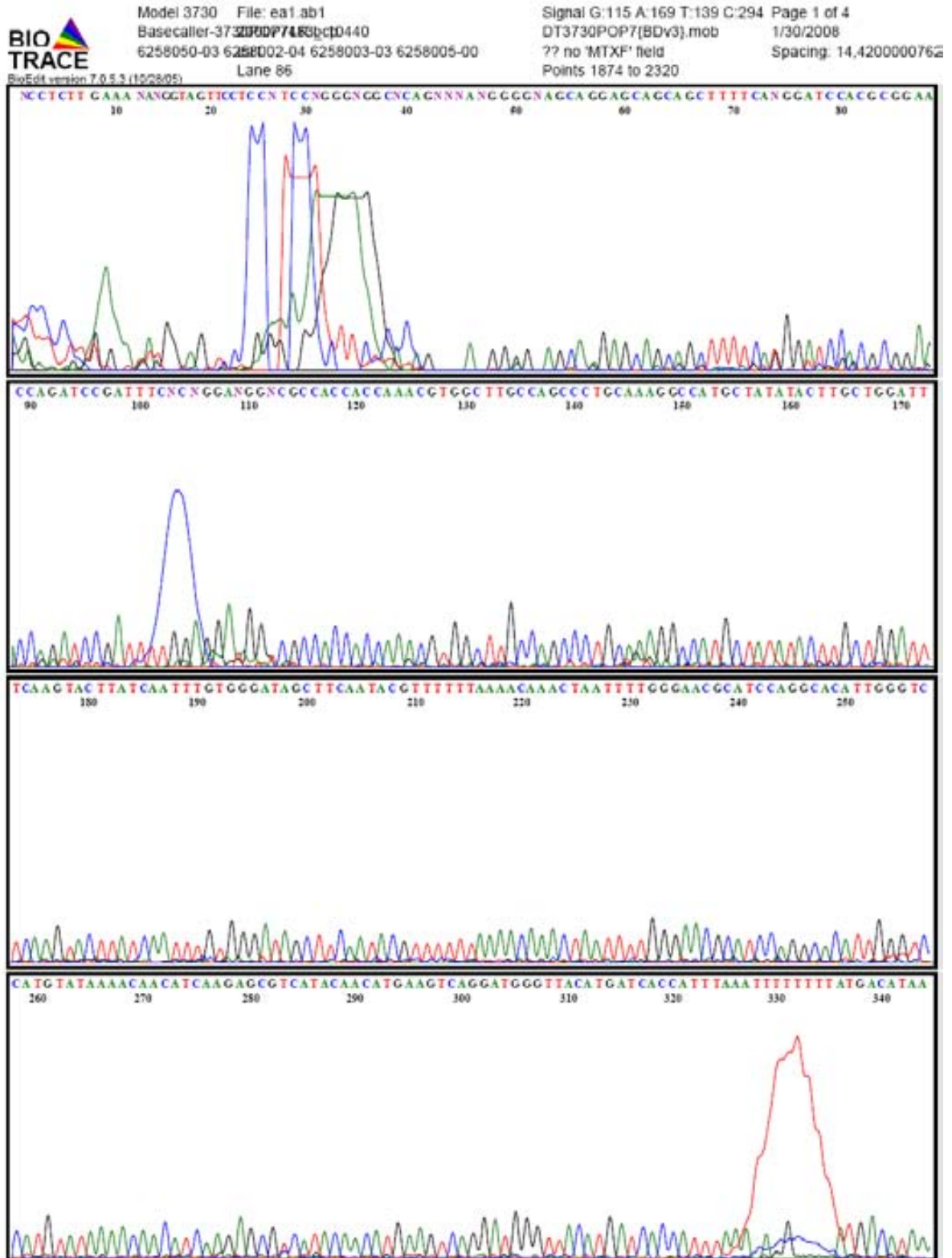


# LÀMINA 4. Seqüenciació de $\beta$ mMT2 en sentit invers

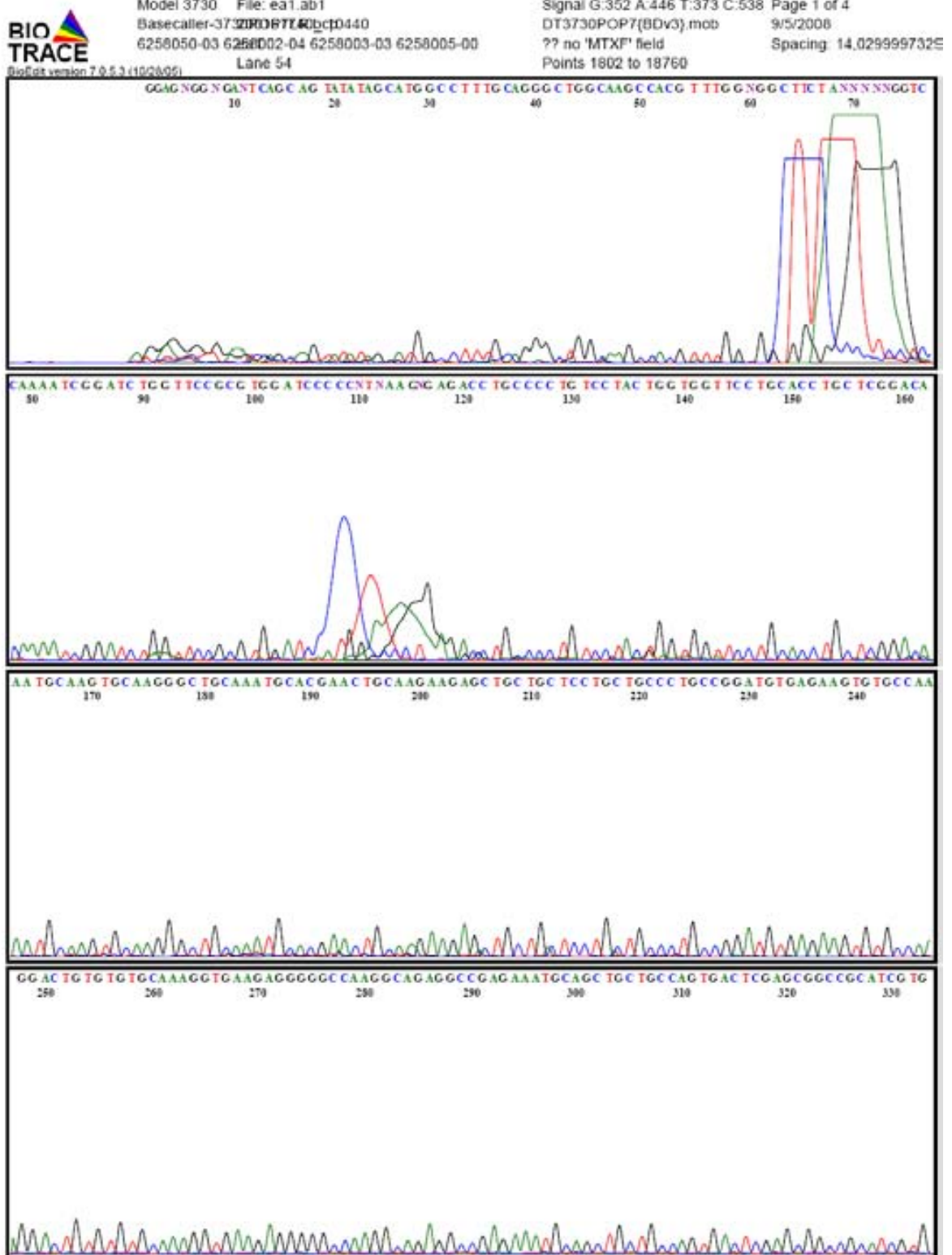




# LÀMINA 6. Seqüenciació de $\alpha$ MT2 en sentit invers

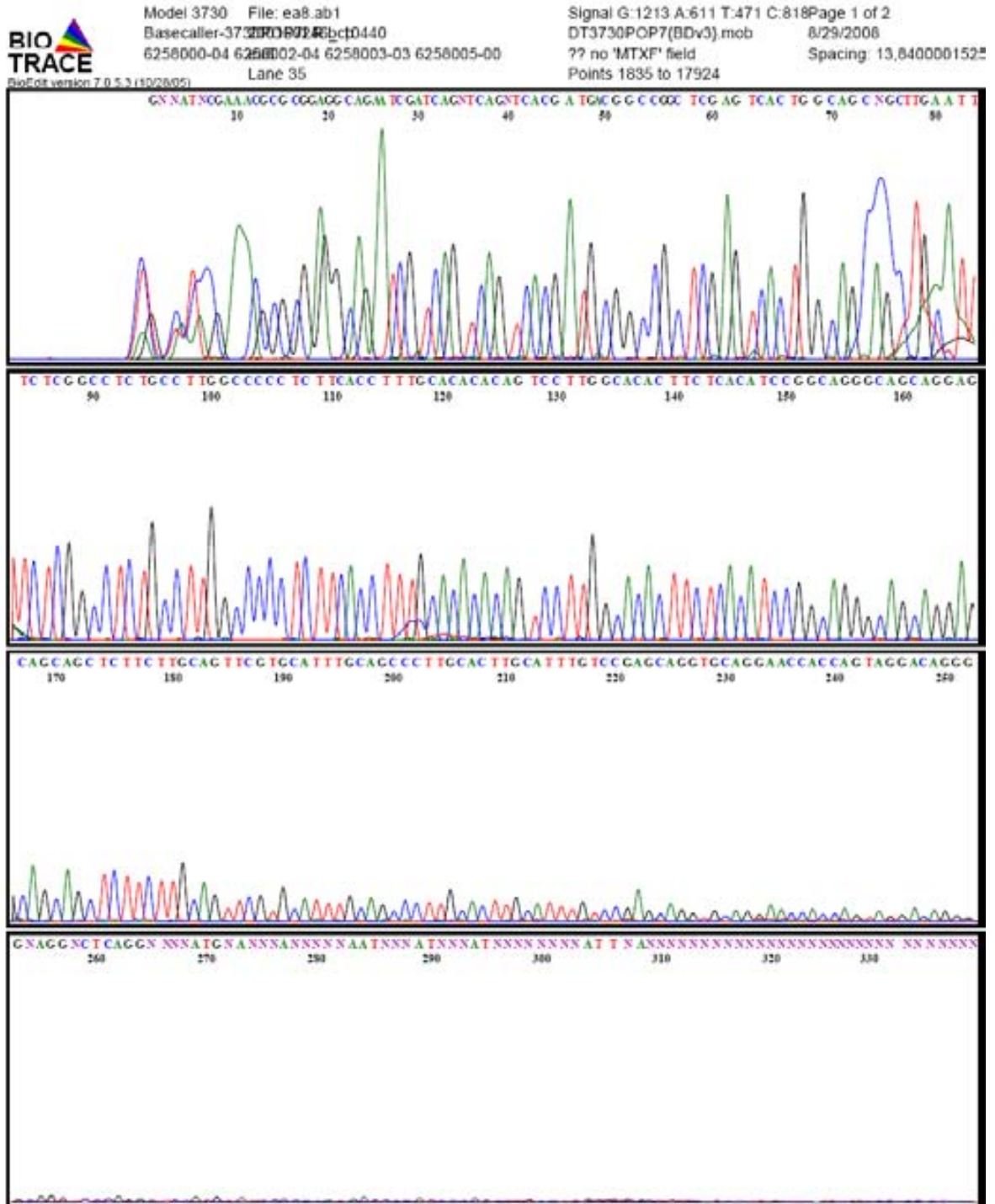


# LÀMINA 7. Seqüenciació de mMT3





# LÀMINA 8. Seqüenciació de mMT3 en sentit invers

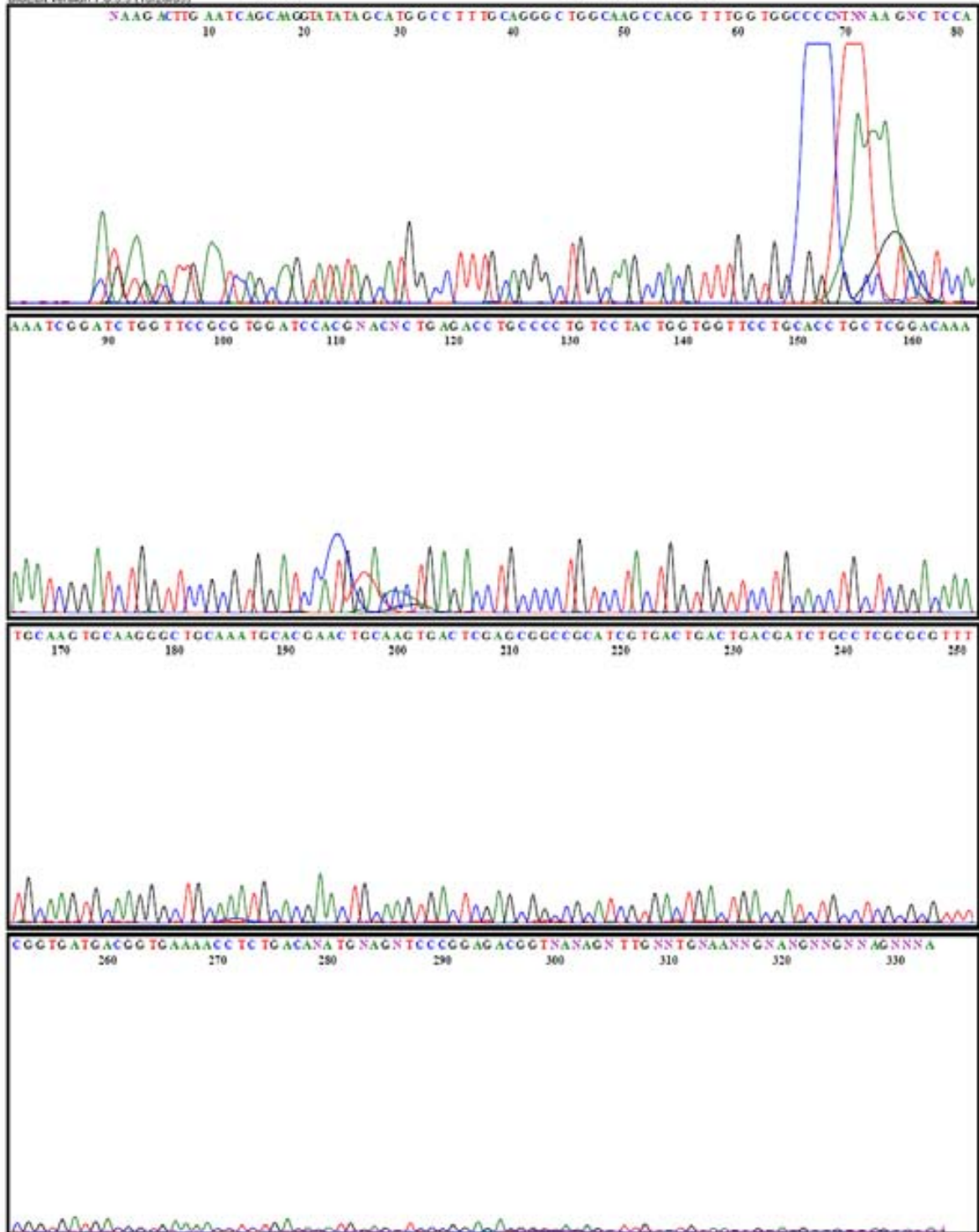


# LÀMINA 9. Seqüenciació de $\beta$ mMT3

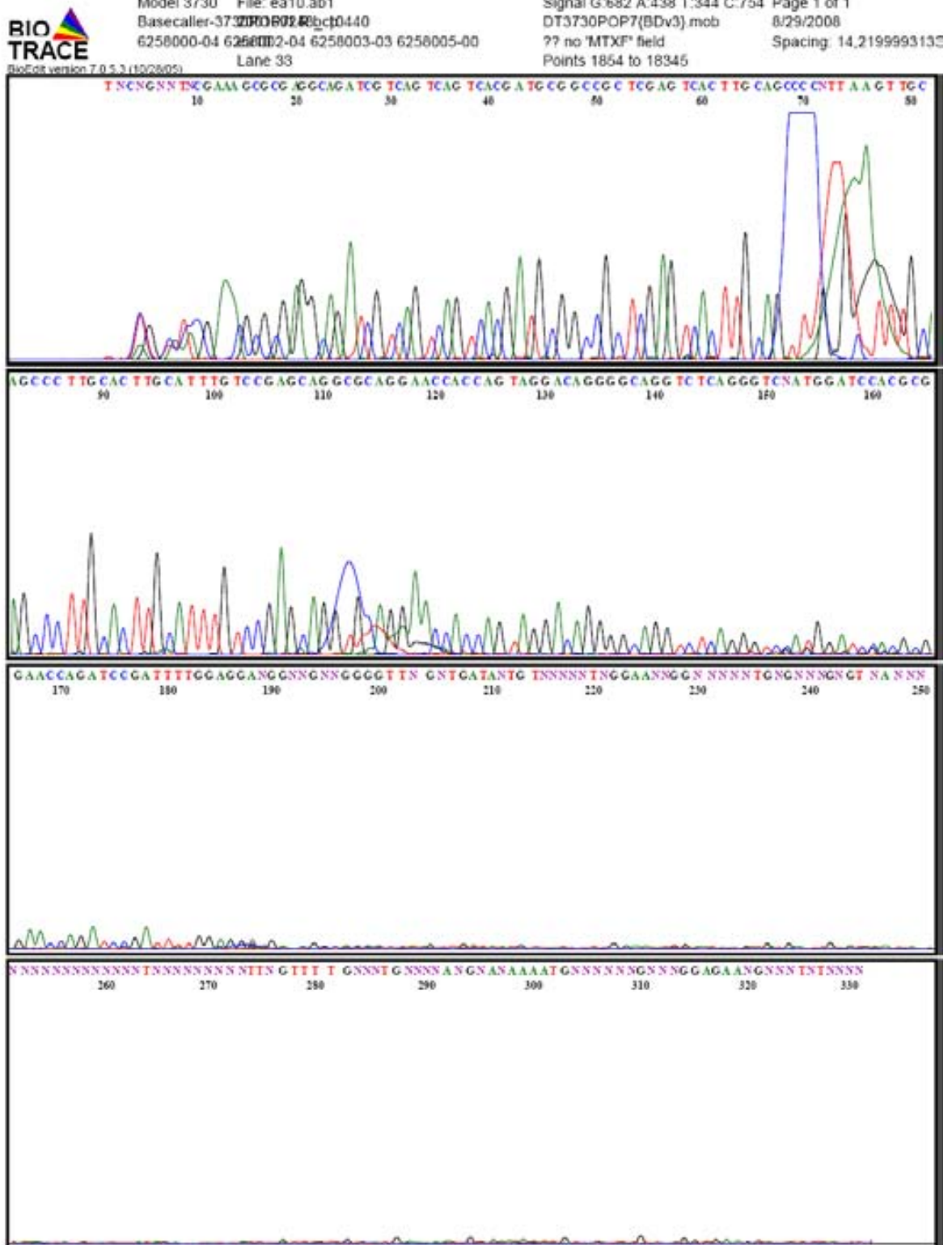


Model 3730 File: ea9.ab1  
Basecaller: 3730POP7(BDv3).mob  
6258000-04 6258002-04 6258003-03 6258005-00  
Lane 34

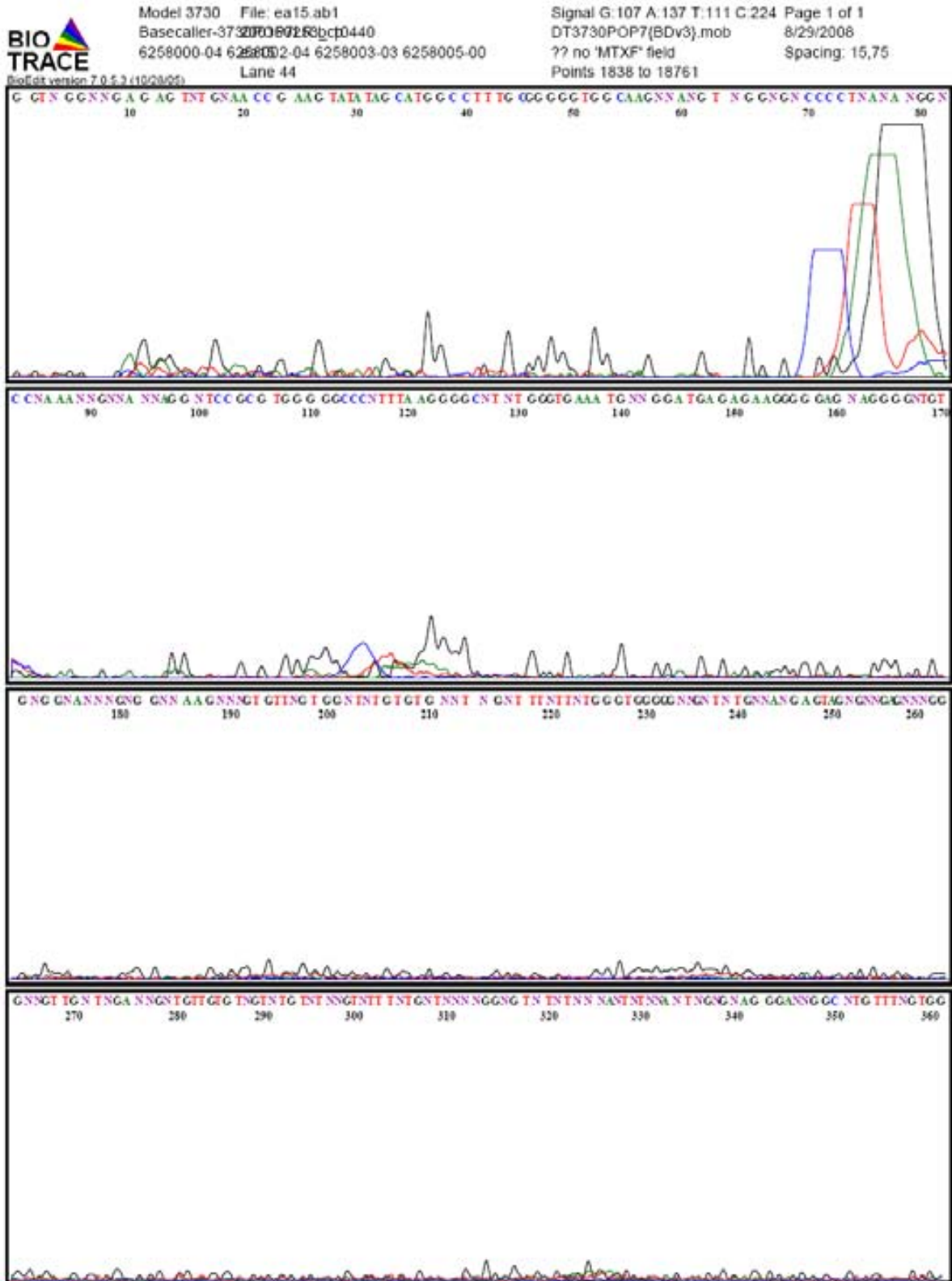
Signal G 1058 A 718 T 569 C 106  
DT3730POP7(BDv3).mob 8/29/2008  
?? no 'MTXF' field Spacing: 14,0299997329  
Points 1808 to 17779



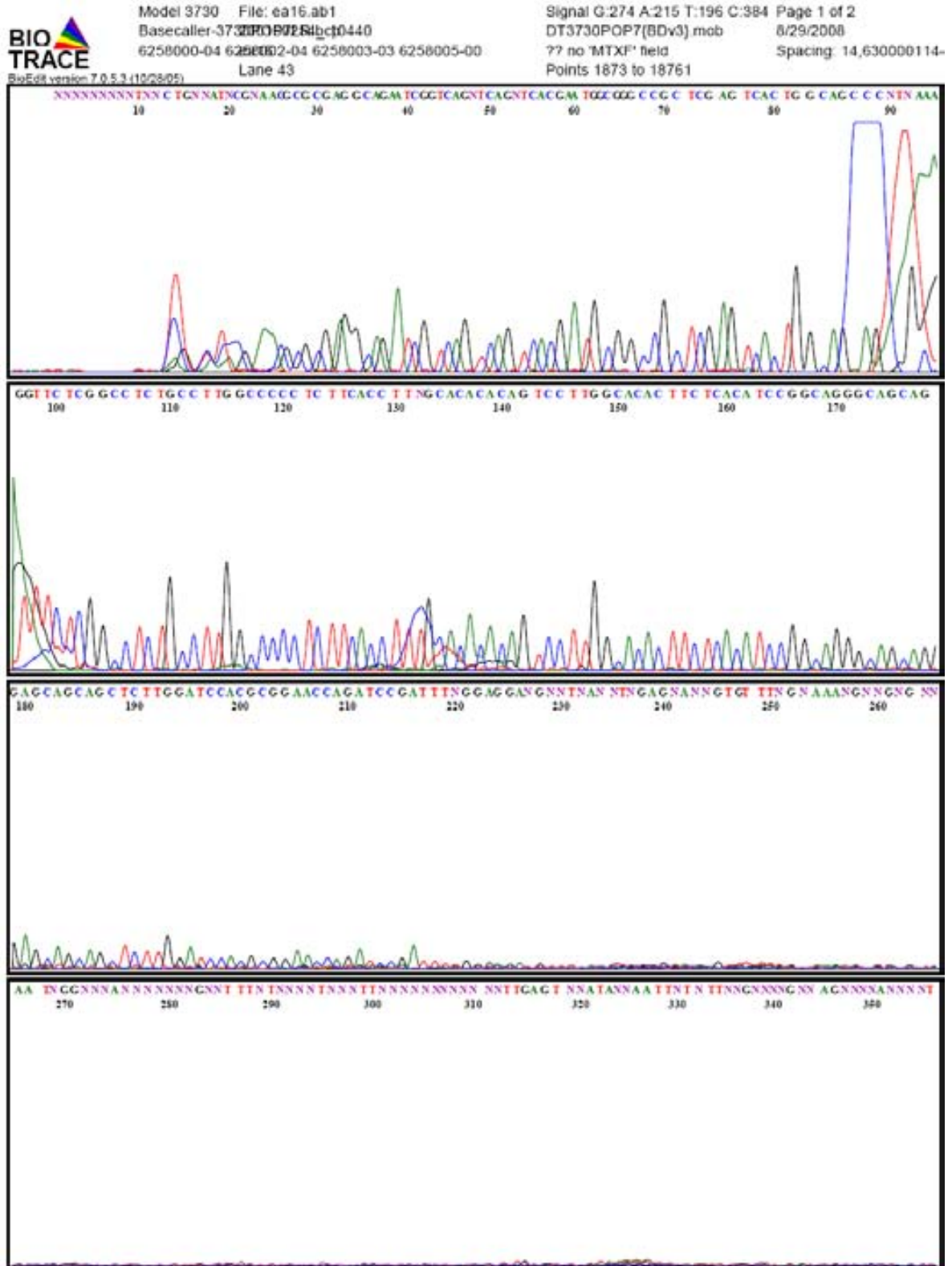
# LÀMINA 10. Seqüenciació de $\beta$ mMT3 en sentit invers



# LÀMINA 11. Seqüenciació de $\alpha$ MT3



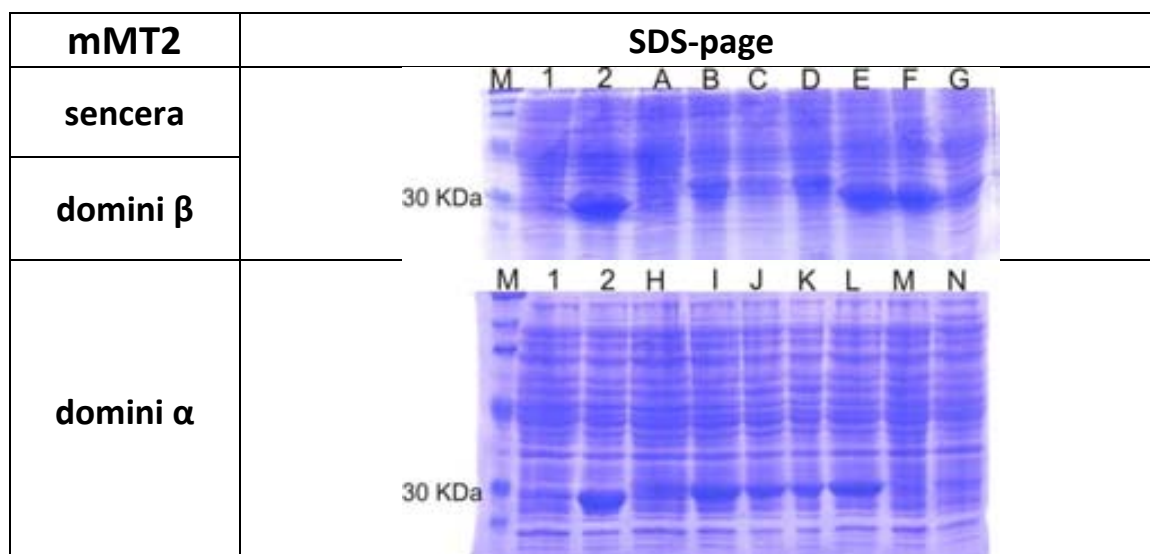
# LÀMINA 12. Seqüenciació de amMT3 en sentit invers



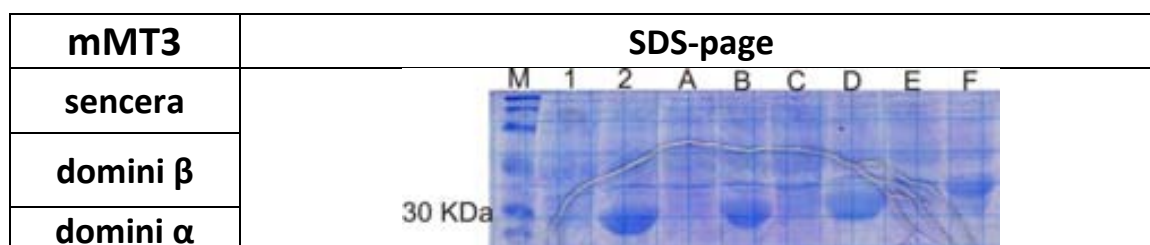
### 3.1.3 Produccions a escala analítica

Seguint el procediment indicat en el capítol 6, es transformà la soca de *E. coli* BL21 amb el vector que conté la seqüència correcta.

Es realitzà una producció en 3 mL de cultiu per comprovar la síntesi de la proteïna recombinant per part de les cèl·lules transformades. Els gels de poliacrilamida es mostren en la Taula 7 i la Taula 8.



**Taula 7:** Gel de poliacrilamida-SDS per a MT2 de ratolí. M: marcador de pes molecular (SDS-Page Standard #161-0318 de Bio-Rad). 1 i 2: extracte proteic dels cultius cel·lulars transformats amb el vector sense insert, induïts (2) i no induïts (1). A, B, C i D: extracte proteic dels cultius cel·lulars dels transformats per produir la mMT2 sencera; sense induir (A), induït (B), induït i amb Zn afegit al cultiu bacterià (C), induït i amb Cu afegit (D). E, F i G: extracte proteic dels transformats per produir el domini  $\beta$  de la mMT2; sense induir (E), induït (F), induït i amb Cu afegit al cultiu (G). H, I, J, K, L: extracte proteic dels cultius cel·lulars transformats per produir el domini  $\alpha$  de la mMT2, clon 1, sense induir (H), induït (I), induït i Cu afegit al cultiu (J i K), induït i amb Zn afegit (L). M, N: extracte proteic dels cultius cel·lulars dels transformats per produir el domini  $\alpha$  de la mMT2, clon 2, sense induir (M), induït i amb Cu afegit al cultiu bacterià (N).



**Taula 8:** Gel de poliacrilamida-SDS per a MT3 de ratolí. M: marcador de pes molecular (SDS-Page Standard #161-0318 de Bio-Rad). 1 i 2: extracte proteic dels cultius cel·lulars transformats amb el vector sense insert, induïts (2) i no induïts (1). A i B: extracte proteic dels cultius cel·lulars dels transformats per produir  $\alpha$ mMT3; sense induir (A) i induït (B). C i D: extracte proteic dels transformats per produir el domini  $\beta$  de mMT3; sense induir (C) i induït (D). E i F: extracte proteic dels cultius cel·lulars transformats per produir mMT3, sense induir (E) i induït (F).

En aquest punt, es procedeix a la síntesi en gran escala de cada proteïna recombinant, enriquint el medi amb Zn(II), Cd(II) o Cu(II) tal i com s'explica en el capítol 6. Els resultats i caracterització dels complexos metàl·lics corresponents es presenten en l'apartat següent.





### 3.2 ESTUDI DE LA COORDINACIÓ METÀL·LICA PER PART DE LA MT2 DE RATOLÍ

En aquest apartat es presenta primer, la caracterització de la proteïna recombinant MT2 de ratolí sintetitzada en medis rics en Zn(II), Cd(II) i Cu(II), aquest últim metall en condicions de cultiu en oxigenació normal i baixa, així com dels seus dos dominis per separat. Després es donen els resultats de les anàlisis espectroscòpiques i espectromètriques realitzades sobre aquestes preparacions i que han servit per a determinar la preferència d'enllaç de la mMT2 per metalls mono o divalents.

La producció de la proteïna recombinant en medis rics en aquests metalls s'ha fet seguint el protocol explicat en el capítol 6. Els complexos metall-proteïna obtinguts s'han caracteritzat pels mètodes espectromètrics i espectroscòpics indicats en el mateix capítol 6.

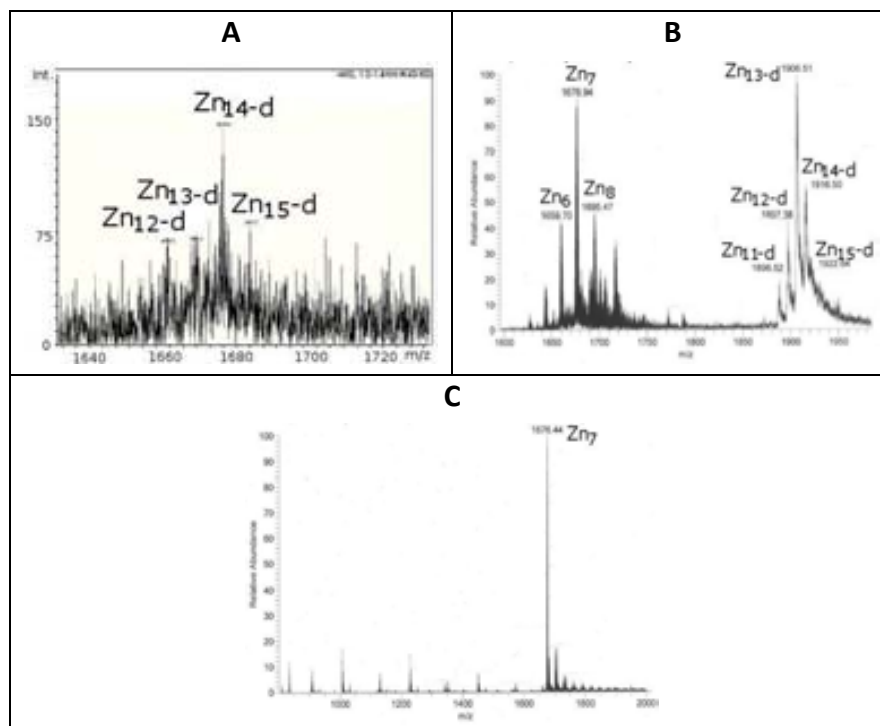
### 3.2.1 Caracterització dels complexos M-mMT2 (M= Zn(II), Cd(II) i Cu(I)) biosintetitzats

#### 3.2.1.1 mMT2

Els resultats de la caracterització de la proteïna recombinant de ratolí MT2 produïda en medis rics en Zn(II) i Cd(II) es troben resumits en la Taula 9 i per Cu(II) en la Taula 10.

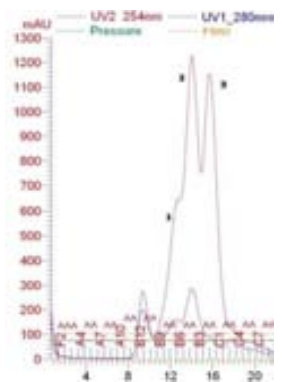
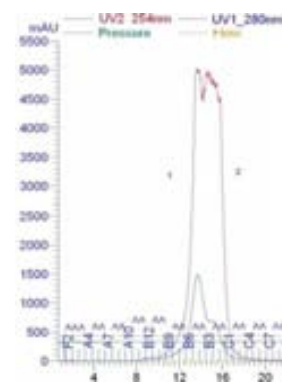
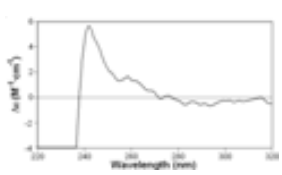
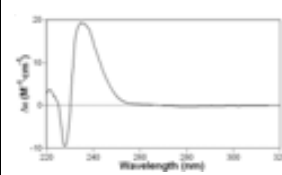
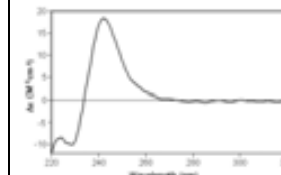
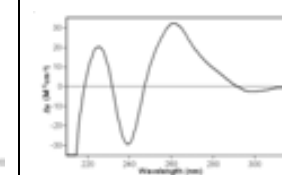
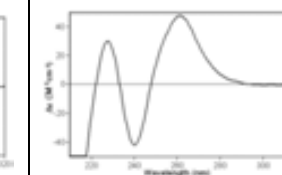
La purificació per FPLC de mMT2 recombinant, produïda en un medi ric en Zn(II), proporciona 3 pics o fraccions diferents, suggerint l'existència de 3 productes separables per mida, el més gran obtingut el primer (primera fracció o F1), un segon producte de mida intermèdia (F2) i una darrera fracció amb productes de mida més petita (F3).

Les anàlisis per ESI-MS d'aquestes tres fraccions (Figura 18) permeten concretar que la F1 està constituïda per espècies dimèriques Zn-(mMT2)<sub>2</sub>, en la segona hi ha una barreja de dímers i monòmers mentre que en la tercera s'obté la MT monomèrica coordinant 7 Zn<sup>2+</sup>, tal i com s'esperava.



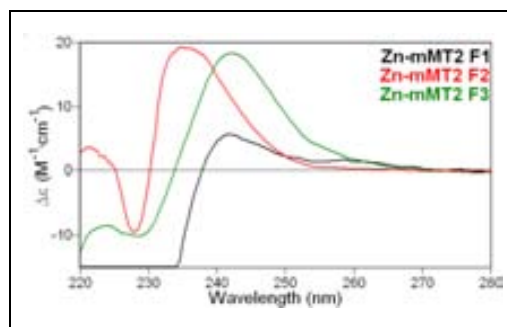
**Figura 18:** Espectres d'ESI-MS obtinguts per a mMT2 produïda en medi ric amb Zn(II). Primera fracció (A), segona fracció (B) i tercera fracció (C) de FPLC.

Taula 9: Caracterització de les produccions de mMT2 en medis rics en Zn(II) i Cd(II).

mMT2		Zn			Cd	
Cromatograma *						
mg de MT		3.47 mg en 5 L de cultiu			0.90 mg en 5 L de cultiu	
		<b>F1</b>	<b>F2</b>	<b>F3</b>	<b>F1</b>	<b>F2</b>
ICP-OES "conv"	[MT] (M)	$0.22 \times 10^{-4}$	$1.25 \times 10^{-4}$	$1.99 \times 10^{-4}$	$0.40 \times 10^{-4}$	$0.76 \times 10^{-4}$
	Metall / MT	4.69 Zn	5.75 Zn	6.62 Zn	2.92 Cd	5.32 Cd
ICP-OES "àcid"	[MT] (M)	$0.14 \times 10^{-4}$	$1.22 \times 10^{-4}$	$2.09 \times 10^{-4}$	$0.12 \times 10^{-4}$	$0.48 \times 10^{-4}$
	Metall / MT	7.27 Zn	5.95 Zn	7.06 Zn	11.2 Cd	9.27 Cd
ESI-MS <sup>&amp;</sup>		dímers $Zn_x-(mMT2)_2$ x = 12-15 Zn	$Zn_7$ -MT2 (✓) i dímers	$Zn_7$ -MT2	$Cd_7$ -MT2 (✓) $Cd_7S_2$ -MT2 (o)	$Cd_7$ -MT2 (✓) $Cd_7S_2$ -MT2 (o)
DC						

(\*) Perfil d'elució obtingut per FPLC en la purificació dels complexos metall-MT. (&) a pH 7.0, excepte quan s'indiqui específicament. (✓) espècie majoritària, (o) espècie minoritària.

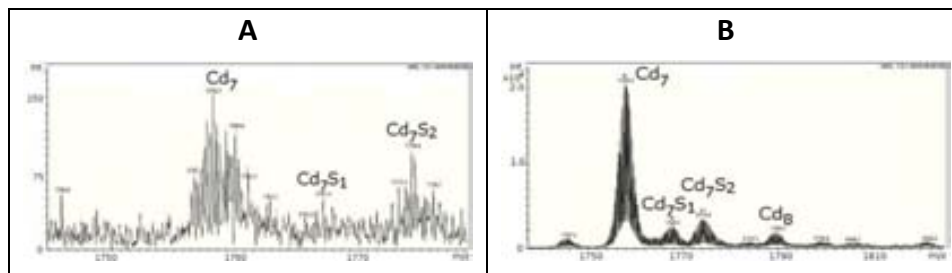
Els espectres de DC de les fraccions F3 (monòmers) i F1 (dímers) presenten una gaussiana a 240 nm i no el típic *exciton coupling* a aquesta longitud d'ona que s'observa en la majoria de Zn-MTs. Així i tot, els dos espectres no són iguals. Pel que fa a la segona fracció, la gaussiana es troba desplaçada cap a l'esquerra, amb el màxim a 235 nm i tot i que aquesta fracció està composta de monòmers i dímers, el seu espectre de DC no és un intermediari de les altres dues fraccions. Els espectres de DC de les tres fraccions es troben superposats en la Figura 19.



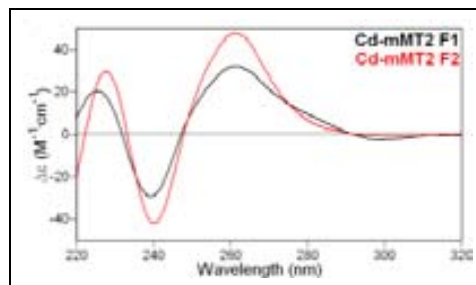
**Figura 19:** Comparació dels espectres de DC de les tres fraccions obtingudes en la producció de mMT2 en medi ric en Zn(II).

En la producció de mMT2 amb Cd(II) s'observen 2 pics o fraccions de diferent mida en el FPLC. En aquest cas, la diferenciació no és tan clara com en la producció amb Zn(II), ja que el senyal de detecció de la proteïna es satura a partir d'un cert punt. Així i tot, en analitzar separatament les fraccions (Taula 9), s'observa que la concentració de proteïna és molt més baixa en la primera, i que l'anàlisi per ESI-MS de les dues indica l'existència comuna d'una espècie majoritària Cd<sub>7</sub>-mMT2 (Figura 20) i algunes espècies minoritàries que contenen lligands sulfur, com Cd<sub>7</sub>S<sub>2</sub>, si bé la presència d'aquesta darrera espècie és molt més important en la F1 que en la F2.

Pel que fa als espectres de DC, les dues fraccions donen lloc als espectres típics de la majoria de les Cd-MTs, amb una banda en forma de derivada a 250 nm. La diferència entre les dues fraccions es troba en la zona dels sulfurs (*ca.* 280 nm) on la primera fracció presenta una  $\Delta\epsilon$  superior a la de la segona fracció (Figura 21). Una característica important a indicar és el fet que els espectres de DC del complex Cd-mMT2 tenen una intensitat fins a dues vegades superior a les observades pels complexos Cd-MT de qualsevol de les restants isoformes de MT de ratolí estudiades fins ara.



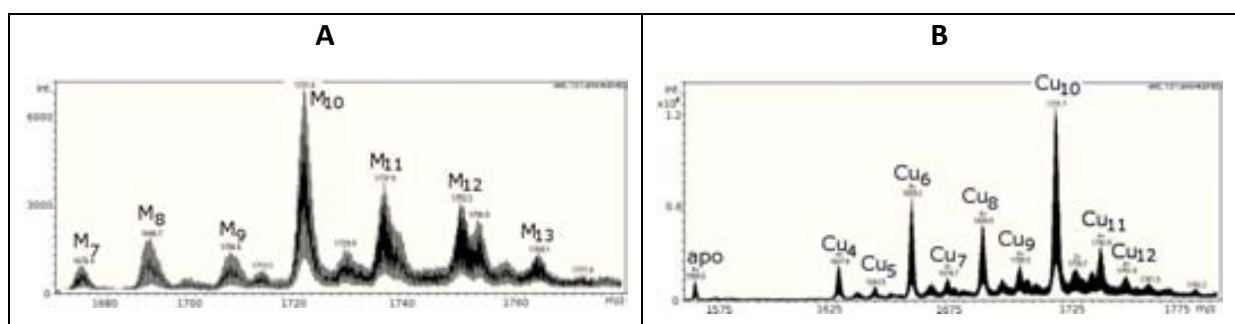
**Figura 20:** A i B: Espectres de ESI-MS de la F1 (A) i F2 (B) de la producció de mMT2 amb Cd(II).



**Figura 21:** Superposició dels espectres de DC de les dues fraccions de mMT2 biosintetitzada en medis rics en Cd(II).

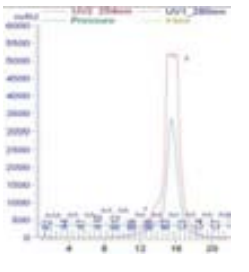
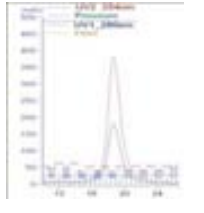
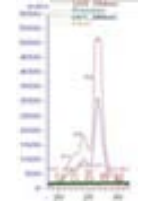
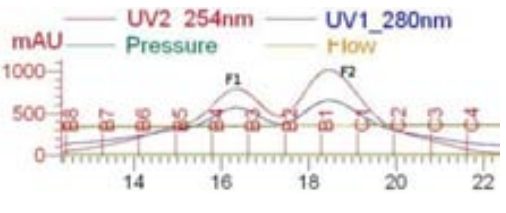
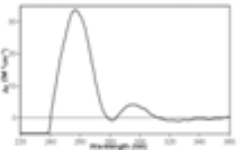
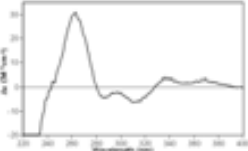
La producció de mMT2 en medis rics en Cu(II) va presentar nombroses dificultats. Es van fer dos tipus de produccions: amb oxigenació normal i amb oxigenació baixa (tal i com s'indica en el capítol 6). Aquests dos tipus de síntesi donen diferents espècies pel que fa a la relació metall/proteïna i l'obtenció d'espècies homo i heterometàliques.

En la síntesi a oxigenació normal, l'anàlisi per ICP-OES indica 10 Cu i 4 Zn per proteïna. Per ESI-MS a pH 7.0 s'observa una barreja d'espècies, la forma majoritària amb 10 metalls per MT, i altres espècies minoritàries amb un contingut d'entre 7 i 13 metalls/MT. Els espectres d'ESI-MS a pH 2.4 mostren una espècie majoritària amb 10 Cu, seguida d'espècies amb 6 i 8 Cu, i d'altres de minoritàries de diferent estequiometria Cu-mMT2 (Figura 22).



**Figura 22:** Espectres d'ESI-MS a pH 7.0 (A) i pH 2.4 (B) de les produccions de mMT2 en medis rics en Cu (II) a oxigenació normal.

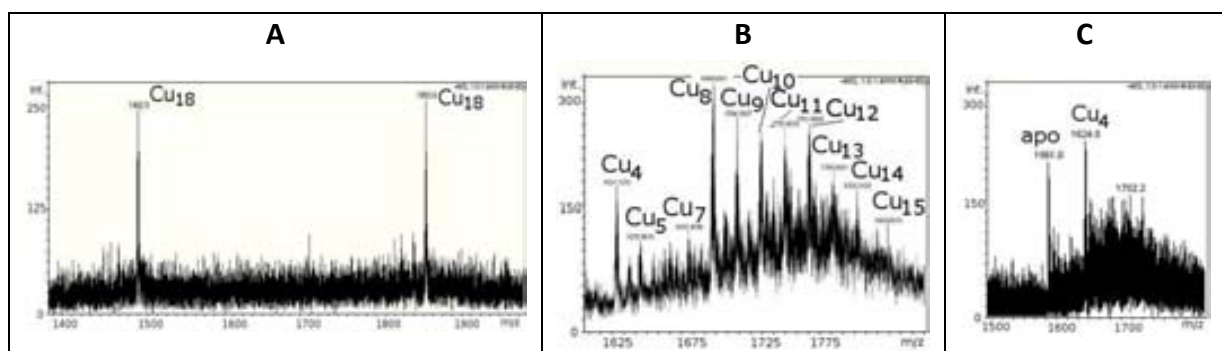
**Taula 10:** Caracterització de les produccions de la mMT2 en medis rics en Cu(II) sota condicions d'oxigenació normal ( $\approx O_2$ ) i de baixa oxigenació ( $\downarrow O_2$ ).

mMT2		Cu			
		$\approx O_2$	$\downarrow O_2$		
Cromatograma*					
		Tipus I	Tipus II	Tipus III	
mg de MT		0.68 mg en 3 L de cultiu	0.14 mg en 3 L de cultiu	0.45 mg en 6 L de cultiu	0.17 mg en 3 L de cultiu
				<b>Resultats de F3:</b>	<b>Resultats de F2:</b>
ICP-OES "conv"	[MT] (M)	$0.55 \times 10^{-4}$	$0.04 \times 10^{-4}$	$0.32 \times 10^{-4}$	$0.14 \times 10^{-4}$
	Metall / MT	7.22 Cu 2.44 Zn	4.43 Cu 0 Zn	10.29 Cu 0 Zn	6.79 Cu 0 Zn
ICP-OES "àcid"	[MT] (M)	$0.39 \times 10^{-4}$	$0.04 \times 10^{-4}$	$0.51 \times 10^{-4}$	$0.10 \times 10^{-4}$
	Metall / MT	10.35 Cu 3.59 Zn	4.15 Cu 0 Zn	11 Cu 0 Zn	9.54 Cu 0 Zn
ESI-MS <sup>&amp;</sup>	pH 7: M <sub>10</sub> -mMT2 (✓) M <sub>11-12</sub> -mMT2 (X) M <sub>7-9</sub> , M <sub>13</sub> -mMT2 (o)	Cu <sub>18</sub> -mMT2	Cu <sub>8-12</sub> -mMT2	Cu <sub>4</sub> -mMT2 (✓) Apo-mMT2 (X)	
	pH 2.4: Cu <sub>10</sub> -mMT2 (✓) Cu <sub>6</sub> , Cu <sub>8</sub> -mMT2 (X) Cu <sub>4,5,7,9,11,12</sub> -mMT2(o)				
DC		---		---	

(\*) Perfil d'elució obtingut per FPLC en la purificació dels complexos metall-MT. (&) a pH 7.0, excepte quan s'indiqui específicament. (✓) espècie majoritària, (X) intermèdia i (o) minoritària

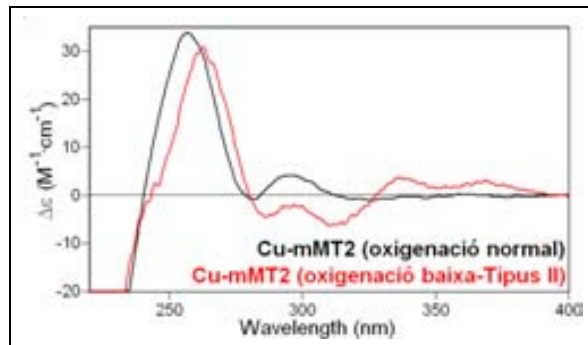
Pel que fa a les produccions a baixa oxigenació, la principal característica és que invariablement donen espècies homometàl·liques de Cu. La producció de mMT2 en aquestes condicions de baixa oxigenació té l'inconvenient que se n'obté molt poca quantitat, indicant la inestabilitat de les espècies en aquestes condicions. A més a més, s'han observat tres tipus de resultats a baixa oxigenació (Figura 23):

- Tipus I: S'obté Cu<sub>18</sub>-mMT2. No obstant, la quantitat obtinguda és tant baixa que no ha permès realitzar anàlisis espectroscòpiques ni caracteritzacions addicionals.
- Tipus II: S'obté una barreja d'espècies majoritàries que contenen entre 8 i 12 Cu per MT seguida d'altres espècies minoritàries.
- Tipus III: S'obté Cu<sub>4</sub>-mMT2 i apo-mMT2. En les biosíntesis en les que s'ha obtingut aquest resultat, el pellet cel·lular del cultiu ha estat congelat abans de la purificació de la proteïna.



**Figura 23:** Espectres d'ESI-MS de les produccions de mMT2 en medis rics en Cu(II) a baixa oxigenació, de Tipus I (A), F3 de Tipus II (B) i F2 de Tipus III (B).

Els espectres de DC que s'han pogut enregistrar de les produccions a baixa oxigenació de tipus I i III, són pràcticament plans degut a la baixa concentració de les mostres. Les produccions a baixa oxigenació de tipus II, en canvi, permeten una comparació amb les produccions a oxigenació normal. Els dos espectres no són iguals (Figura 24). Cal remarcar que a baixa oxigenació s'observen unes absorpcions entre 340 i 360 nm, que s'han assignat prèviament a llocs especials de coordinació per al Cu<sup>[132-133]</sup> que no apareixen en els espectres de les preparacions Cu-mMT2 obtingudes a oxigenació normal.

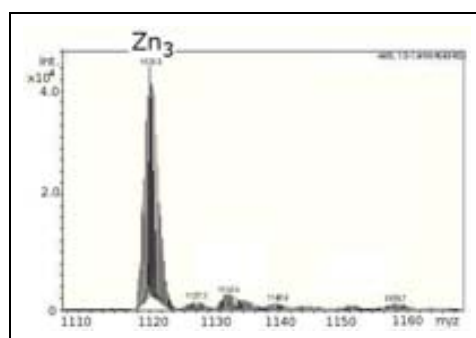


**Figura 24:** Superposició dels espectres de DC de les produccions de mMT2 en medi ric en Cu(II), a oxigenació normal i a baixa oxigenació.

### 3.2.1.2 $\beta$ mMT2

Els resultats de la producció i caracterització del domini  $\beta$  de la proteïna mMT2 en medis rics en Zn(II), Cd(II) o Cu(II), aquests darrers tant a oxigenació normal com baixa es mostren en la Taula 11.

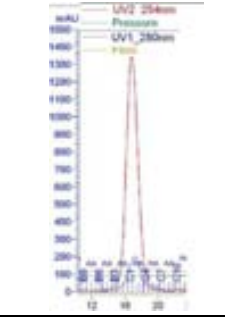
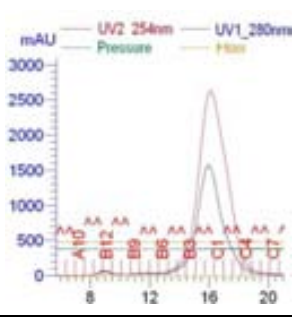
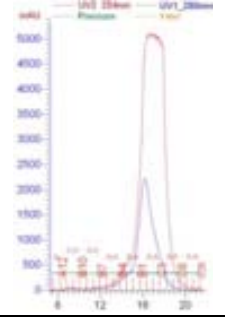
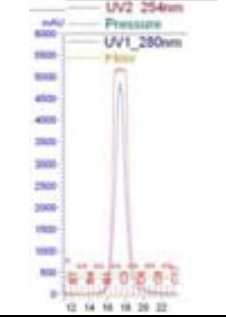
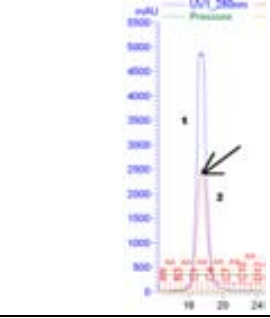
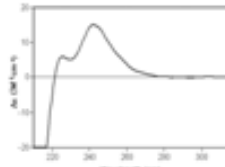
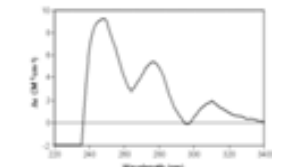
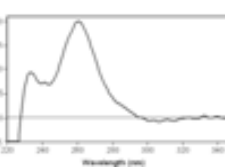
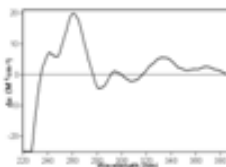
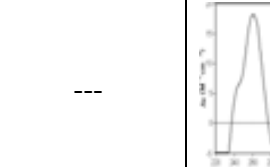
La síntesi de  $\beta$ mMT2 en presència de Zn(II) proporciona complexos de l'estequiometria esperada, és a dir, una espècie majoritària d'estequiometria  $Zn_3$ - $\beta$ mMT2 (Figura 25). En canvi, l'espectre de DC és atípic per a una Zn-MT, presentant dos màxims a 240 nm i a 220 nm.



**Figura 25:** Espectre d'ESI-MS obtingut per a  $\beta$ mMT2 sintetitzada en medi ric en Zn(II).



Taula 11: Caracterització de les produccions de  $\beta$ mMT2 en medis rics en Zn(II), Cd(II) i Cu(II) sota condicions d'oxigenació normal ( $\approx$  O<sub>2</sub>) i de baixa oxigenació ( $\downarrow$  O<sub>2</sub>).

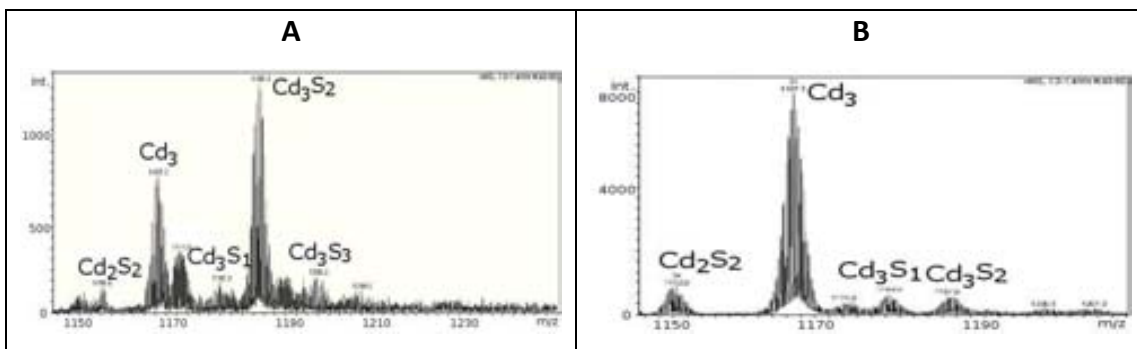
$\beta$ mMT2	Zn	Cd		Cu		
		Tipus I	Tipus II	$\approx$ O <sub>2</sub>	$\downarrow$ O <sub>2</sub>	
Cromatograma*						
mg de MT	2.48 mg en 5 L de cultiu	0.39 mg en 5 L de cultiu	0.78 mg en 5 L de cultiu	0.61 mg en 3 L de cultiu	0.37 mg en 3 L de cultiu	
ICP-OES "conv"	[MT] (M)	$1.23 \times 10^{-4}$	$1.36 \times 10^{-4}$	$1.83 \times 10^{-4}$	$0.72 \times 10^{-4}$	$0.18 \times 10^{-4}$
	Metall / MT	3.13 Zn	1.17 Cd	1.27 Cd	6.03 Cu 0 Zn	3.9 Cu 0 Zn
ICP-OES "àcid"	[MT] (M)	$1.54 \times 10^{-4}$	$0.30 \times 10^{-4}$	$0.62 \times 10^{-4}$	$0.53 \times 10^{-4}$	$0.15 \times 10^{-4}$
	Metall / MT	3.24 Zn	5.76 Cd	3.67 Cd	7.81 Cu 0 Zn	4.7 Cu 0 Zn
ESI-MS <sup>&amp;</sup>	Zn <sub>3</sub> - $\beta$ mMT2	Cd <sub>3</sub> S <sub>2</sub> - $\beta$ mMT2 (✓) Cd <sub>3</sub> - $\beta$ mMT2 (X) espècies sulfurades (o)	Cd <sub>3</sub> - $\beta$ mMT2	Cu <sub>6</sub> - $\beta$ mMT2 (✓) Cu <sub>7</sub> - $\beta$ mMT2 (o) Cu <sub>5</sub> - $\beta$ mMT2 (o)	Cu <sub>6</sub> - $\beta$ mMT2 (✓) Cu <sub>7</sub> - $\beta$ mMT2 (o) Cu <sub>5</sub> - $\beta$ mMT2 (o)	Cu <sub>6</sub> - $\beta$ mMT2 (✓) Cu <sub>7</sub> - $\beta$ mMT2 (o) Cu <sub>5</sub> - $\beta$ mMT2 (o)
DC					---	

(\*) Perfil d'elució obtingut per FPLC en la purificació dels complexos metall-MT. (&) a pH 7.0, excepte quan s'indiqui específicament. (✓) espècie majoritària, (X) intermèdia i (o) minoritària.

En medis rics en Cd(II), s'han obtingut dos tipus de produccions. L'única diferència entre elles és el fet que s'hagi congelat o no el pellet cel·lular abans de començar la purificació de la proteïna: en el tipus I no es congela aquest pellet mentre que en el tipus II sí que es congela (veure Capítol 6). Els resultats obtinguts en aquests dos tipus de producció indiquen que la congelació del pellet cel·lular afecta a la presència o absència de lligands sulfur addicionals en les espècies Cd-MT.

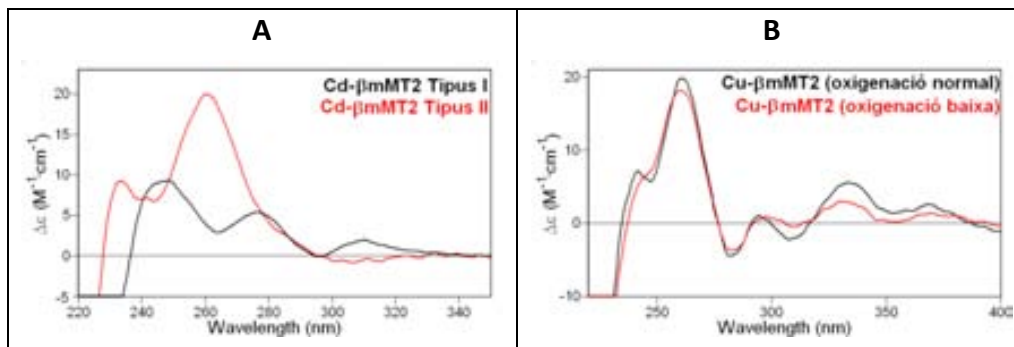
**Tipus I:** S'observa una espècie sulfurada com a majoritària:  $\text{Cd}_3\text{S}_2$ - $\beta\text{mMT}_2$ , seguida de  $\text{Cd}_3$ - $\beta\text{mMT}_2$  i d'altres espècies minoritàries que contenen lligands sulfur, com es pot observar en la Figura 26A.

**Tipus II:** Només s'observa (Figura 26B) presència de  $\text{Cd}_3$ - $\beta\text{mMT}_2$ , amb molt baixa presència de complexos sulfurats.



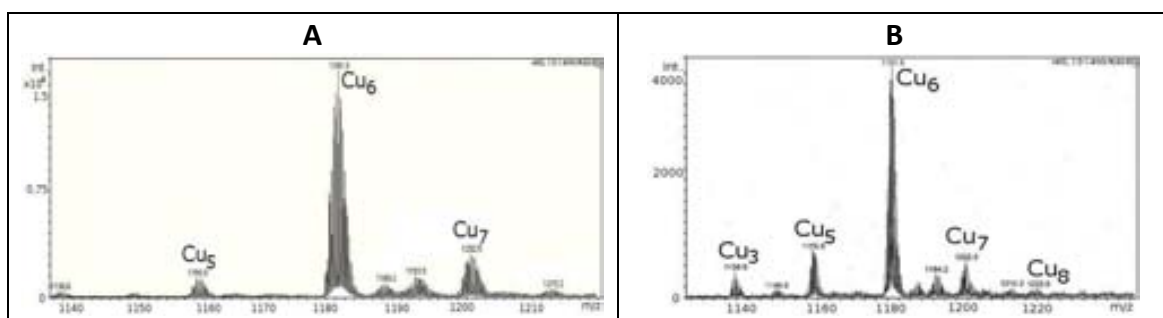
**Figura 26:** Espectres obtinguts per ESI-MS de la síntesi de  $\beta\text{mMT}_2$  en medi ric en Cd(II), Tipus I (A) i Tipus II (B).

Els espectres de DC (Figura 27A) d'ambdós tipus de preparacions són diferents: en la de tipus I s'observen tres gaussianes positives, a 245 nm, 280 nm i una tercera a longitud d'ona superior a 300 nm, atribuïbles aquestes dues últimes a la presència de lligands sulfur. En la producció de tipus II tan sols s'observa una gaussiana(+) a 250 nm i l'absoluta manca d'absorcions per sobre dels 280 nm. Aquest espectre de DC és comparable al de  $\text{Zn}_3$ - $\beta\text{mMT}_2$ , suggerint que molt probablement els complexos  $\text{Zn}_3$ - $\beta\text{mMT}_2$  i  $\text{Cd}_3$ - $\beta\text{mMT}_2$  de tipus II tenen la mateixa estructura.



**Figura 27:** Superposició dels espectres de DC de les produccions de  $\beta$ mMT2. A: en medi ric en Cd(II) i B: en medi ric en Cu(II).

La síntesi del domini  $\beta$  de MT2 de ratolí en medis rics en Cu(II) no presenta diferències significatives relacionades amb el diferent grau d'oxigenació del cultiu. En ambdós casos s'obtenen espècies homometàl·liques de Cu(I), amb  $\text{Cu}_6$ - $\beta$ mMT2 com a espècie majoritària (Figura 28). Consegüentment, ambdós espectres de DC també són molt semblants (Figura 27B), amb una gaussiana(+) molt intensa a 260 nm.

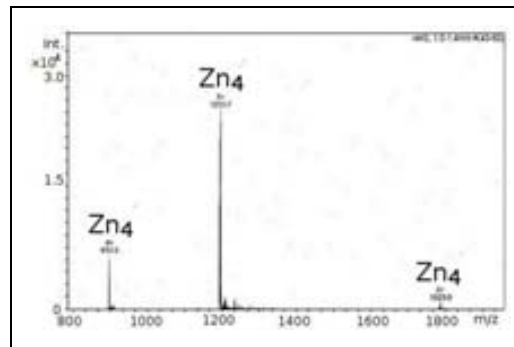


**Figura 28:** Espectres d'ESI-MS de les produccions de  $\beta$ mMT2 en medis rics en Cu(II), a oxigenació normal (A) i a baixa oxigenació (B).

### 3.2.1.3 $\alpha$ mMT2

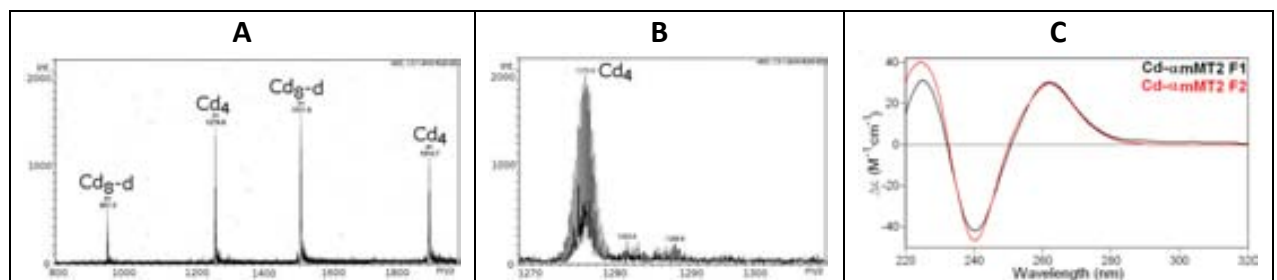
Els resultats de la producció del domini  $\alpha$  de mMT2 en medis rics en Zn(II), Cd(II) i Cu(II) així com de la caracterització dels complexos metall- $\alpha$ mMT2 generats es mostren en la Taula 12.

En la síntesi de  $\alpha$ mMT2 en presència de Zn(II) s'obté una sola espècie  $\text{Zn}_4$ - $\alpha$ mMT2 (Figura 29), l'espectre de DC de la qual és el típic d'una Zn-MT, amb un *exciton coupling* centrat a 240 nm.



**Figura 29:** Espectre d'ESI-MS de  $\alpha$ MT2 produïda en medis rics en Zn(II).

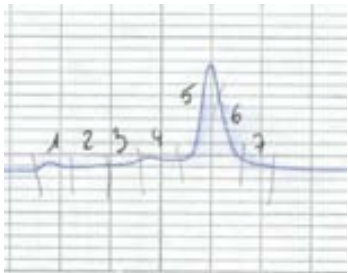
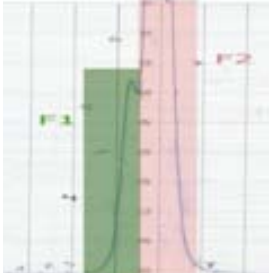
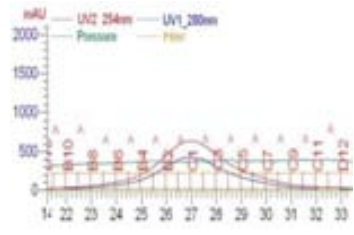
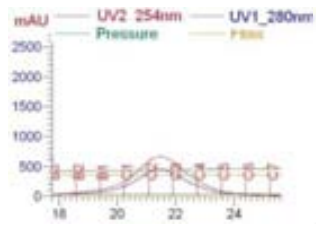
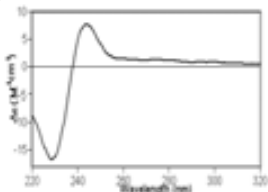
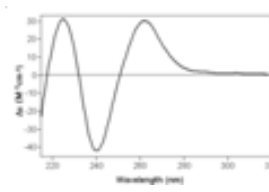
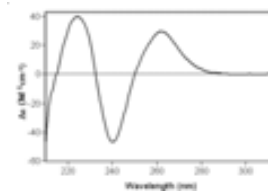
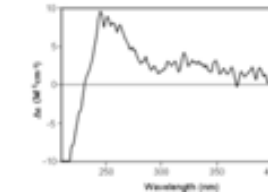
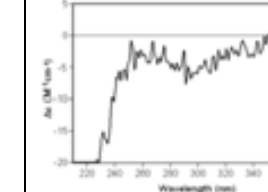
En la producció en medi ric en Cd(II), s'obtenen dues fraccions de FPLC. En la primera fracció hi ha una barreja de dímers  $\text{Cd}_8$ - $(\alpha\text{MT}_2)_2$  i monòmers  $\text{Cd}_4$ - $\alpha\text{MT}_2$ . En canvi, la segona fracció tant sols conté monòmers  $\text{Cd}_4$ - $\alpha\text{MT}_2$ , (Figura 30A i Figura 30B). Ambdues fraccions presenten uns espectres de DC equivalents, amb un *exciton coupling* a 250 nm, característic de les Cd-MTs (Figura 30C).



**Figura 30:** A i B: Espectres d'ESI-MS de la producció de  $\alpha$ MT2 en medi ric en Cd(II), F1 (A) i F2 (B). C: Superposició dels espectres de DC de les dues fraccions.

A diferència del domini  $\beta$ , el domini  $\alpha$  ha presentat moltes dificultats per a ser produït en medis rics en Cu(II). S'han fet múltiples produccions, tant a oxigenació normal com baixa. En tots els casos s'han obtingut preparacions molt diluïdes en proteïna, i uns espectres de DC pràcticament plans. A causa d'aquesta baixa concentració de la mostra no ha estat possible obtenir informació per ESI-MS. Tanmateix, en tots els casos els resultats de ICP-OES indiquen que totes les espècies són homometàliques de Cu(I).

Taula 12: Caracterització de les produccions de  $\alpha$ mMT2 en medis rics en Zn(II), Cd(II) i Cu(II) sota condicions d'oxigenació normal ( $\approx$  O<sub>2</sub>) i de baixa oxigenació ( $\downarrow$  O<sub>2</sub>).

$\alpha$ -mMT2	Zn	Cd		Cu		
				$\approx$ O <sub>2</sub>	$\downarrow$ O <sub>2</sub>	
Cromatograma*	 Intensitat a UV_254 nm	 Intensitat a UV_254 nm				
mg de MT	0.47 mg en 5 L de cultiu	1.01 mg en 5 L de cultiu		0.01 mg en 3 L de cultiu	0.02 mg en 3 L de cultiu	
		<b>F1</b>	<b>F2</b>			
ICP-OES "conv"	[MT] (M)	$0.69 \times 10^{-4}$	$0.25 \times 10^{-4}$	$1.11 \times 10^{-4}$	$0.06 \times 10^{-4}$	---
	Metall / MT	4.03 Zn	2.92 Cd	4.05 Cd	9.67 Cu 0 Zn	---
ICP-OES "àcid"	[MT] (M)	$0.60 \times 10^{-4}$	$0.19 \times 10^{-4}$	$0.88 \times 10^{-4}$	---	$0.12 \times 10^{-4}$
	Metall / MT	4.03 Zn	4.07 Cd	4.69 Cd	---	7.32 Cu 0 Zn
ESI-MS <sup>&amp;</sup>	Zn <sub>4</sub> - $\alpha$ mMT2	dímers Cd <sub>8</sub> - $\alpha$ mMT2 (✓) Cd <sub>4</sub> - $\alpha$ mMT2 (✓)	Cd <sub>4</sub> - $\alpha$ mMT2	---	---	
DC						

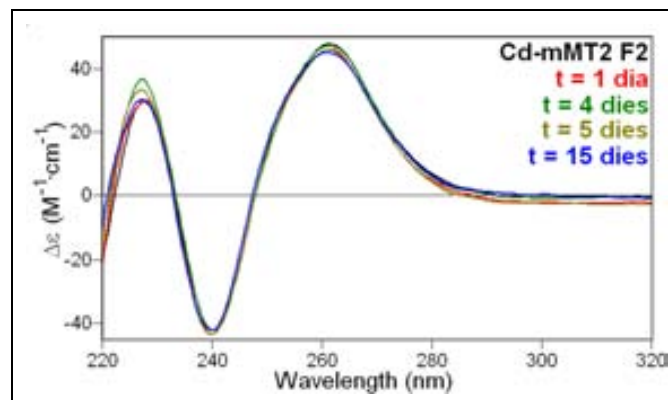
(\* ) Perfil d'elució obtingut per FPLC en la purificació dels complexos metall-MT. (&) a pH 7.0, excepte quan s'indiqui específicament. (✓) espècie majoritària, (X) intermèdia i (o) minoritària.

3.2.1.4 VARIACIÓ AMB EL TEMPS DELS COMPLEXOS Cd-mMT2, Cd- $\beta$ mMT2 i Cd- $\alpha$ mMT2

En treballs previs del grup de recerca en el que s'emmarca aquest treball<sup>[54]</sup> s'ha observat que, en alguns casos, els complexos Cd-MT obtinguts per enginyeria genètica no són termodinàmicament estables, si no que evolucionen amb el temps cap a un estat més favorable. Això provoca una modificació de la distribució molecular i, per tant, de l'abundància de les espècies presents en solució. S'ha pogut constatar que les espècies riques en sulfur augmenten amb el temps, evidentment aquesta evolució comporta canvis en l'estructura proteica, generant-se nous enllaços Cd-S<sup>2-</sup> i perdent-se enllaços Cd-SCys. Tots aquests canvis són observables en la variació dels espectres de DC i UV-Vis, on augmenta el senyal *ca.* 280 nm. Seguidament es donen els resultats dels estudis de variació amb el temps dels complexos de cadmi de mMT2 i els seus dominis sintetitzats i caracteritzats en aquesta Tesi Doctoral.

Variació amb el temps de les preparacions Cd-mMT2:

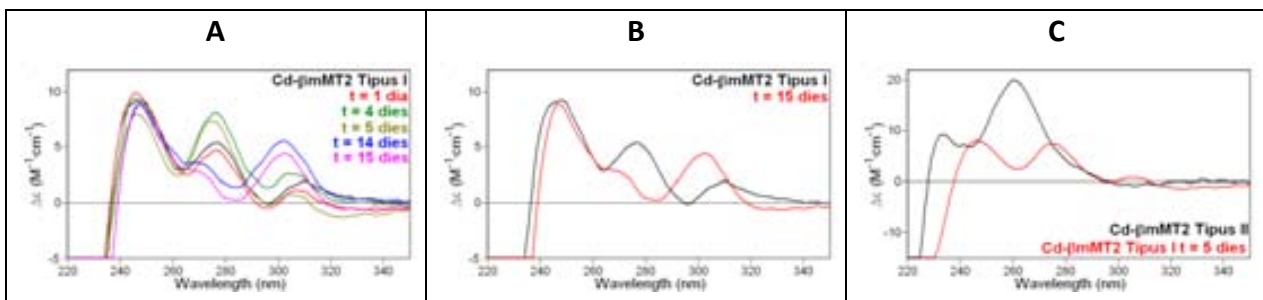
S'ha estudiat la variació amb el temps de la fracció F2 de Cd-mMT2, que és en la que s'havien detectat petites quantitats de lligands sulfur. D'acord amb els espectres de DC (Figura 31) no s'observa cap variació al llarg del temps.



**Figura 31:** Espectres de DC de Cd-mMT2 al llarg de 15 dies d'evolució a 25 °C.

### Variació amb el temps de les preparacions Cd- $\beta$ mMT2:

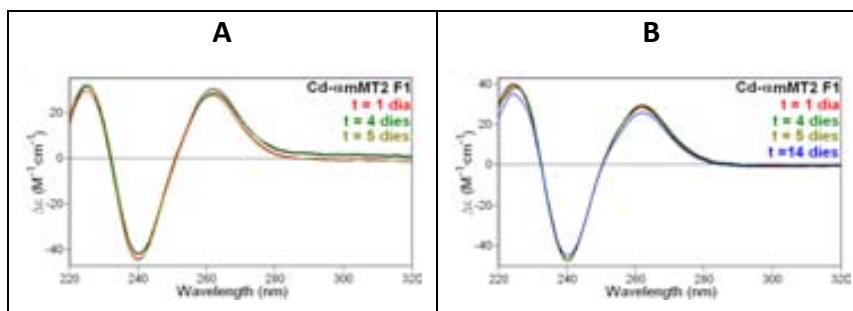
S'ha estudiat l'evolució amb el temps en la producció de Tipus I de Cd- $\beta$ mMT2, que conté complexos que contenen lligands sulfur (Figura 32A). Els espectres de DC d'aquesta preparació evolucionen produint-se un augment de la intensitat de la gaussiana(+) a *ca.* 300 nm mentre que s'observa una disminució a *ca.* 280 nm (Figura 32B). En cap moment de l'evolució, l'espectre de DC de la preparació s'apropa al de l'observat en la producció de Tipus II (Figura 32C).



**Figura 32:** A: Evolució amb el temps dels espectres de DC de la preparació Cd- $\beta$ mMT2 de Tipus I a 25 °C. B: Comparació dels espectres inicials de  $\beta$ mMT2 produïda en medi ric en Cd(II), de Tipus I i la mateixa preparació després d'evolucionar durant 15 dies a 25 °C. C: Superposició de l'espectre de DC de la producció de Tipus II amb el de la producció de Tipus I deixada evolucionar durant 5 dies a 25 °C.

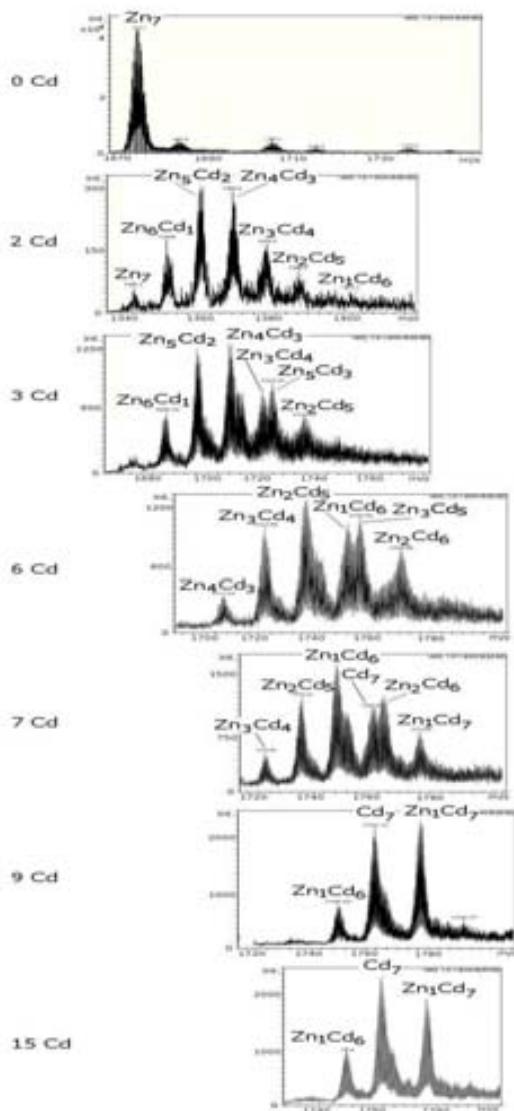
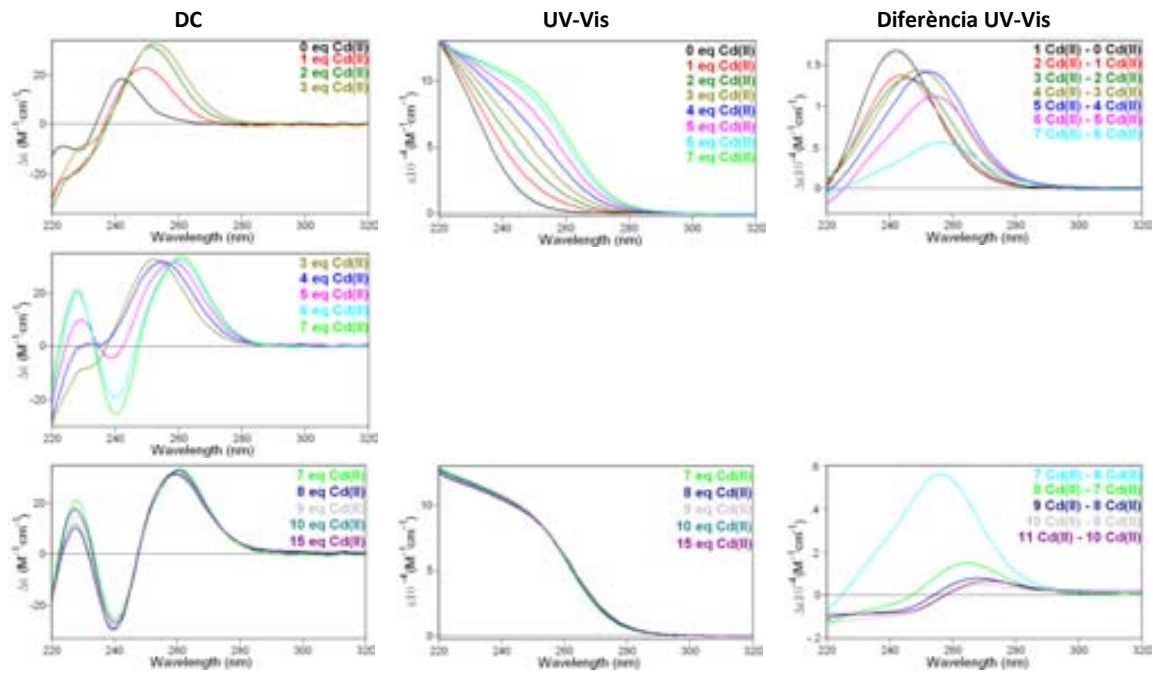
### Variació amb el temps de les preparacions Cd- $\alpha$ mMT2:

S'ha estudiat la variació amb el temps de les dues fraccions de Cd- $\alpha$ mMT2 recombinant: la F1 que contenia Cd<sub>4</sub>- $\alpha$ mMT2 i Cd<sub>8</sub>-( $\alpha$ mMT2)<sub>2</sub>, i la F2 que sols contenia monòmers Cd<sub>4</sub>- $\alpha$ mMT2. Els espectres de DC indiquen que no hi ha cap variació al llarg del temps en aquestes preparacions (Figura 33).



**Figura 33:** Espectres de DC de Cd- $\alpha$ mMT2 al llarg de diversos dies d'evolució a 25 °C, F1 (A) i F2 (B).

# LÀMINA 13. Valoració de Zn-mMT2 amb Cd(II)



	Equivalents de Cd(II) afegits							
	0	2	3	6	7	9	15	
Zn <sub>7</sub>	✓	o						
Zn <sub>6</sub> Cd <sub>1</sub>	X	o						
Zn <sub>5</sub> Cd <sub>2</sub>		✓	✓					
Zn <sub>4</sub> Cd <sub>3</sub>		✓	✓	o				
Zn <sub>3</sub> Cd <sub>4</sub>		X	X	X	o			
Zn <sub>6</sub> Cd <sub>3</sub>			X					
Zn <sub>2</sub> Cd <sub>5</sub>		o	o	✓	X			
Zn <sub>1</sub> Cd <sub>6</sub>		o	X	✓	X	o		
Zn <sub>3</sub> Cd <sub>5</sub>			X					
Cd <sub>7</sub>					X	✓	✓	
Zn <sub>2</sub> Cd <sub>4</sub>			o	X				
Zn <sub>1</sub> Cd <sub>7</sub>			o	✓	X			

Espècies observades en els espectres d'ESI-MS: majoritària (✓), intermèdia (X) i minoritària (o).

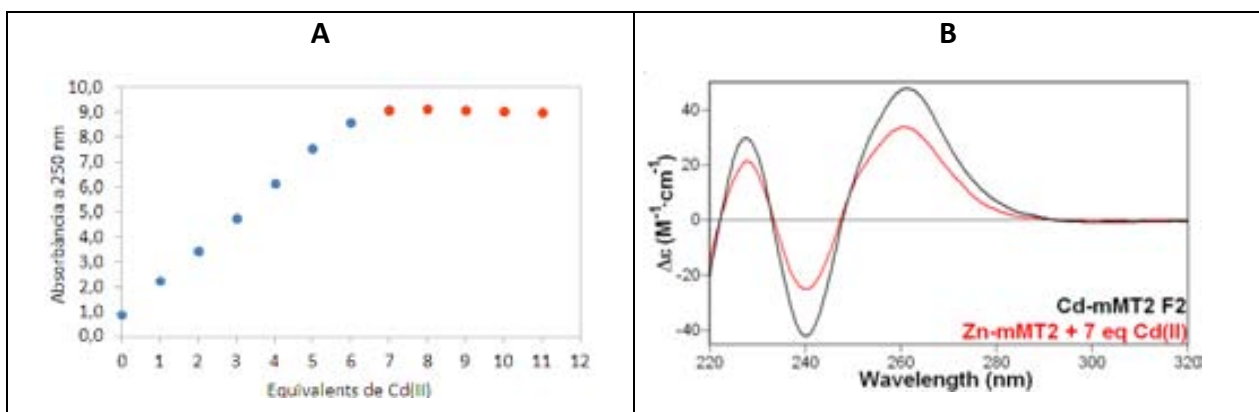


### 3.2.2 Caracterització dels complexos *M*-mMT2 (*M*=Zn(II), Cd(II) o Cu(I)) formats *in vitro*

#### 3.2.2.1 VALORACIÓ DE Zn<sub>7</sub>-mMT2, Zn<sub>3</sub>-βmMT2 I Zn<sub>4</sub>-αmMT2 AMB Cd(II)

##### Zn<sub>7</sub>-mMT2 amb Cd(II) (Làmina 13):

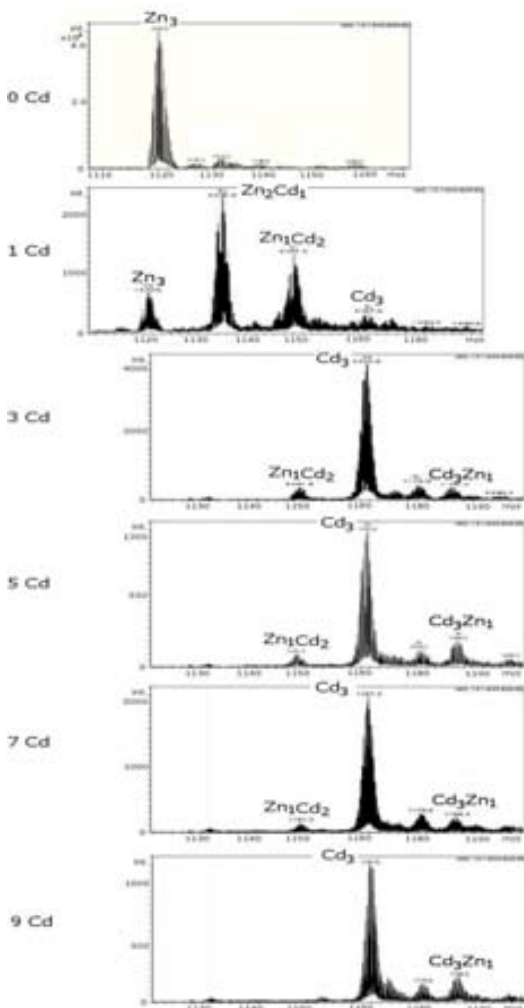
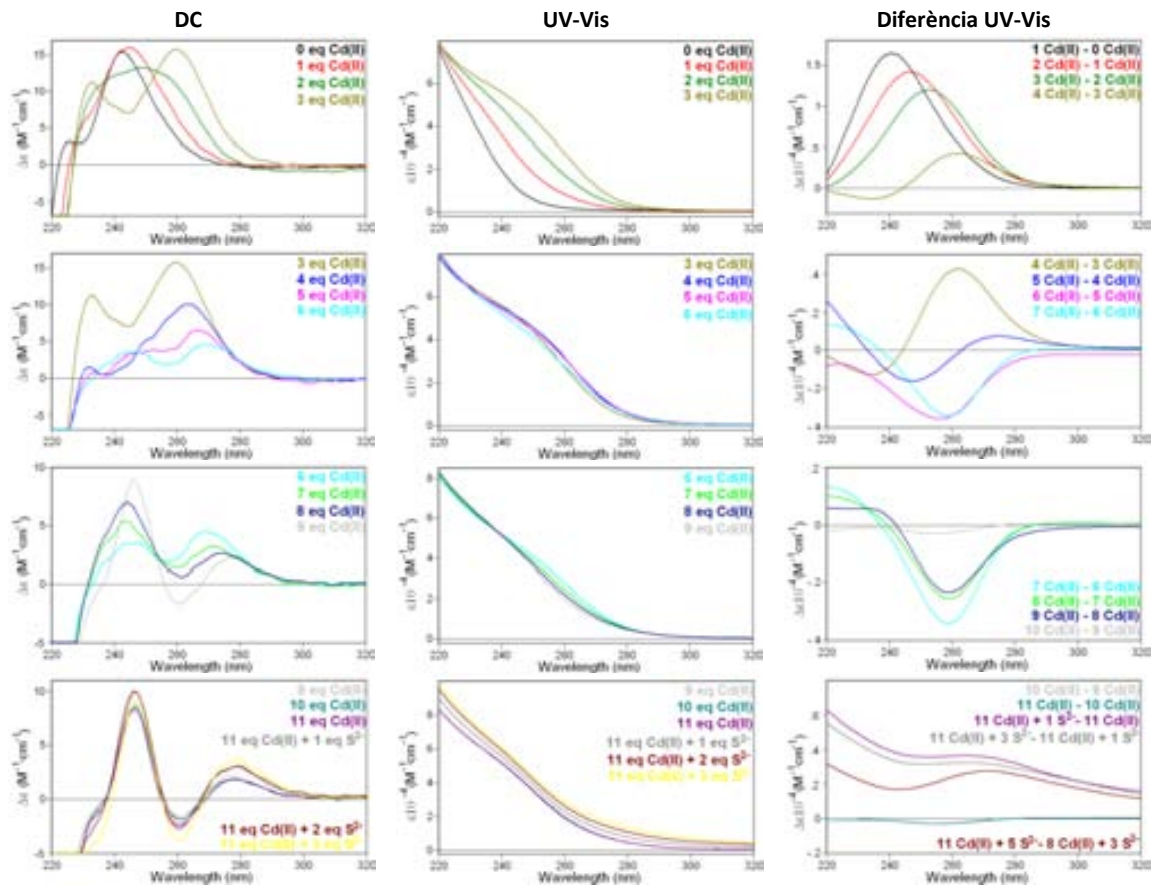
Les dades espectroscòpiques i espectromètriques enregistrades al llarg de les valoracions de la tercera fracció de FPLC de mMT2 biosintetitzada en medis rics en Zn<sup>2+</sup> (Zn<sub>7</sub>-mMT2 pura) amb Cd(II) indiquen la substitució no cooperativa del Zn<sup>2+</sup> pel Cd<sup>2+</sup>. Així, durant aquestes es formen complexos Zn<sub>x</sub>Cd<sub>y</sub>-MT on x+y=7 i x+y=8. Tal com es veu en la Figura 34A, les absorcions UV-Vis a 250 nm es saturen en afegir-hi el setè equivalent de Cd(II). En aquest estadi, Cd<sub>7</sub>-mMT2 encara no és l'espècie majoritària ja que Zn<sub>1</sub>Cd<sub>6</sub>-mMT2 domina l'espectre d'ESI-MS. Un excés de Cd(II) afegit sobre aquesta preparació no introdueix canvis en el espectre de DC però sí en els espectres d'ESI-MS. Així s'observa que per a 15 eq de Cd<sup>2+</sup> afegits, Cd<sub>7</sub>-mMT2 és l'espècie més important però aquesta coexisteix amb complexos heteronuclears Zn<sub>1</sub>Cd<sub>6</sub>-mMT2 (en concret Zn<sub>1</sub>Cd<sub>6</sub>- i Zn<sub>1</sub>Cd<sub>7</sub>-mMT2).



**Figura 34:** A: Gràfica d'absorció d'UV-Vis a 250 nm d'una mostra de Zn<sub>7</sub>-mMT2 en funció dels equivalents de Cd(II) afegits. B: Comparació dels espectres de DC de la proteïna recombinant produïda en medi ric en Cd(II) i de la proteïna obtinguda *in vitro* en afegir el setè equivalent de Cd(II).

Al final de la valoració l'espectre de DC és pràcticament idèntic al obtingut en la segona fracció de FPLC de la Cd<sub>7</sub>-mMT2 biosintetitzada (Figura 34B).

# LÀMINA 14. Valoració de Zn-βmMT2 amb Cd(II) i Na<sub>2</sub>S



	Equivalents de Cd(II) afegits						3 S
	0	1	3	5	7	9	
Zn <sub>3</sub>	✓	o					
Zn <sub>1</sub> Cd <sub>2</sub>	X	o	o	o			o
Zn <sub>2</sub> Cd <sub>1</sub>		✓					
Cd <sub>3</sub>		o	✓	✓	✓	✓	✓
Cd <sub>3</sub> Zn <sub>1</sub>			o	o	o	o	o
Zn <sub>3</sub> S <sub>2</sub>							o
dimers			o	o	o		o

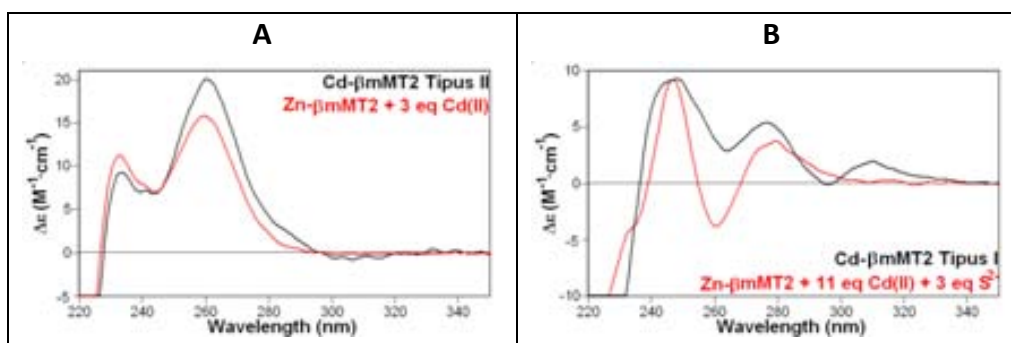
Espècies observades en els espectres d'ESI-MS: majoritària (✓), intermèdia (X) i minoritària (o).

Zn<sub>3</sub>-βmMT2 amb Cd(II) (Làmina 14):

En valorar Zn<sub>3</sub>-βmMT2 recombinant amb Cd(II), s'observa la substitució no cooperativa de Zn(II) pel Cd(II). Després de l'addició del tercer equivalent de Cd(II), l'espectre de DC ja és pràcticament idèntic al dels complexos Cd<sub>3</sub>-βmMT2 biosintetitzats de tipus II, que no contenen lligands sulfur (Figura 35A). En aquest punt, l'espècie majoritària és Cd<sub>3</sub>-βmMT2, si bé es detecten unes espècies que encara contenen Zn<sup>2+</sup>: Zn<sub>1</sub>Cd<sub>2</sub> i Cd<sub>3</sub>Zn<sub>1</sub>-βmMT2 i que es mantenen en excés de Cd(II).

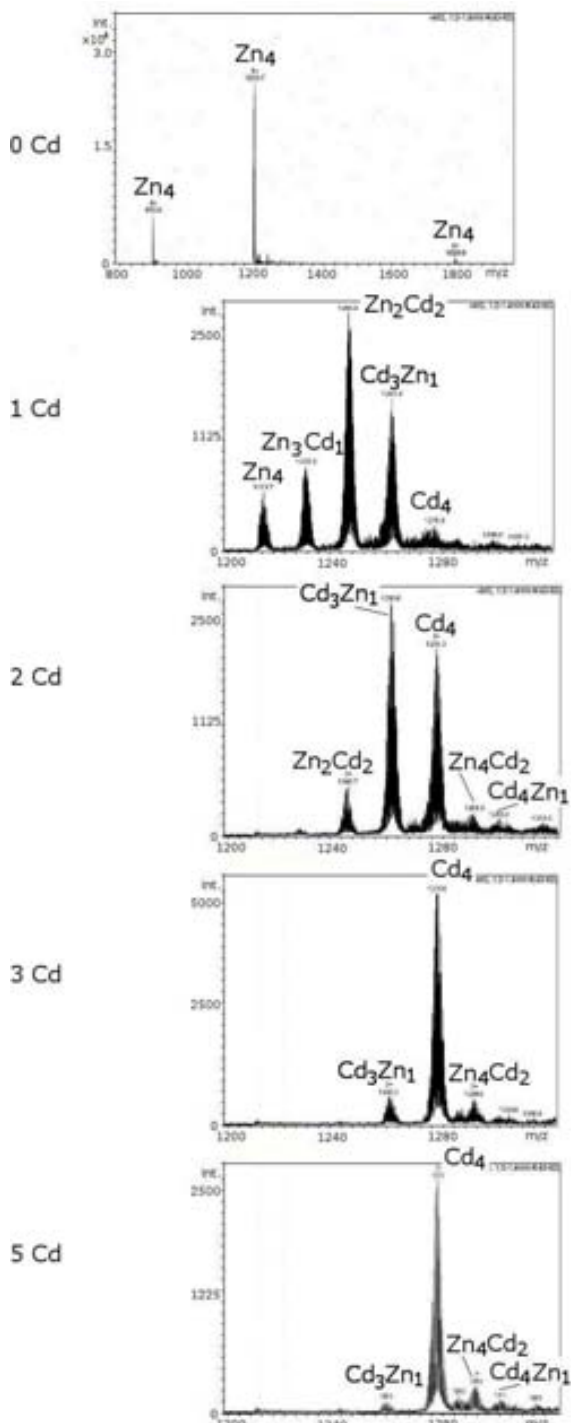
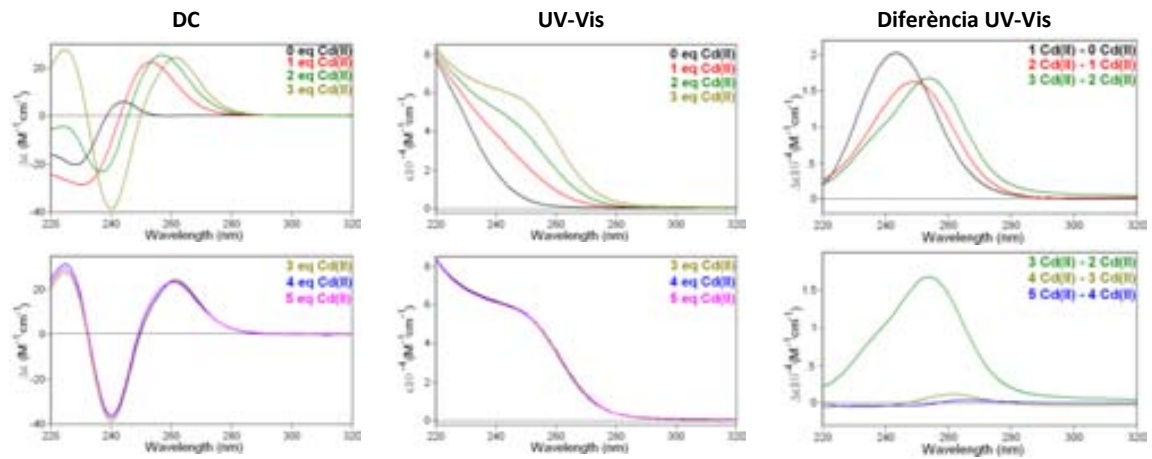
Si s'afegeixen més de 3 equivalents de Cd(II) a Zn<sub>3</sub>-βmMT2, s'observen canvis importants en els espectres de DC mentre que els espectres d'ESI-MS es mantenen pràcticament invariants.

Després de l'addició de fins a 11 equivalents de Cd(II), s'han afegit diversos equivalents de S<sup>2-</sup> en forma de Na<sub>2</sub>S<sub>(aq)</sub>. Els espectres de DC i UV mostren la incorporació d'aquests lligands als complexos ja existents per l'augment d'absorbància a 280 nm. L'espectre de DC després de l'addició de 3 equivalents de S<sup>2-</sup> no es correspon amb l'enregistrat pels complexos Cd-βmMT2 biosintetitzats de Tipus I, que són aquells que contenen espècies riques en sulfur (Figura 35B)



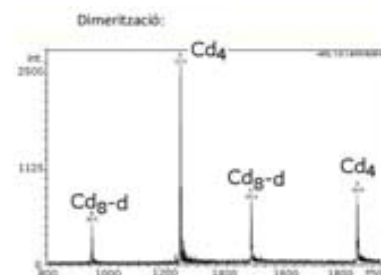
**Figura 35:** A: Superposició dels espectres de DC de la producció de βmMT2 de Tipus II en medi ric en Cd(II) amb els obtinguts *in vitro* per addició de 3 eq de Cd(II) a Zn<sub>3</sub>-βmMT2. B: Superposició dels espectres de DC de la producció de βmMT2 de Tipus I en medi ric en Cd(II) amb l'enregistrat després d'afegir 11 eq de Cd(II) i 3 eq de S<sup>2-</sup> a Zn<sub>3</sub>-βmMT2.

# LÀMINA 15. Valoració de Zn-amMT2 amb Cd(II)



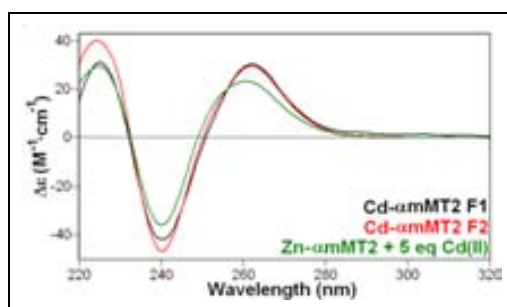
	Equivalents de Cd(II) afegits				
	0	1	2	3	5
Zn <sub>4</sub>	✓	o			
Zn <sub>4</sub> Cd <sub>2</sub>		o	o	o	
Zn <sub>3</sub> Cd <sub>1</sub>	o				
Zn <sub>2</sub> Cd <sub>2</sub>	✓	o			
Zn <sub>1</sub> Cd <sub>3</sub>	X	✓	o	o	
Cd <sub>4</sub>	o	X	✓	o	o
Zn <sub>1</sub> Cd <sub>4</sub>		o			o
Cd <sub>3</sub> -dimer				X	

Espècies observades en els espectres d'ESI-MS: majoritària (✓), intermèdia (X) i minoritària (o).



Zn<sub>4</sub>- $\alpha$ mMT2 amb Cd(II) (Làmina 15):

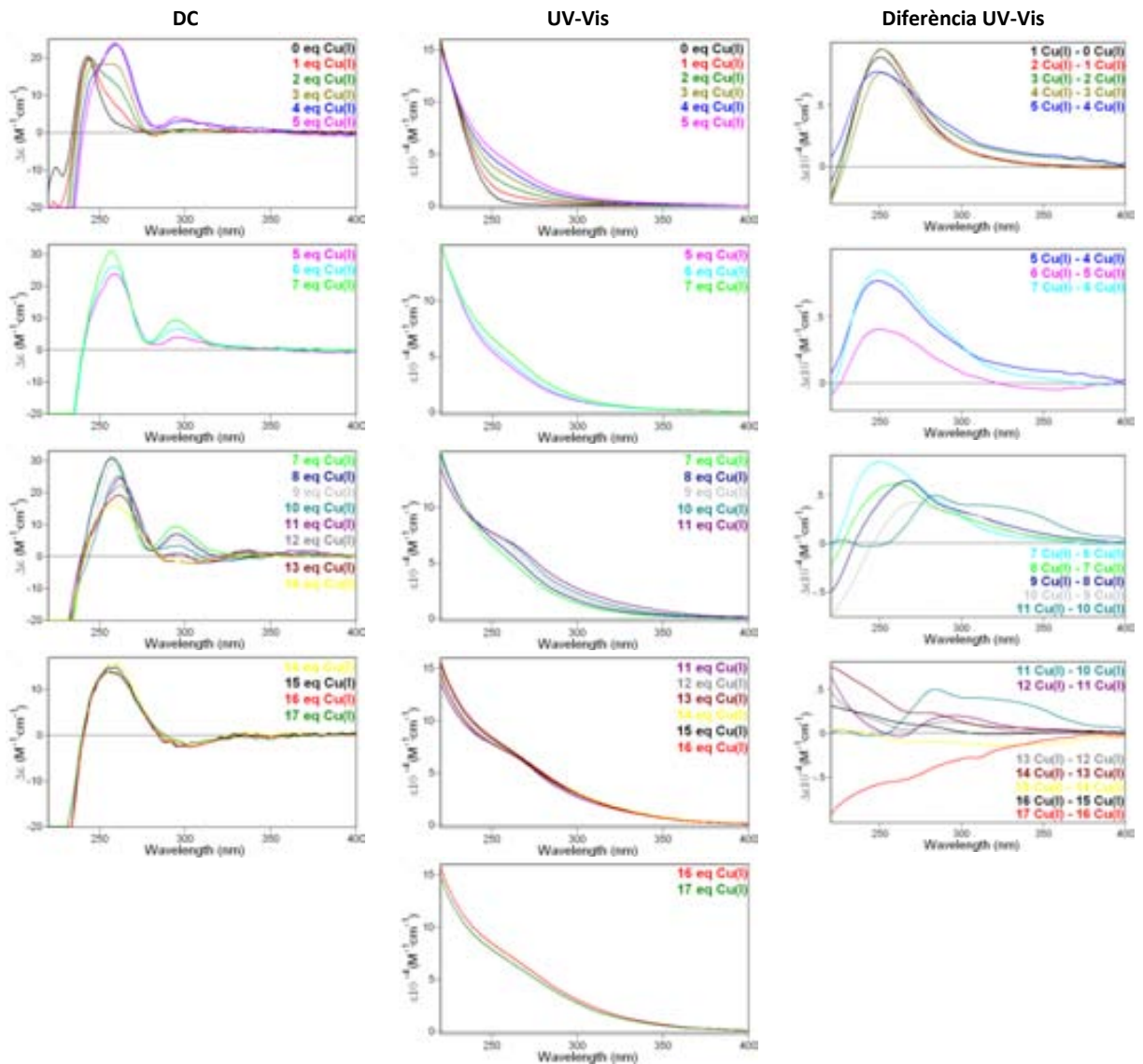
En les valoracions amb Cd(II) de Zn<sub>4</sub>- $\alpha$ mMT2, el Zn<sup>2+</sup> és substituït gradualment pel Cd<sup>2+</sup>, observant-se la formació d'espècies Zn<sub>x</sub>Cd<sub>y</sub>- $\alpha$ mMT2 on x+y=4. Per a 3 eq de Cd(II) afegits ja s'obtenen uns espectres de DC i UV-Vis que no evolucionen per més excés de Cd(II) que s'afegeixi. Els espectres d'ESI-MS mostren una espècie majoritària Cd<sub>4</sub>- $\alpha$ mMT2 acompanyada de complexos minoritaris que mantenen algun Zn(II) coordinat. A més, per l'addició del 5è equivalent de Cd(II) s'observa la formació de dímers Cd<sub>8</sub>-( $\alpha$ mMT2)<sub>2</sub> anàlegs als observats en la bioproducció de  $\alpha$ mMT2 en medis rics en Cd(II). Els espectres de DC per a 3 (Cd<sub>4</sub>- $\alpha$ mMT2 majoritari) i 5 (Cd<sub>4</sub>- $\alpha$ mMT2 i Cd<sub>8</sub>-( $\alpha$ mMT2)<sub>2</sub>) equivalents de Cd(II) afegits són iguals i molt semblants als de les preparacions Cd- $\alpha$ mMT2 biosintetitzades (Figura 36).



**Figura 36:** Superposició dels espectres de DC dels complexos biosintetitzats amb els obtinguts *in vitro*.

## LÀMINA 16. Valoració de Zn-mMT2 amb Cu(I)

16 A: Dades espectroscòpiques i taula de resultats de ESI-MS (16B: pàgines següents)

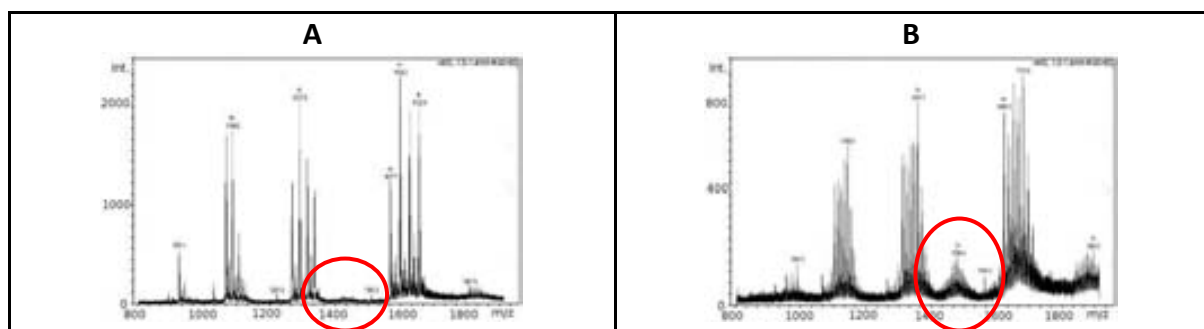


pH7	Equivalentents de Cu(II) afegits							pH2.4	Equivalentents de Cu(II) afegits						
	0	3	5	11	14	16	17		0	3	5	11	14	16	17
M <sub>4</sub>					X <sup>o</sup>	X <sup>o</sup>	X <sup>o</sup>	Apo	✓	X	o <sup>II</sup>				✓ <sup>o</sup>
M <sub>5</sub>					X <sup>o</sup>	X <sup>o</sup>	X <sup>o</sup>	Qi <sub>4</sub>	✓	X <sup>II</sup>	o <sup>o</sup>	o <sup>o</sup>	o <sup>o</sup>	✓ <sup>o</sup>	✓ <sup>o</sup>
M <sub>6</sub>					X <sup>o</sup>	X <sup>o</sup>	o <sup>o</sup>	Qi <sub>5</sub>	X	o <sup>II</sup>		o <sup>o</sup>	o <sup>o</sup>	✓ <sup>o</sup>	X <sup>o</sup>
M <sub>7</sub>	✓	X			X <sup>o</sup>	X <sup>o</sup>	X <sup>o</sup>	Qi <sub>6</sub>	✓	✓ <sup>II</sup>	o <sup>o</sup>	o <sup>o</sup>	o <sup>o</sup>	X <sup>o</sup>	X <sup>o</sup>
M <sub>8</sub>	X	o <sup>II</sup>	X <sup>o</sup>	X <sup>o</sup>	X <sup>o</sup>	X <sup>o</sup>	✓ <sup>o</sup>	Qi <sub>7</sub>		o <sup>II</sup>	o <sup>o</sup>	o <sup>o</sup>	X <sup>o</sup>	X <sup>o</sup>	
M <sub>9</sub>	✓	✓ <sup>II</sup>	o <sup>o</sup>	✓ <sup>o</sup>	✓ <sup>o</sup>	✓ <sup>o</sup>	✓ <sup>o</sup>	Qi <sub>8</sub>	o	✓ <sup>II</sup>	✓ <sup>o</sup>	✓ <sup>o</sup>	✓ <sup>o</sup>	✓ <sup>o</sup>	✓ <sup>o</sup>
M <sub>10</sub>	✓	✓ <sup>II</sup>	X <sup>o</sup>	✓ <sup>o</sup>	✓ <sup>o</sup>	✓ <sup>o</sup>	X <sup>o</sup>	Qi <sub>9</sub>		o <sup>II</sup>	✓ <sup>o</sup>	✓ <sup>o</sup>	X <sup>o</sup>	X <sup>o</sup>	
M <sub>11</sub>	o	✓ <sup>II</sup>	✓ <sup>o</sup>	✓ <sup>o</sup>	✓ <sup>o</sup>	✓ <sup>o</sup>	X <sup>o</sup>	Qi <sub>10</sub>	✓	✓ <sup>II</sup>	✓ <sup>o</sup>	✓ <sup>o</sup>	X <sup>o</sup>	X <sup>o</sup>	
M <sub>12</sub>		X <sup>II</sup>	✓ <sup>o</sup>	✓ <sup>o</sup>	✓ <sup>o</sup>	✓ <sup>o</sup>	X <sup>o</sup>	Qi <sub>11</sub>		o <sup>II</sup>	✓ <sup>o</sup>	✓ <sup>o</sup>	X <sup>o</sup>	X <sup>o</sup>	
M <sub>13</sub>			X <sup>o</sup>	✓ <sup>o</sup>	✓ <sup>o</sup>	o <sup>o</sup>		Qi <sub>12</sub>		X <sup>II</sup>	✓ <sup>o</sup>	✓ <sup>o</sup>	X <sup>o</sup>	X <sup>o</sup>	
M <sub>14</sub>			o <sup>o</sup>	✓ <sup>o</sup>	X <sup>o</sup>	X <sup>o</sup>		Qi <sub>13</sub>			X <sup>o</sup>	X <sup>o</sup>	o <sup>o</sup>	o <sup>o</sup>	
M <sub>15</sub>			o <sup>o</sup>	X <sup>o</sup>	X <sup>o</sup>	o <sup>o</sup>		Qi <sub>14</sub>			X <sup>o</sup>	o <sup>o</sup>	o <sup>o</sup>	o <sup>o</sup>	
								Qi <sub>15</sub>			o <sup>o</sup>	o <sup>o</sup>	o <sup>o</sup>	o <sup>o</sup>	

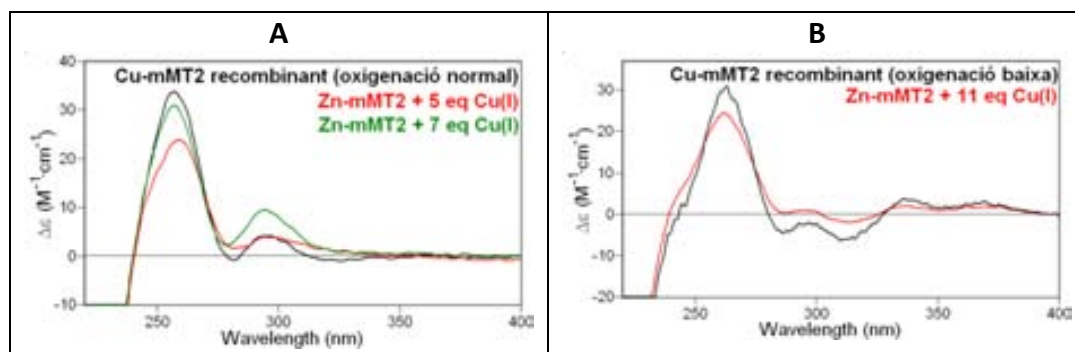
Espècies observades en els espectres d'ESI-MS a pH 7.0 i a pH 2.4: majoritària (✓), intermèdia (X) i minoritària (o). II indica l'existència de pics de dímers barrejats amb monòmers del complex metall-MT. <sup>o</sup> indica l'existència majoritària de pics de dímer M-(mMT2)<sub>2</sub>.

3.2.2.3 VALORACIÓ DE Zn<sub>7</sub>-mMT2, Zn<sub>3</sub>-βmMT2 I Zn<sub>4</sub>-αmMT2 AMB Cu(I)Zn<sub>7</sub>-mMT2 amb Cu(I) (Làmina 16):

En les valoracions de Zn<sub>7</sub>-mMT2 amb Cu(I), el desplaçament del Zn(II) pel Cu(I) dóna lloc a una barreja d'espècies heterometàliques que augmenta en complexitat a mesura que es van afegint equivalents de Cu(I). Addicionalment, cap al final de la valoració s'observa una presència cada cop més important d'espècies dimèriques (Figura 37). Abans que aquestes espècies dimèriques es formin, i en concret per a 5 equivalents de Cu(I) afegits, tant l'espectre de DC com els d'ESI-MS a pH 7.0 i a pH 2.4 són molt similars als enregistrats pels complexos Cu-mMT2 sintetitzats en medi ric en Cu(II) a oxigenació normal (Figura 38A). Més endavant, quan comença la dimerització, als 11-14 equivalents de Cu(I) afegits, encara que l'espectre de DC és força proper al de la producció de Cu-mMT2 a baixa oxigenació (Figura 38B), els espectres d'ESI-MS revelen que la composició de la mostra no és la mateixa ja que mitjançant la valoració s'obtenen nombrosos dímers, que no es generen en la biosíntesis de mMT2 en medis rics en Cu(II).

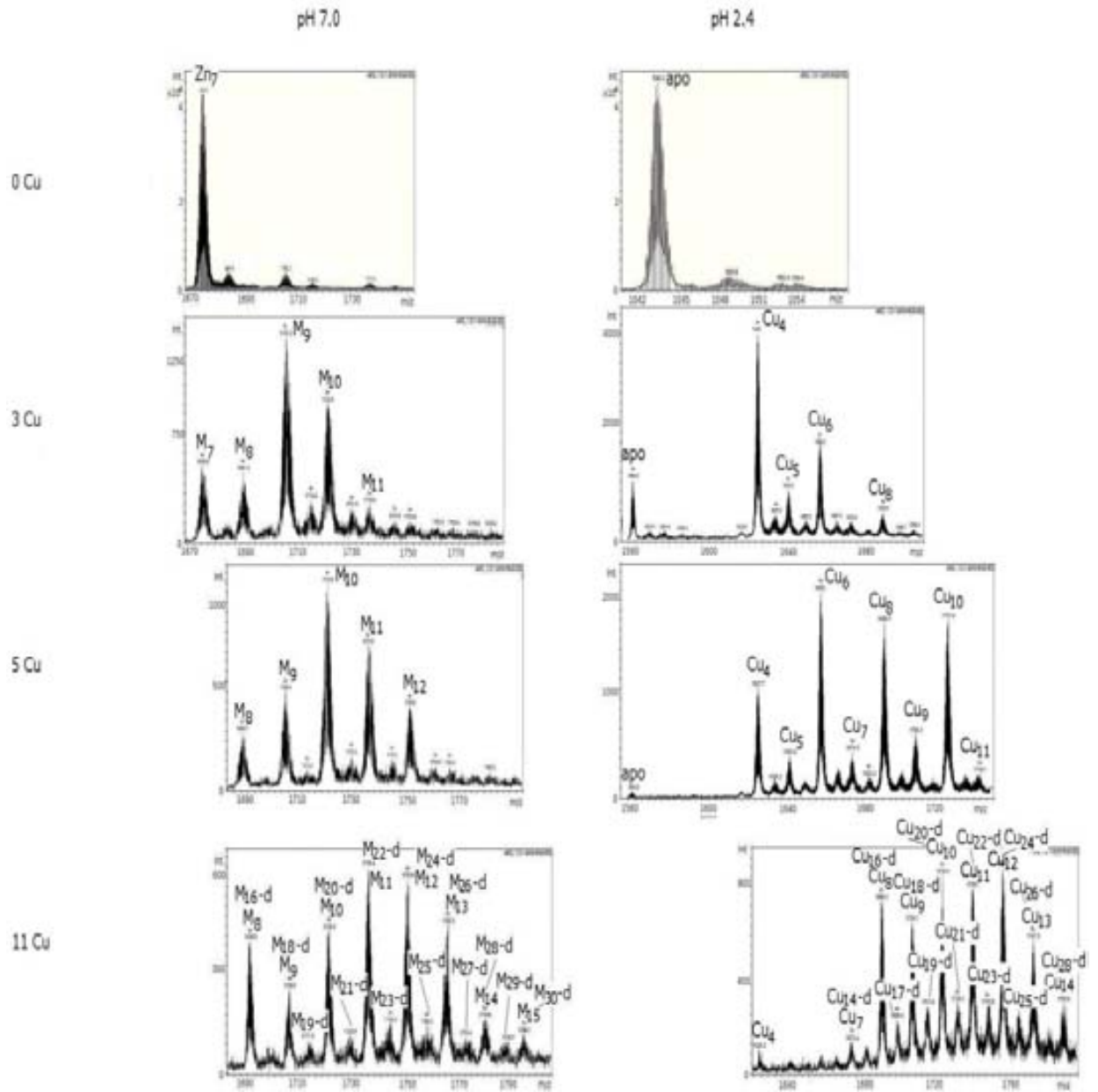


**Figura 37:** Espectres d'ESI-MS després de l'addició de 5 (A) i 11 (B) equivalents de Cu(I) a Zn<sub>7</sub>-mMT2, mostrant que a mesura que avança la valoració es fa més important la presència d'espècies dimèriques.



**Figura 38:** Superposició dels espectres de DC de les preparacions Cu-mMT2 biosintetitzades en medis rics en Cu(II) amb les mostres obtingudes *in vitro* en afegir diferents equivalents de Cu(I) al complex Zn<sub>7</sub>-mMT2. A: Oxigenació normal del cultiu. B: Oxigenació baixa del cultiu.

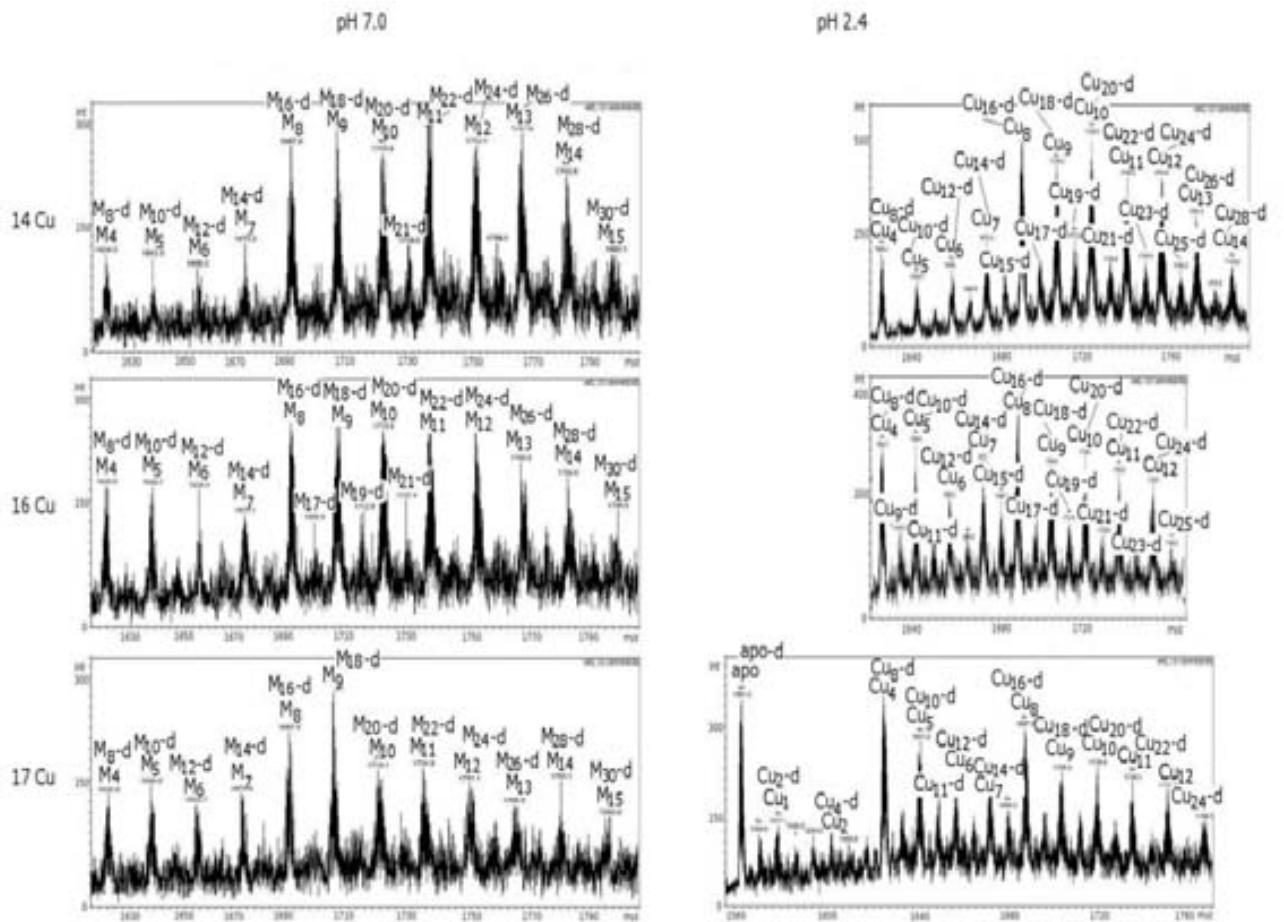
LÀMINA 16. Valoració de Zn-mMT2 amb Cu(I)  
 16 B: Dades espectromètriques (espectres d'ESI-MS)



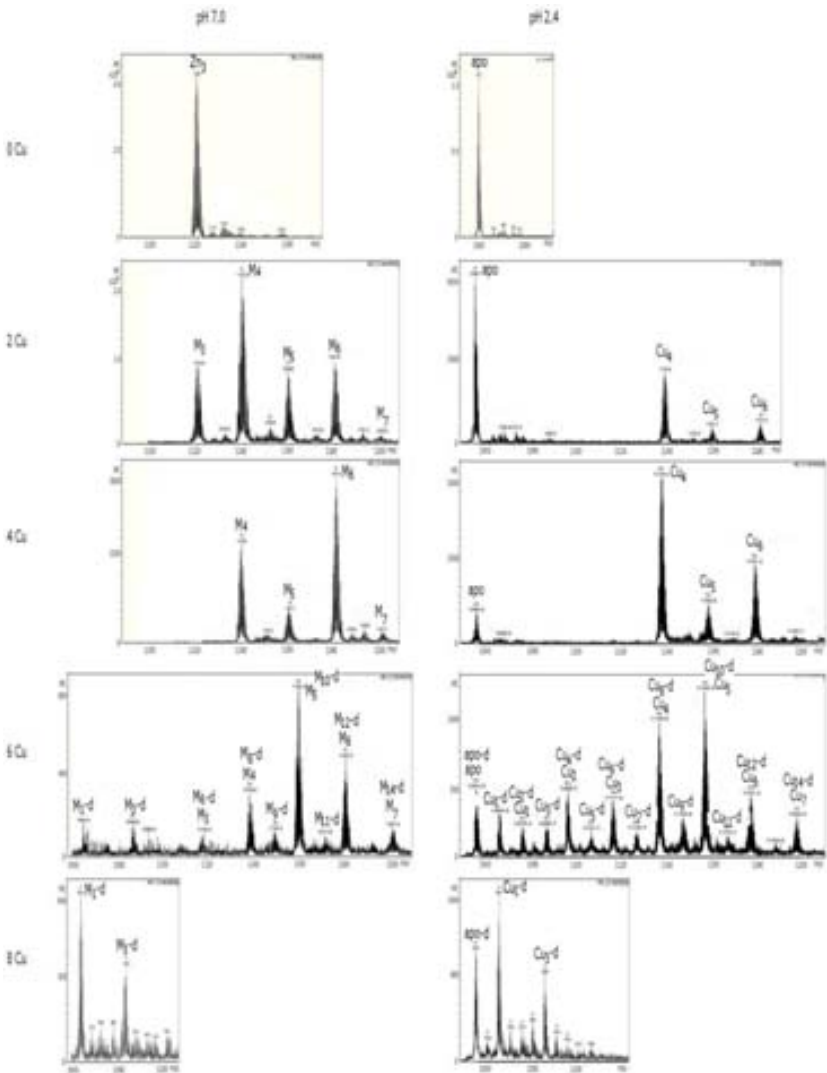
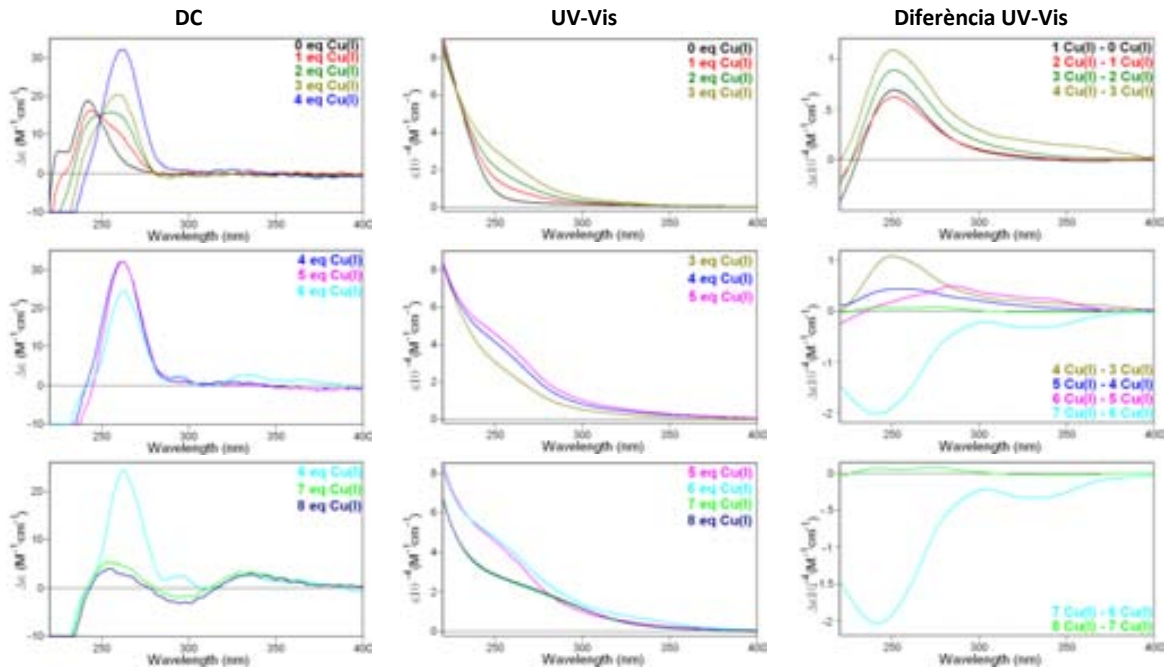


LÀMINA 16. Valoració de Zn-mMT2 amb Cu(I)  
 16 B: Dades espectromètriques (espectres d'ESI-MS)

(cont.)



# LÀMINA 17. Valoració de Zn-βmMT2 amb Cu(I)



pH 7	Equivalentes de Cu(I) afegits				
	0	2	4	6	8
M <sub>3</sub>	✓		X		
M <sub>4</sub>		✓	X	X	
M <sub>5</sub>		X	o	✓	
M <sub>6</sub>		X	✓	X	
dimers				✓	✓

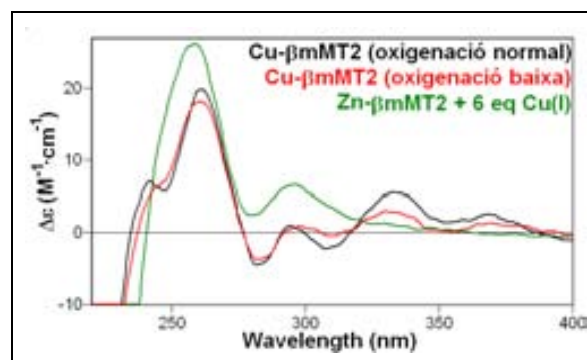
pH 2.4	Equivalentes de Cu(I) afegits				
	0	3	5	6	8
Apo	✓	✓			
Cu <sub>4</sub>		X	o	✓	
Cu <sub>5</sub>		o	✓	✓	
Cu <sub>6</sub>		o	o	X	
dimers			X	✓	✓

Espècies observades en els espectres d'ESI-MS: majoritària(✓), intermèdia (X) i minoritària (o).

Zn<sub>3</sub>-βmMT2 amb Cu(I) (Làmina 17):

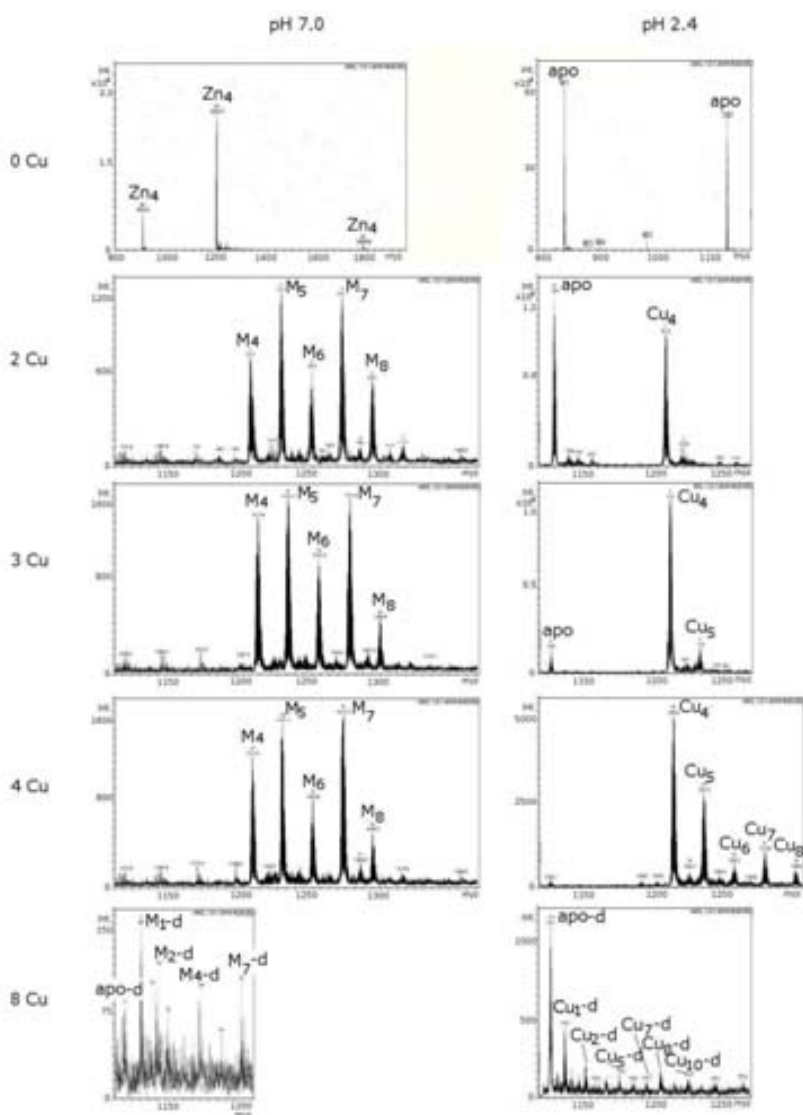
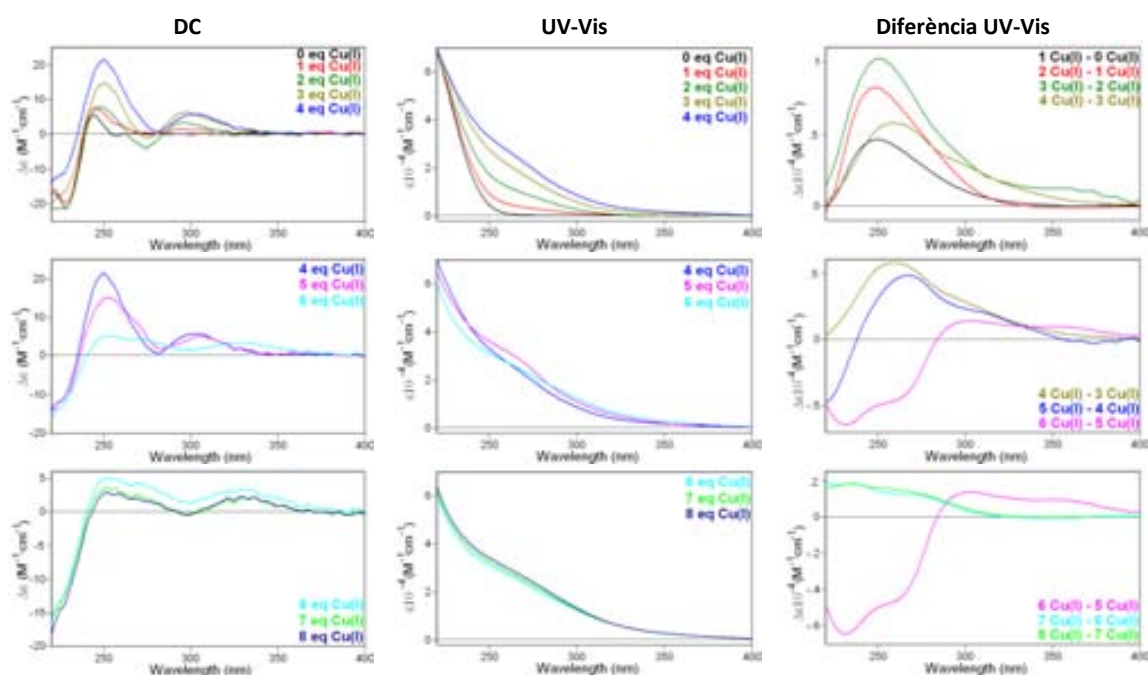
En les valoracions de Zn<sub>3</sub>-βmMT2 amb Cu(I), el metall s'incorpora a la proteïna fins a 6 equivalents de Cu(I) afegits. En aquest moment, l'espectre de DC és força semblant a l'obtingut dels complexos Cu-βmMT2 biosintetitzats en medis rics en Cu(II) (Figura 39). En continuar afegint equivalents de Cu(I), els espectres de DC indiquen la pèrdua de quiralitat de la mostra, que en excés de Cu(I) presenta uns espectres de DC pràcticament plans.

Les dades d'ESI-MS mostren que la incorporació de fins a 6 equivalents de Cu(I) a Zn<sub>3</sub>-βmMT2, genera una mescla d'espècies heteronuclears d'estequiometria M<sub>4</sub> a M<sub>6</sub>-βmMT2. En el 6è equivalent de Cu(I) les espècies obtingudes *in vitro* no presenten la mateixa estequiometria que les biosintetitzades en medis rics en Cu(II), tot i que els espectres de DC siguin molt semblants. En aquest punt de la valoració, el Cu(I) a provocat alteracions en la mostra de manera que en excés d'aquest metall la proteïna dimeritza.



**Figura 39:** Superposició dels espectres de DC de les preparacions Cu-βmMT2 biosintetitzats en medis rics en Cu(II) a oxigenació normal i baixa, amb les mostres obtingudes *in vitro* en afegir 6 equivalents de Cu(I) al complex Zn<sub>3</sub>-βmMT2.

# LÀMINA 18. Valoració de Zn- $\alpha$ MT2 amb Cu(I)



pH 7	Equivalent s de Cu(II) afegit s						
	0	2	3	4	6	8	
M <sub>4</sub>	✓	X	X	X			
M <sub>5</sub>	✓	✓	✓				
M <sub>6</sub>	X	X	X				
M <sub>7</sub>	✓	✓	✓				
M <sub>8</sub>	X	o	o				
dimers					✓	✓	

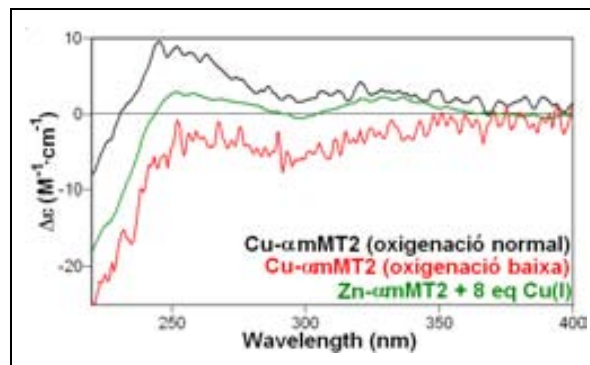
pH 2.4	Equivalent s de Cu(II) afegit s						
	0	2	3	4	6	8	
Apo	✓	✓	o				
Cu <sub>4</sub>		✓	✓	✓			
Cu <sub>5</sub>			o	X			
Cu <sub>6</sub>				o			
Cu <sub>7</sub>				o			
Cu <sub>8</sub>				o			
dimers					✓	✓	

Espècies observades en els espectres d'ESI-MS: majoritària (✓), intermèdia (X) i minoritària (o).

Zn<sub>4</sub>- $\alpha$ MT2 amb Cu(I) (Làmina 18):

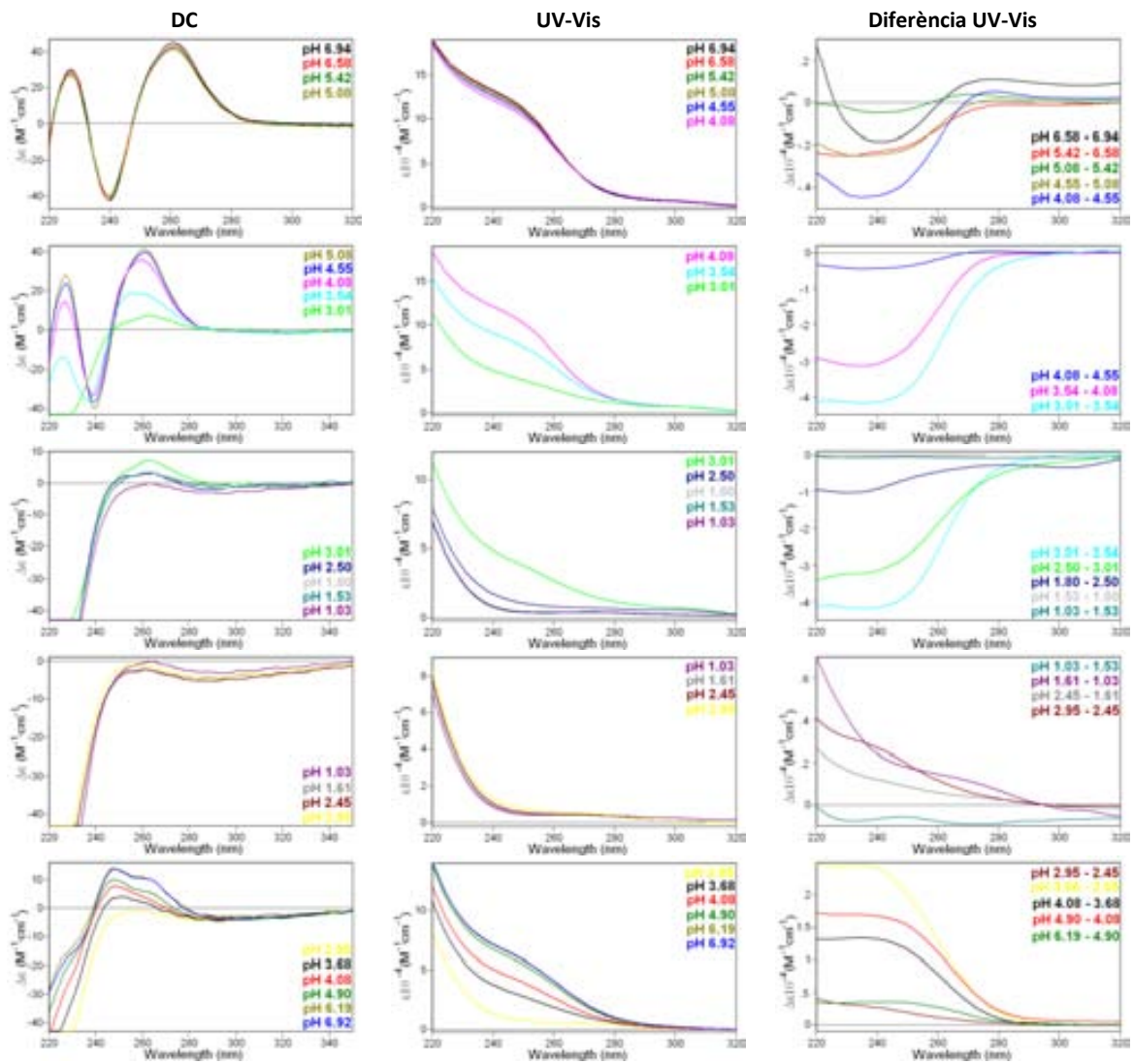
La valoració dels complexos Zn<sub>4</sub>- $\alpha$ MT2 amb Cu(I) mostra com aquest ió s'incorpora a la proteïna almenys fins a 4 equivalents de Cu(I) afegits. A partir d'aquest moment els espectres de DC mostren la pèrdua de quiralitat de la mostra, que en excés de Cu(I) dóna lloc a unes espectres de DC pràcticament plans i anàlegs als de les preparacions obtingudes per enginyeria genètica (Figura 40).

Les dades d'ESI-MS mostren que la incorporació de Cu(I) a Zn<sub>4</sub>- $\alpha$ MT2, fins a 4 equivalents de Cu(I), una mescla d'espècies, probablement heteronuclears, d'estequiometria M<sub>4</sub> a M<sub>8</sub>- $\alpha$ MT2. L'addició d'excés de Cu(I) provoca alteracions en la mostra que acaben en espectres d'ESI-MS bruts i amb moltes espècies presents així com la dimerització dels complexos.



**Figura 40:** Superposició dels espectres de DC de les preparacions Cu- $\alpha$ MT2 biosintetitzades en medis rics en Cu(II) a oxigenació normal i baixa, amb les mostres obtingudes *in vitro* en afegir 8 equivalents de Cu(I) al complex Zn<sub>4</sub>- $\alpha$ MT2.

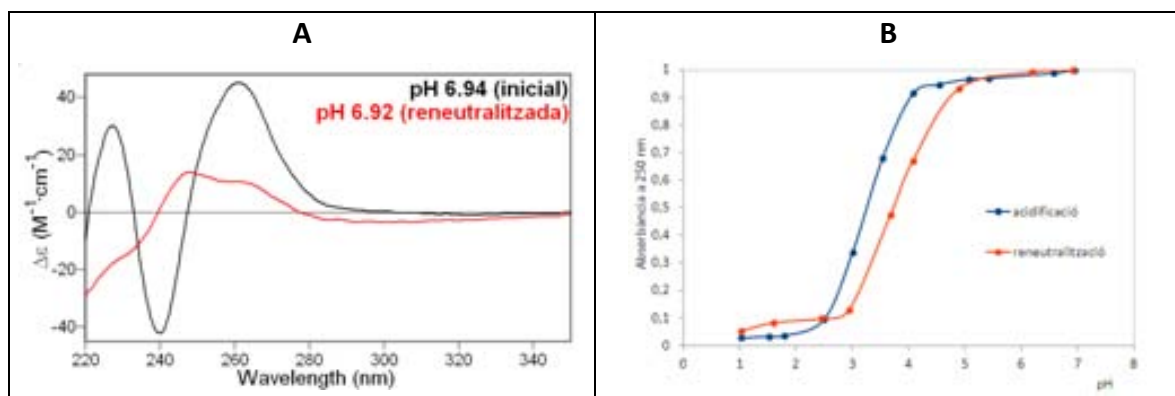
LÀMINA 19. Acidificació i reneutralització de Cd-mMT2 (F2)



### 3.2.2.4 ACIDIFICACIÓ I RENEUTRALITZACIÓ DELS COMPLEXOS Cd-mMT2, Cd- $\beta$ mMT2 i Cd- $\alpha$ mMT2

#### Acidificació i reneutralització de Cd-mMT2 (Làmina 19):

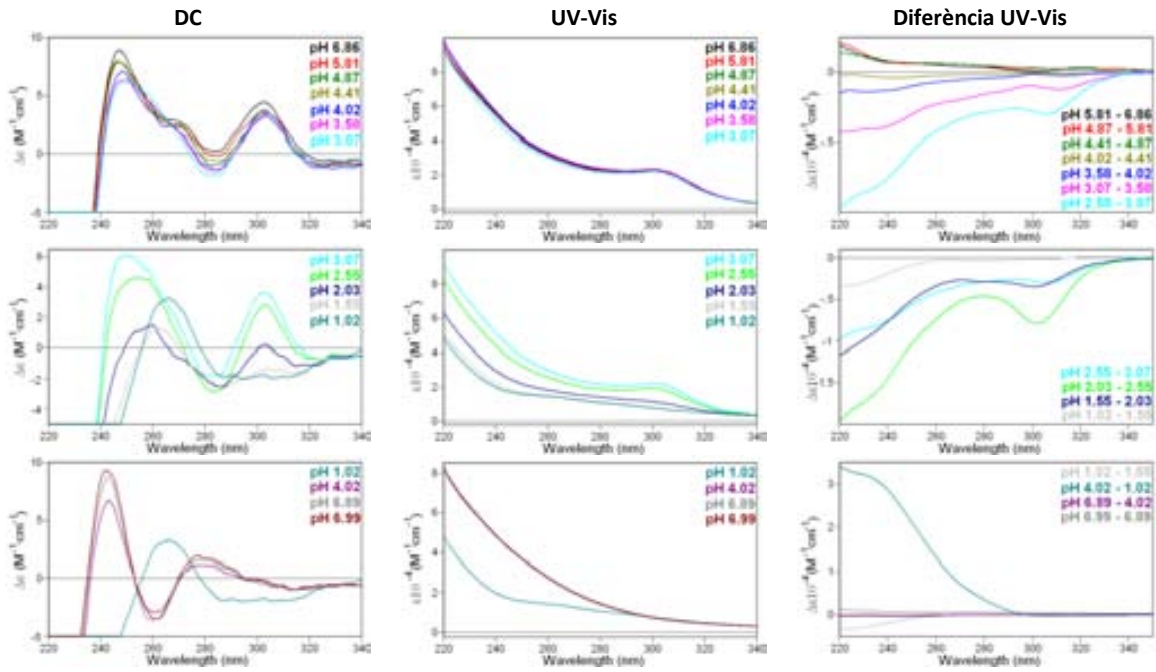
Per als estudis d'acidificació i reneutralització es va utilitzar la fracció F2 de la síntesi de MT2 de ratolí en medi ric en Cd(II). A diferència dels estudis de substitució Zn/Cd, en aquest cas no s'aconsegueix reproduir l'espectre de DC inicial (Figura 41A), indicant que el replegament del complex a partir de la forma apo no segueix el camí invers al seu desplegament en acidificar el medi (Figura 41B).



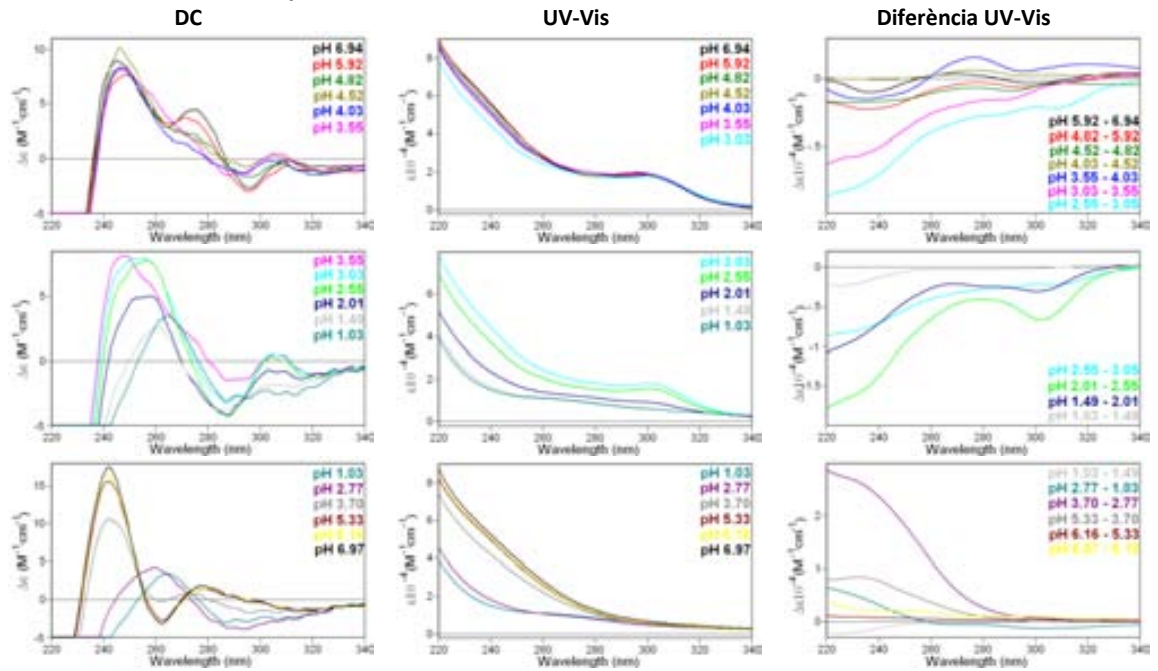
**Figura 41:** A: Superposició dels espectres inicial i final de la fracció F2 de la preparació de Cd-mMT2 en el procés d'acidificar i reneutralitzar la mateixa. B: Gràfica d'absorció d'UV-Vis a 250 nm d'una mostra de Cd-mMT2 en funció del pH del medi.

## LÀMINA 20. Acidificació i reneutralització de Cd-βmMT2 (Tipus I)

Després d'evolucionar 15 dies:



Sense evolucionar en el temps:

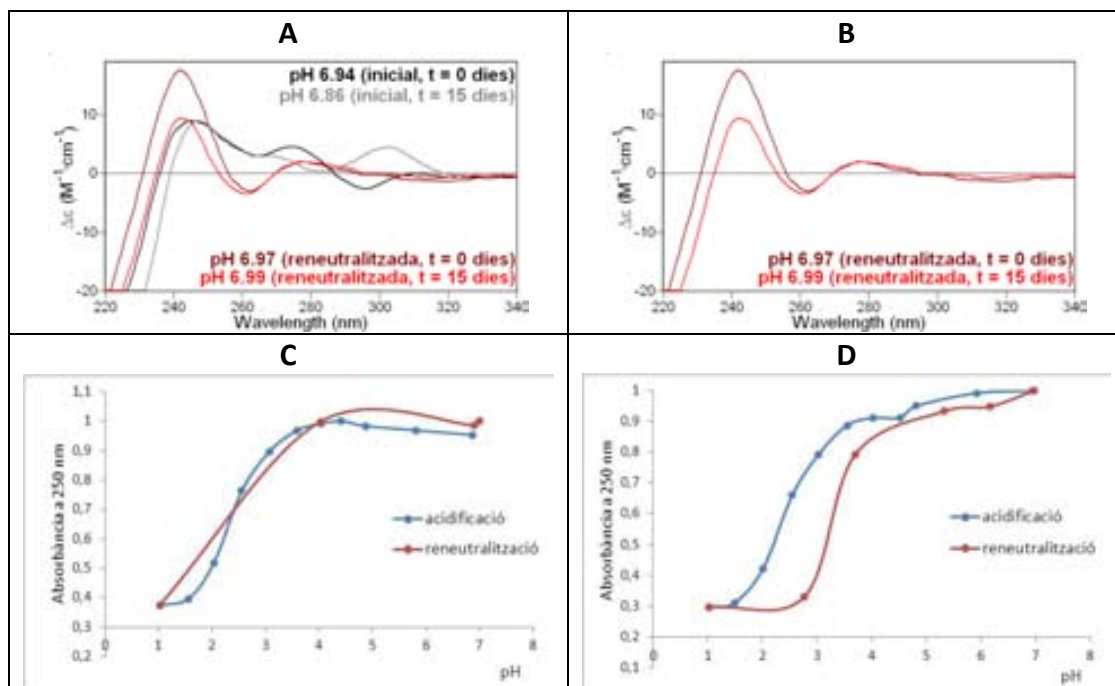




Acidificació i reneutralització de Cd- $\beta$ mMT2 (Làmina 20):

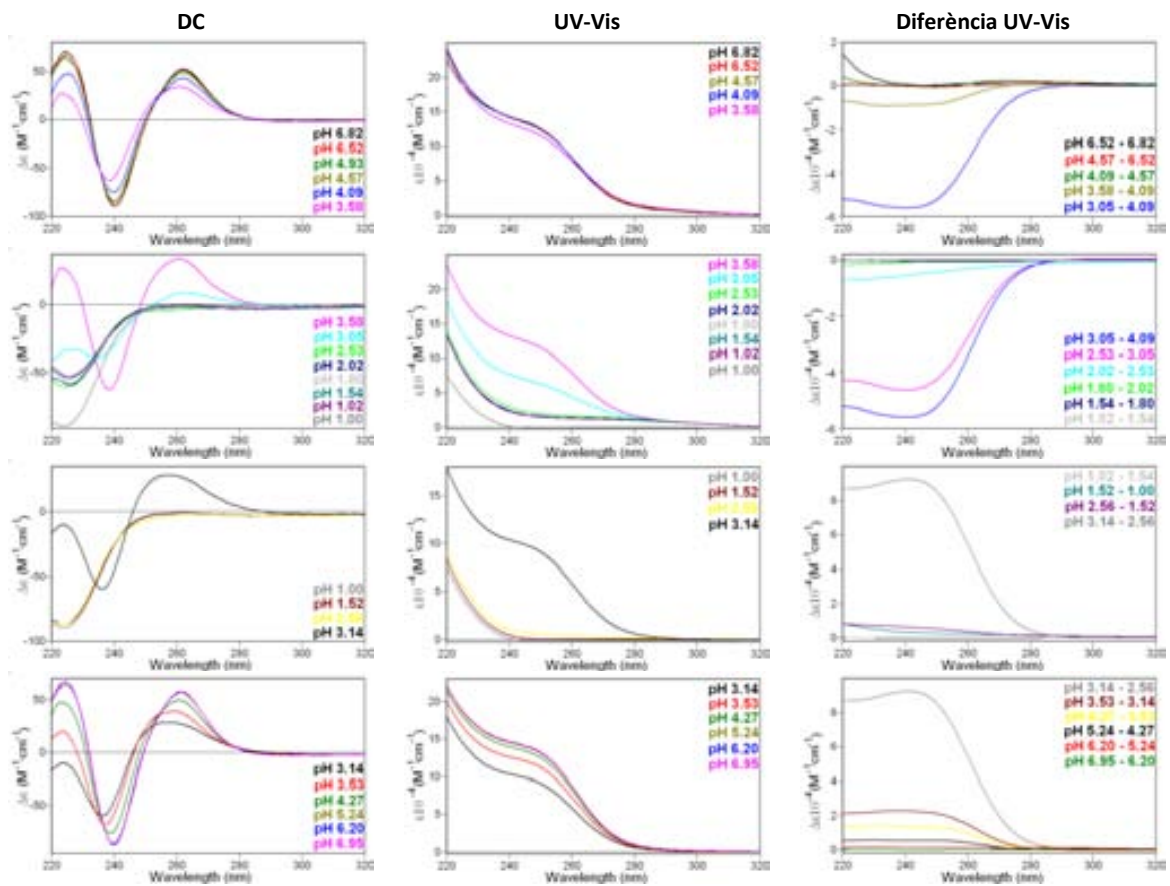
Tal i com ja s'ha comentat abans (veure apartat 3.2.1.4), les preparacions de Tipus I de Cd- $\beta$ mMT2, constituïda per espècies Cd<sub>3</sub>S<sub>2</sub>- $\beta$ mMT2 majoritàries i Cd<sub>3</sub>- $\beta$ mMT2 minoritàries, evolucionen amb el temps. Per aquest motiu, es van realitzar dos tipus d'acidificacions i reneutralitzacions d'aquestes preparacions: unes amb les acabades de descongelar, i les altres amb les que s'havia observat una variació del seu espectre de DC durant 15 dies.

En cap dels casos es va aconseguir reproduir l'espectre de DC inicial després del procés de reneutralització. Els espectres de DC inicials d'ambdós tipus de preparacions no coincideixen, però curiosament els espectres de DC finals presenten en ambdós casos una gran similitud (Figura 42). Aquesta indica que el replegament dels complexos després del procés d'acidificació i reneutralització és semblant sigui quin sigui el material de partida i que és per tant independent del fet que les preparacions hagin evolucionat o no amb el temps abans de ser acidificades i reneutralitzades.



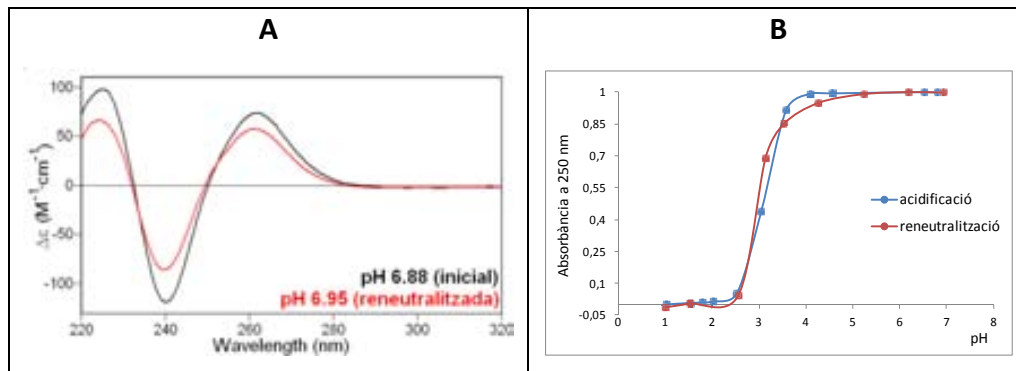
**Figura 42:** A: Comparació dels espectres de DC inicials i finals de les preparacions Cd- $\beta$ mMT2 acabades de descongelar (t = 0 dies) i evolucionades en el temps (t = 15 dies). B: Comparació dels dos espectres de DC obtinguts després del procés d'acidificació i reneutralització en ambdós casos. C: Absorbància d'UV-Vis a 250 nm en funció del pH del medi en les mostres evolucionades. D: En les mostres acabades de descongelar.

# LÀMINA 21. Acidificació i reneutralització de Cd- $\alpha$ MT2



Acidificació i reneutralització de Cd- $\alpha$ MT2 (Làmina 21):

L'acidificació i posterior reneutralització de Cd<sub>4</sub>- $\alpha$ MT2 (F2 de la biosíntesis) permet recuperar sense problemes les seves característiques inicials (Figura 43A), indicant que el replegament de la proteïna al voltant del clúster metàl·lic segueix el camí invers del seu desplegament (Figura 43B).



**Figura 43:** A: Superposició dels espectres de DC inicial i final en l'estudi d'acidificació i reneutralització del complex Cd<sub>4</sub>- $\alpha$ MT2. B: Variació de l'absorció d'UV-Vis a 250 nm en funció del pH d'una mostra de Cd- $\alpha$ MT2.



### 3.3 ESTUDI DE LA COORDINACIÓ METÀL·LICA PER PART DE LA MT3 DE RATOLÍ

En aquest apartat es presenten els resultats obtinguts en la caracterització de les propietats coordinants de la proteïna recombinant mMT3 així com dels seus dominis biosintetitzats en medis rics en  $Zn^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$  i  $Cu^{2+}$ , aquest últim metall tant en condicions d'oxigenació normal com sota baixa oxigenació dels cultius. Seguidament es donen els resultats de les anàlisis espectroscòpiques i espectromètriques d'aquestes preparacions per tal de determinar la preferència d'enllaç de mMT3 a metalls pesants.

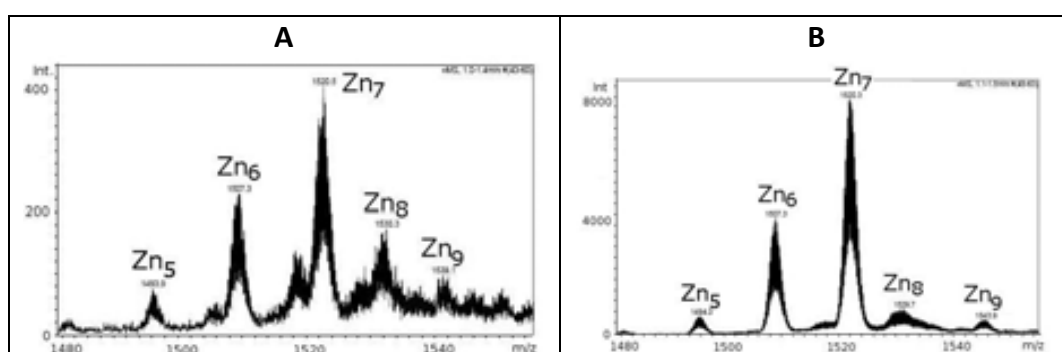
Com en mMT2, la producció de mMT3 recombinant en medis rics en aquests metalls s'ha fet seguint el protocol descrit en el capítol 6. Els complexos metall-proteïna obtinguts en cada cas s'han caracteritzat pels mètodes espectromètrics i espectroscòpics indicats en el mateix capítol 6.

### 3.3.1 Caracterització dels complexos M-mMT3 (M= Zn(II), Cd(II) i Cu(I)) biosintetitzats

#### 3.3.1.1 mMT3

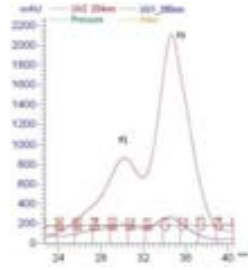
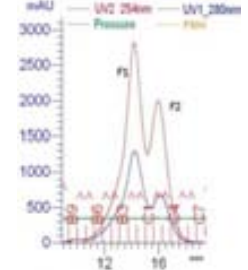
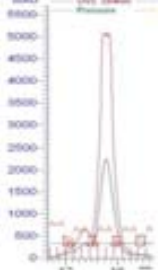

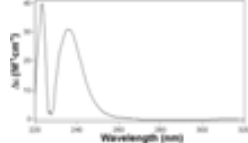
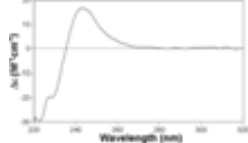
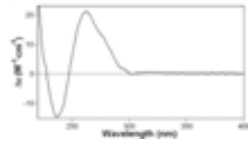
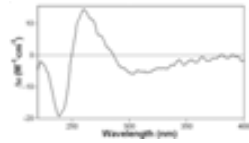
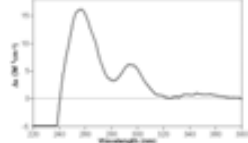
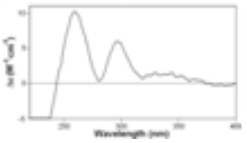
Els resultats obtinguts en la producció de mMT3 en medis rics en  $Zn^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$  i  $Cu^{2+}$ , així com de la caracterització dels seus complexos metall-MT es mostren en la Taula 13.

S'han dut a terme diverses síntesis de mMT3 en medis rics en Zn(II) sempre en les mateixes condicions. En totes elles s'han obtingut resultats analítics paral·lels si bé les dades espectroscòpiques de les diferents fraccions o preparacions presenten algunes divergències que es comenten més endavant. Els resultats que aquí s'indiquen representen la globalitat dels obtinguts. Així, en la purificació per FPLC de la síntesi de mMT3 en medi ric en Zn(II), s'obtenen dues fraccions. Les anàlisis d'ESI-MS indiquen que l'estequiometria de les espècies que conformen ambdues fraccions és la mateixa, amb una espècie majoritària  $Zn_7$ -mMT3 seguida en abundància de  $Zn_6$ -mMT3 i d'altres minoritàries amb 5, 8 i 9 Zn (Figura 44A i B). Els espectres de DC d'ambdues fraccions són molt diferents: F1 presenta una gaussiana a 240(+) nm mentre que la F2 té un *exciton coupling* en aquesta longitud d'ona (Figura 45). Aquesta diferència, que indica una heterogeneïtat estructural, pot explicar la desigualtat de temps d'elució en la purificació per FPLC. Els estudis posteriors s'han realitzat amb la segona fracció d'aquesta producció.

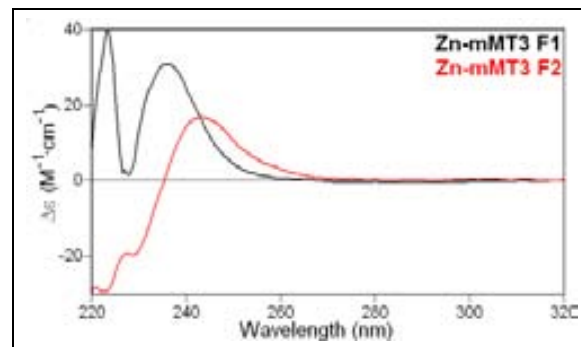


**Figura 44:** A i B: Espectres d'ESI-MS obtinguts per a mMT3 biosintetitzada en medis rics en Zn(II), F1 (A) i F2 (B) de FPLC.

Taula 13: Caracterització de les produccions de mMT3 en medis rics en Zn(II), Cd(II) i Cu(II) sota condicions d'oxigenació normal ( $\approx O_2$ ) i de baixa oxigenació ( $\downarrow O_2$ ).

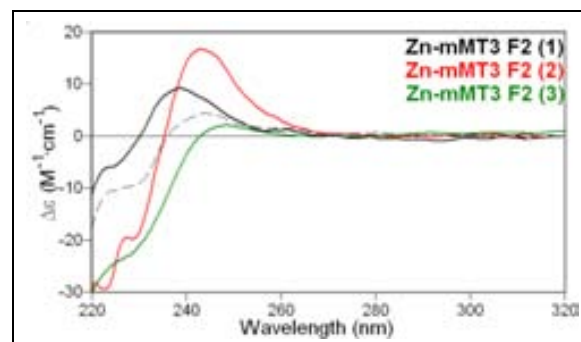
mMT3		Zn		Cd		Cu			
						$\approx O_2$	$\downarrow O_2$		
Cromatograma*									
mg de MT		1.77 mg en 5 L de cultiu		0.57 mg en 5 L de cultiu		0.58 mg en 3 L de cultiu		0.74 mg en 6 L de cultiu	
		<b>F1</b>	<b>F2</b>	<b>F1</b>	<b>F2</b>			<b>F1</b>	<b>F2</b>
ICP-OES "conv"	[MT] (M)	$0.53 \times 10^{-4}$	$1.20 \times 10^{-4}$	$0.57 \times 10^{-4}$	$0.34 \times 10^{-4}$	$0.41 \times 10^{-4}$		$0.14 \times 10^{-4}$	$0.54 \times 10^{-4}$
	Metall / proteïna	5.59 Zn	6.11 Zn	3.46 Cd.	4.62 Cd	8.26 Cu 1.95 Zn		9.28 Cu 0 Zn	10.43 Cu 0 Zn
ICP-OES "àcid"	[MT] (M)	$0.53 \times 10^{-4}$	$1.16 \times 10^{-4}$	$0.18 \times 10^{-4}$	$0.16 \times 10^{-4}$	$0.44 \times 10^{-4}$		---	$0.68 \times 10^{-4}$
	Metall / proteïna	5.00 Zn	6.11 Zn	10.8 Cd	9.57 Cd	7.77 Cu 1.96 Zn		---	9.09 Cu 0 Zn
ESI-MS <sup>&amp;</sup>		Zn <sub>7</sub> -mMT3 (✓) Zn <sub>6</sub> -mMT3 (X) Zn <sub>5</sub> -mMT3 (o) Zn <sub>8</sub> -mMT3 (o) Zn <sub>9</sub> -mMT3(o)	Zn <sub>7</sub> -mMT3 (✓) Zn <sub>6</sub> -mMT3 (X) Zn <sub>5</sub> -mMT3 (o) Zn <sub>8</sub> -mMT3 (o) Zn <sub>9</sub> -mMT3(o)	---	Cd <sub>7</sub> -mMT3 (✓) Cd <sub>7S2</sub> -mMT3 (X) Cd <sub>8</sub> -mMT3 (o)	<b>pH 7</b>	M <sub>10</sub> -mMT3 (✓) M <sub>11-12</sub> -mMT3 (o)	---	Cu <sub>10</sub> -mMT3 (✓) Cu <sub>12</sub> -mMT3 (X) Cu <sub>9-13</sub> -mMT3 (o)
						<b>pH 2.4</b>	Cu <sub>10</sub> -mMT3 (✓) Cu <sub>6</sub> -mMT3 (X) Cu <sub>11</sub> -mMT3 (o) Cu <sub>7-9</sub> -mMT3 (o)		
DC							---		

(\*) Perfil d'elució obtingut per FPLC en la purificació dels complexos metall-MT. (&) a pH 7.0, excepte quan s'indiqui específicament. (✓) espècie majoritària, (X) intermèdia i (o) minoritària.



**Figura 45:** Superposició dels espectres de DC de les dues fraccions obtingudes.

Pel que fa a les divergències espectroscòpiques observades en les diferents fraccions o preparacions, cal esmentar que cadascuna de les biosíntesis realitzades de Zn-mMT3 ha donat lloc a espectres de DC diferents (Figura 46). Donat que s'ha observat que l'espectre de la F2 de la biosíntesis 1 de Zn-mMT3 evoluciona amb el temps (espectre en ratlletes de la Figura 46) tot finalitzant amb un espectre molt proper al de la F2 de la biosíntesis 3 de Zn-mMT3, es consideren aquestes variacions com a moviments d'estabilització de la cadena proteica.

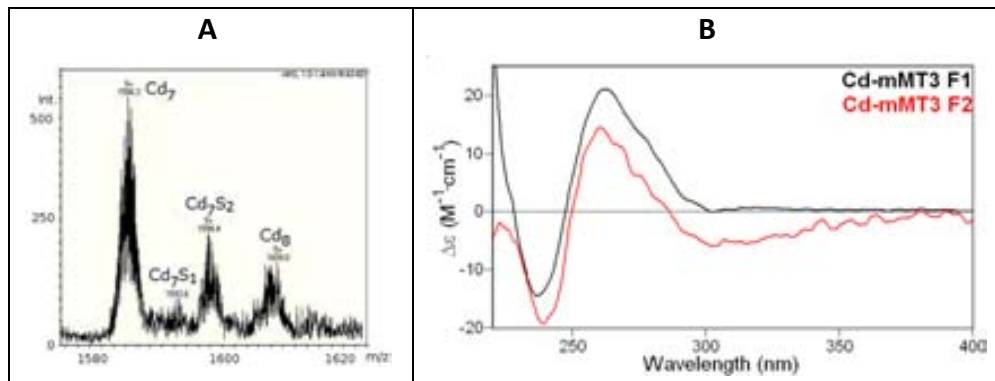


**Figura 46:** Superposició dels espectres de DC de diferents biosíntesis de Zn-mMT3.

En la síntesis de mMT3 en medis rics en  $\text{Cd}^{2+}$  es distingeixen dues fraccions en el FPLC. En aquestes preparacions s'ha observat una variació important en la concentració de proteïna i en el contingut metàl·lic determinats mitjançant ICP-OES "convencional" i ICP-OES "àcid", cosa que indica la presència d'una quantitat important de lligands sulfur en els agregats Cd-MT. Les dues fraccions són molt diluïdes, fet que impedeix l'obtenció de resultats d'ESI-MS per a la F1. En la F2, aquesta anàlisi revela una espècie majoritària amb 7 Cd, seguida d'espècies riques en  $\text{S}^{2-}$  i una espècie amb 8 Cd (Figura 47A). Ambdues fraccions presenten espectres de DC molt

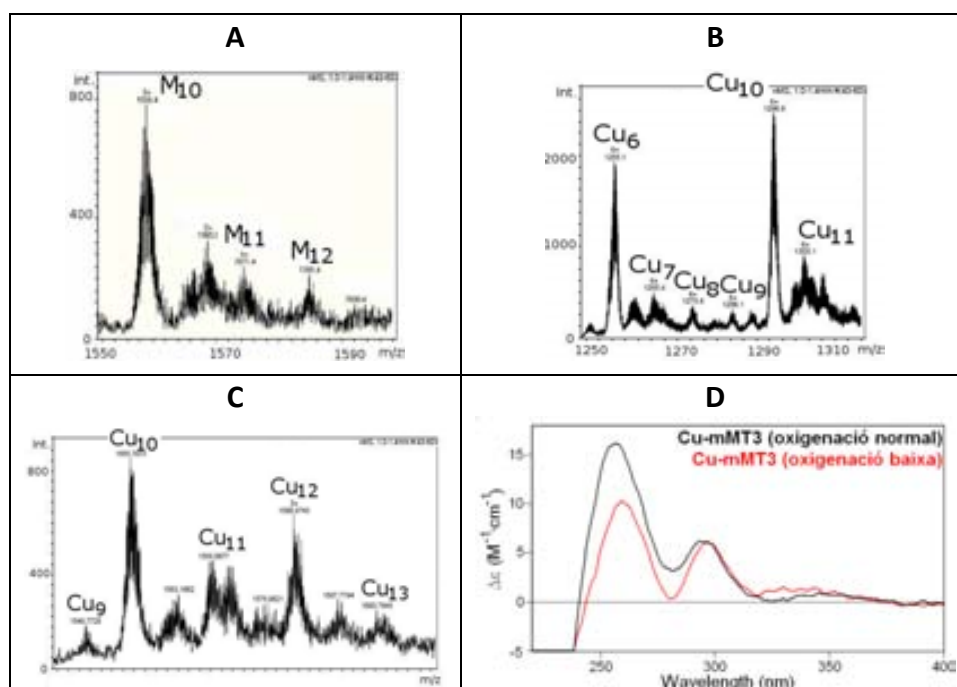


semblants, amb un *exciton coupling* centrat a 250 nm i absorcions en la zona de 280 nm, que és on absorbeixen els cromòfors Cd-S<sup>2-</sup>. (Figura 47B).



**Figura 47:** A: Espectre d'ESI-MS de la fracció F2 de FPLC de Cd-mMT3. B: Superposició dels espectres de DC de les dues fraccions obtingudes per FPLC.

Tot i que s'ha dut a terme diverses vegades, la producció de mMT3 en medis rics en Cu(II) sota condicions de baixa oxigenació del cultiu, aquesta ha donat sempre lloc a concentracions molt baixes de proteïna, per la qual cosa, força sovint no s'ha pogut realitzar totes les anàlisis posteriors habituals. En aquells casos en que s'han pogut obtenir dades analítiques, com és ara la F2 mostrada en la Taula 13, aquestes mostren que s'obtenen espècies Cu-mMT3 homonuclears en les que Cu<sub>10</sub><sup>-</sup> i Cu<sub>12</sub>-mMT3 són les espècies majoritàries (Figura 48C). En canvi, els cultius sotmesos a oxigenació normal han proporcionat poc, però suficient, producte com per a determinar, per ICP-OES, la presència de 8 Cu i 2 Zn per proteïna, i per ESI-MS, una espècie majoritària M<sub>10</sub>-mMT3 a pH neutre, que s'identifica com Cu<sub>10</sub>-mMT3 acompanyada de Cu<sub>6</sub>-mMT3 a pH àcid (Figura 48A i B). Així, els cultius sota ambdós tipus d'oxigenació donen lloc a preparacions bàsicament constituïdes per complexos homonuclears de Cu(I) en els que Cu<sub>10</sub>-mMT3 és l'espècie majoritària. Això, molt probablement, justifica que ambdós tipus de preparacions mostrin espectres de DC molt propers (Figura 48D).

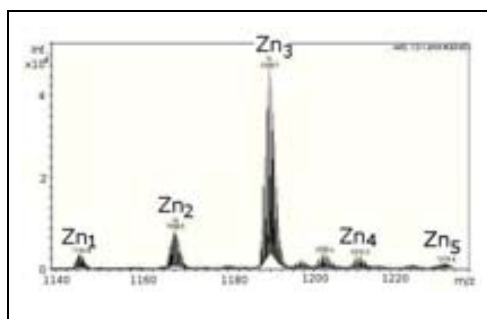


**Figura 48:** A i B: Espectres de ESI-MS a pH 7.0 (A) i pH 2.4 (B) de la preparació Cu-mMT3 biosintetitzada en cultius sota oxigenació normal. C: Espectre de ESI-MS de Cu-mMT3 biosintetitzada en cultius a baixa oxigenació. D: Superposició dels espectres de DC dels dos tipus de preparació. Tots els pics no etiquetats corresponen a adductes d'amoni dels pics principals.

### 3.3.1.2 $\beta$ mMT3

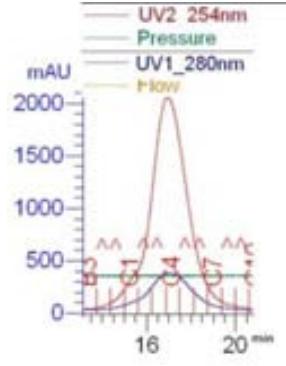
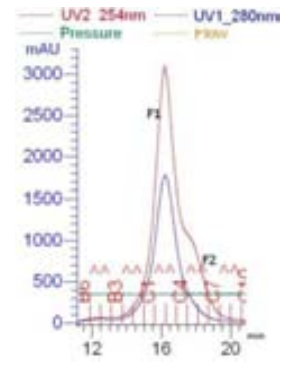

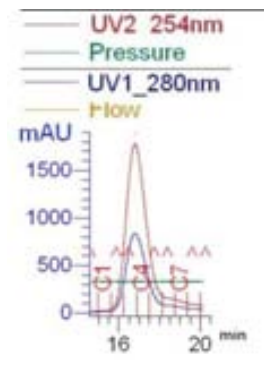
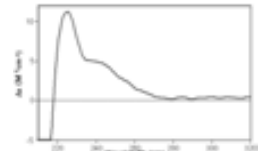
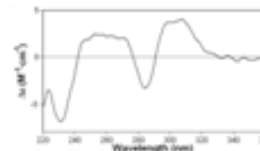
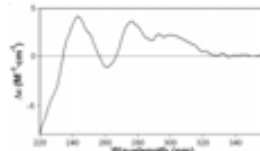
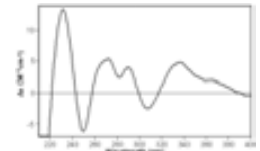
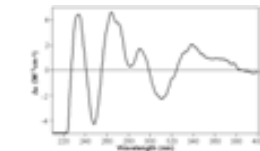
Els resultats de la síntesi del domini  $\beta$  de mMT3 en medis rics en Zn(II), Cd(II) o Cu(II) sota oxigenació normal i Cu(II) a baixa oxigenació es mostren en la Taula 14.

La síntesi de  $\beta$ mMT3 en presència de Zn(II) proporciona complexos de l'estequiometria esperada, amb una espècie majoritària que conté 3 Zn (Figura 49), però amb un espectre de DC atípic per a una Zn-MT, presentant un màxim als 225 nm i una esquena entre els 240 i 260 nm.



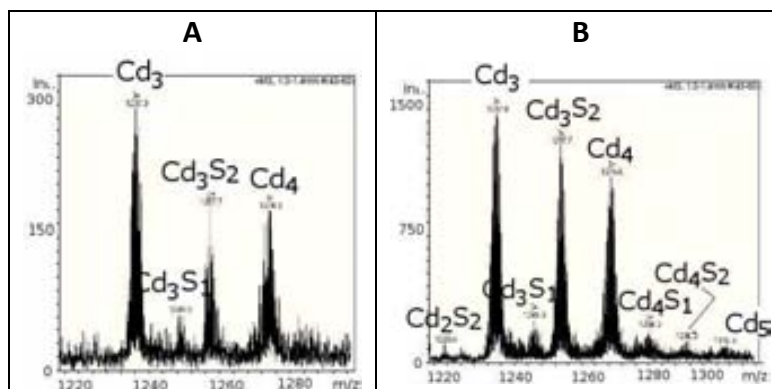
**Figura 49:** Espectre d'ESI-MS obtingut per a  $\beta$ mMT3 biosintetitzada en medi ric en Zn(II).

Taula 14: Caracterització de les produccions de  $\beta$ mMT3 en medis rics en Zn(II), Cd(II) i Cu(II) sota condicions d'oxigenació normal ( $\approx$  O<sub>2</sub>) i de baixa oxigenació ( $\downarrow$  O<sub>2</sub>).

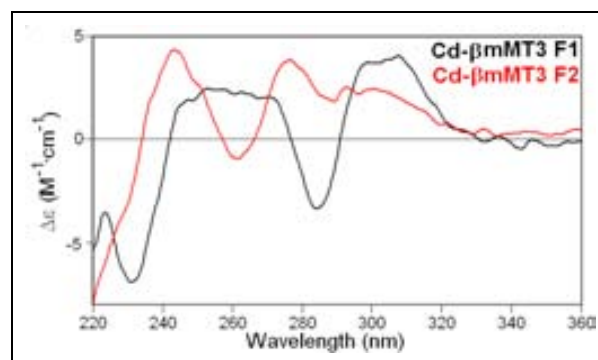
$\beta$ -mMT3		Zn	Cd		Cu	
				$\approx$ O <sub>2</sub>	$\downarrow$ O <sub>2</sub>	
Cromatograma*						
mg de MT		2.99 mg en 5 L de cultiu	0.43 mg en 5 L de cultiu		0.61 mg en 3 L de cultiu	0.24 mg en 1.5 L de cultiu
			<b>F1</b>	<b>F2</b>		
ICP-OES "conv"	[MT] (M)	3.99x10 <sup>-4</sup>	2.69x10 <sup>-4</sup>	0.87x10 <sup>-4</sup>	0.91x10 <sup>-4</sup>	0.27x10 <sup>-4</sup>
	Metall / proteïna	2.98 Zn.	1.25 Cd.	1.95 Cd	6.80 Cu 0 Zn	6.64 Cu 0 Zn.
ICP-OES "àcid"	[MT] (M)	3.41x10 <sup>-4</sup>	0.41x10 <sup>-4</sup>	0.28x10 <sup>-4</sup>	---	---
	Metall / proteïna	2.78 Zn	6.39 Cd	4.73 Cd	---	---
ESI-MS <sup>&amp;</sup>		Zn <sub>3</sub> - $\beta$ mMT3 (✓) Zn <sub>2</sub> - $\beta$ mMT3 (X) Zn <sub>1</sub> - $\beta$ mMT3 (o)	Cd <sub>3</sub> - $\beta$ mMT3 (✓) Cd <sub>3</sub> S <sub>2</sub> - $\beta$ mMT3 (X) Cd <sub>4</sub> - $\beta$ mMT3 (X) espècies sulfurades(o)	Cd <sub>3</sub> - $\beta$ mMT3 (✓) Cd <sub>3</sub> S <sub>2</sub> - $\beta$ mMT3 (X) Cd <sub>4</sub> - $\beta$ mMT3 (X) espècies sulfurades(o)	Cu <sub>6</sub> - $\beta$ mMT3 (✓) Cu <sub>5</sub> - $\beta$ mMT3 (o) Cu <sub>7</sub> - $\beta$ mMT3 (o)	Cu <sub>6</sub> - $\beta$ mMT3 (✓) Cu <sub>5</sub> - $\beta$ mMT3 (o) Cu <sub>7</sub> - $\beta$ mMT3 (o)
DC						

(\*) Perfil d'elució obtingut per FPLC en la purificació dels complexos metall-MT. (&) a pH 7.0, excepte quan s'indiqui específicament. (✓) espècie majoritària, (X) intermèdia i (o) minoritària.

En la síntesi en medis rics en Cd(II) s'obtenen dues fraccions d'elució lleugerament diferenciada en el FPLC. En les dues fraccions s'observen les mateixes espècies majoritàries:  $\text{Cd}_3$ - $\beta\text{mMT3}$ ,  $\text{Cd}_3\text{S}_2$ - $\beta\text{mMT3}$  i  $\text{Cd}_4$ - $\beta\text{mMT3}$  que tant sols divergeixen en les seves abundàncies relatives i altres espècies molt minoritàries amb lligands sulfur (Figura 50A i B). Tot i així, els espectres de DC d'ambdues fraccions són molt diferents. Cap d'ells presenta una empremta típica de les Cd-MT, ara bé ambdós són indicatius d'una gran presència de lligands sulfur per les absorcions a longituds d'ona superiors als 280 nm (Figura 51).

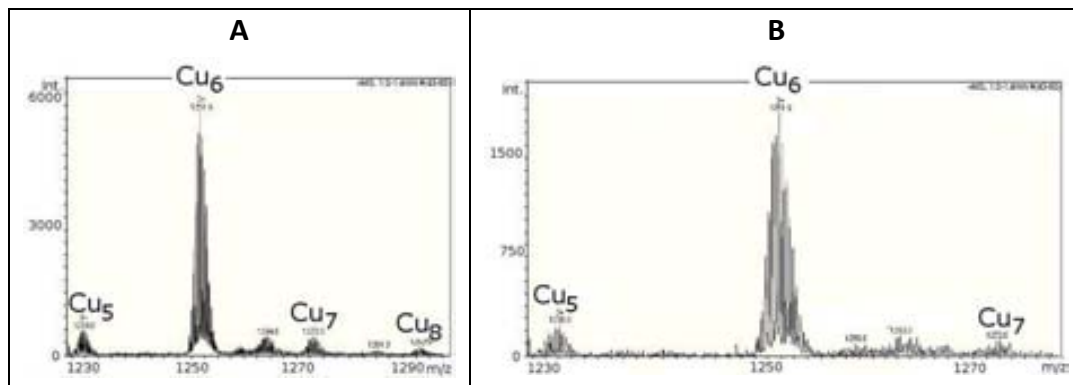


**Figura 50:** A i B: Espectres d'ESI-MS obtinguts per a  $\beta\text{mMT3}$  biosintetitzada en medis rics en Cd(II), F1 (A) i F2 (B).

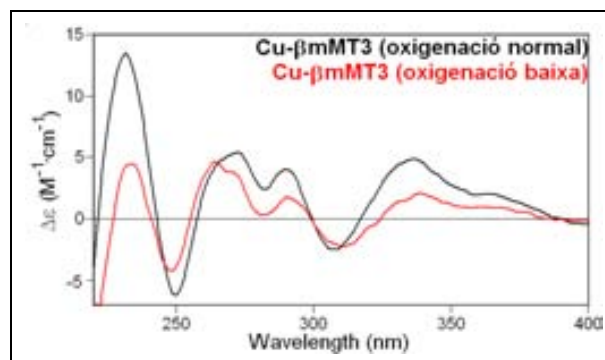


**Figura 51:** Superposició dels espectres de DC de les dues fraccions obtingudes.

La síntesi de  $\beta\text{mMT3}$  en medis rics en Cu(II), no mostra diferències importants en funció del grau d'oxigenació dels cultius. Així, en ambdós casos s'obtenen espècies homometàl·liques amb  $\text{Cu}_6$ - $\beta\text{mMT3}$  com espècie majoritària i alguna espècie molt minoritària amb 5 o 7 Cu (Figura 52). Donada aquesta similitud, els espectres de DC d'ambdós tipus de preparació també són força coincidents (Figura 53).



**Figura 52:** A i B: Espectres d'ESI-MS obtinguts per a les mostres Cu- $\beta$ mMT3 biosintetitzades en cultius sota oxigenació normal (A) i baixa oxigenació (B).

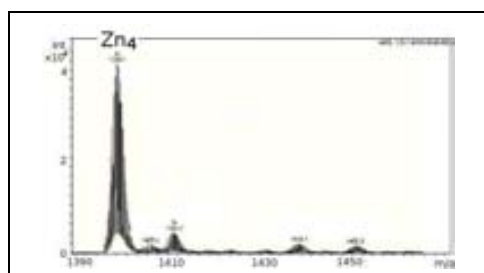


**Figura 53:** Superposició dels espectres de DC dels dos tipus de biosíntesis.

### 3.3.1.3 $\alpha$ mMT3

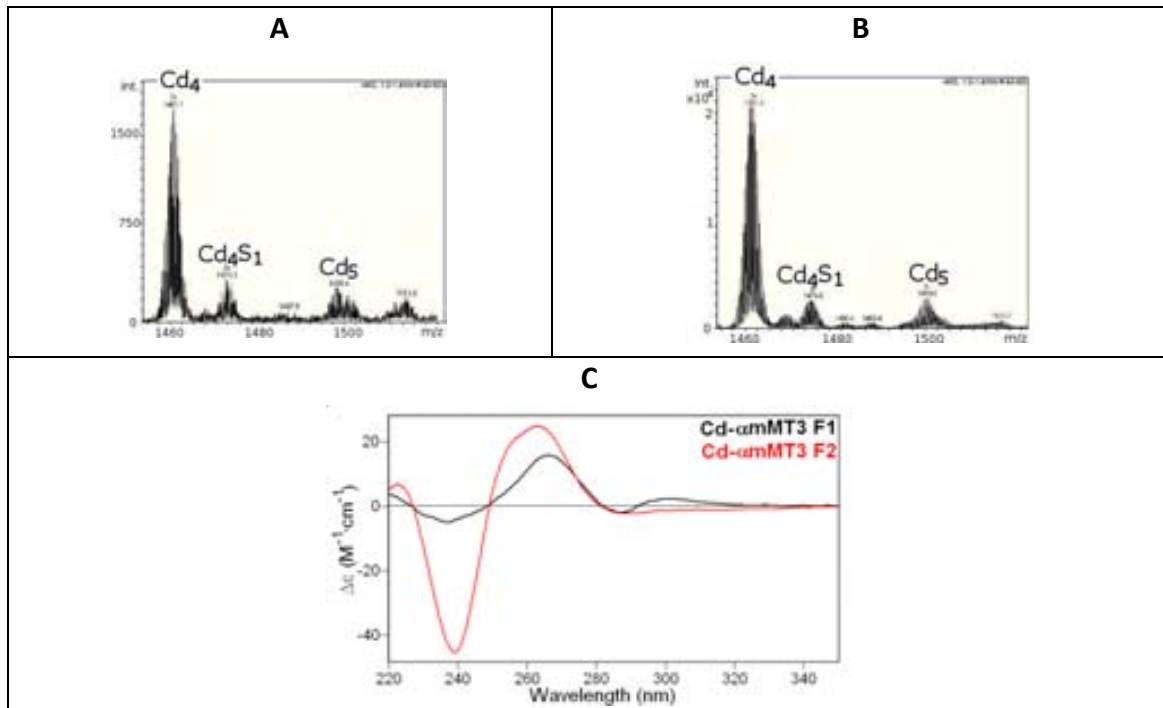
Els resultats obtinguts en les síntesis recombinants del domini  $\alpha$  de mMT3 en medis rics en  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$  o  $\text{Cu}^{2+}$  i la seva posterior caracterització es mostren en la Taula 15.

En la síntesi de  $\alpha$ mMT3 en medi ric en Zn(II) s'obté com a espècie única  $\text{Zn}_4$ - $\alpha$ mMT3 (Figura 54). L'espectre de DC presenta l'*exciton coupling* a 240 nm característic de les Zn-MT.



**Figura 54:** Espectre d'ESI-MS del complex  $\text{Zn}_4$ - $\alpha$ mMT3. Tots els pics no etiquetats corresponen a adductes d'amoni del pic principal.

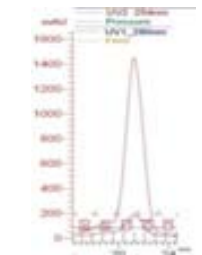
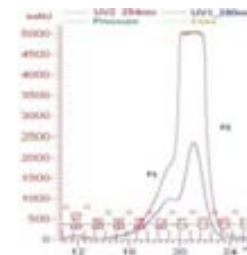
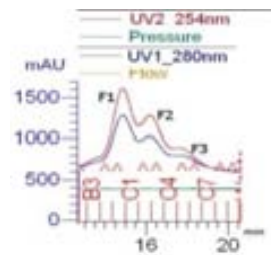
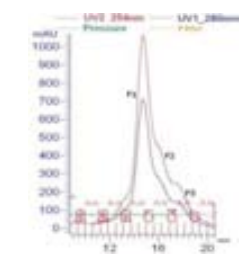
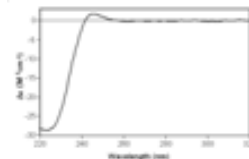
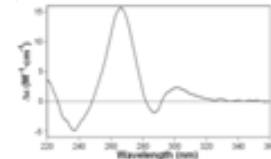
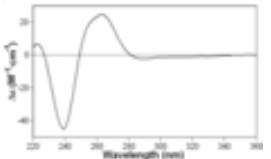
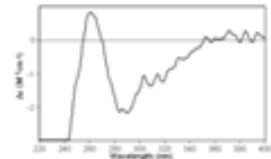
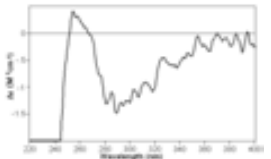
En la purificació de  $\alpha$ mMT3 de cultius enriquits en Cd(II) es recullen dues fraccions en l'elució de FPLC. Ambdues fraccions tenen una composició similar pel que fa a l'estequiometria de les espècies que les componen amb  $\text{Cd}_4$ - $\alpha$ mMT3 com a majoritària i  $\text{Cd}_5$ - i  $\text{Cd}_4\text{S}_1$ - $\alpha$ mMT3 com a minoritàries (Figura 55A i B). Els espectres de DC d'ambdues fraccions no són iguals si bé els dos mostren un *exciton coupling* a 250 nm i absorcions per sobre de 280 nm (Figura 55C).



**Figura 55:** A i B: Espectres d'ESI-MS obtinguts per a Cd- $\alpha$ mMT3, F1 (A) i F2 (B) de FPLC. C: Superposició dels espectres de DC de les dues fraccions.

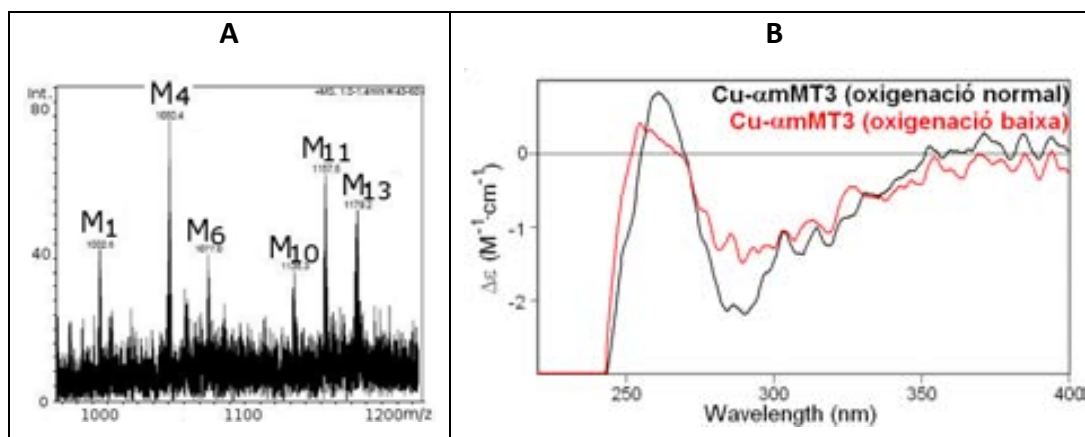
S'han fet múltiples produccions del domini  $\alpha$  de mMT3 en medis rics en Cu(II), tant a oxigenació normal com baixa oxigenació del cultiu. Sempre s'han obtingut mostres molt diluïdes, dificultant les anàlisis espectroscòpiques i espectromètriques posteriors. Malgrat que es varen separar en un primer moment 3 fraccions en cadascuna de les produccions, les anàlisis indiquen que totes elles tenen característiques idèntiques de manera que els resultats de la Taula 15 mostren els valors conjunts (Figura 56A). En biosintetitzar  $\alpha$ mMT3 en medi ric en Cu(II) sota una oxigenació normal, s'obté una barreja d'espècies heterometàl·liques d'acord amb els resultats d'ESI-MS (Figura 56A) i els d'ICP-OES. Malauradament, la baixa quantitat de proteïna obtinguda ha impossibilitat la caracterització completa de les espècies per ESI-MS a pH 2.4.

Taula 15: Caracterització de les produccions de  $\alpha$ mMT3 en medis rics en Zn(II), Cd(II) i Cu(II) sota condicions d'oxigenació normal ( $\approx O_2$ ) i de baixa oxigenació ( $\downarrow O_2$ ).

$\alpha$ -mMT3		Zn	Cd	Cu		
				$\approx O_2$	$\downarrow O_2$	
Cromatograma*						
mg de MT		2.49 mg en 5 L de cultiu	1.18 mg en 5 L de cultiu		0.31 mg en 3 L de cultiu	0.21 mg en 3 L de cultiu
			F1	F2		
ICP-OES "conv"	[MT] (M)	$3.91 \times 10^{-4}$	$1.65 \times 10^{-4}$	$2.58 \times 10^{-4}$	$0.26 \times 10^{-4}$	$0.13 \times 10^{-4}$
	Metall / proteïna	4.58 Zn	1.55 Cd	3.26 Cd	3.57 Cu 1.62 Zn	6.78 Cu 0 Zn
ICP-OES "àcid"	[MT] (M)	$3.28 \times 10^{-4}$	$0.25 \times 10^{-4}$	$1.30 \times 10^{-4}$	---	---
	Metall / proteïna	4.28 Zn	7.86 Cd	5.14 Cd	---	---
ESI-MS&		Zn <sub>4</sub> - $\alpha$ mMT3 (✓)	Cd <sub>4</sub> - $\alpha$ mMT3 (✓) Cd <sub>4</sub> S <sub>1</sub> - $\alpha$ mMT3 (o) Cd <sub>5</sub> - $\alpha$ mMT3 (o)	Cd <sub>4</sub> - $\alpha$ mMT3 (✓) Cd <sub>5</sub> - $\alpha$ mMT3 (o) Cd <sub>4</sub> S <sub>1</sub> - $\alpha$ mMT3 (o)	M <sub>4</sub> - $\alpha$ mMT3 (✓) M <sub>11</sub> - $\alpha$ mMT3 (X) M <sub>13</sub> - $\alpha$ mMT3 (X) M <sub>1</sub> - $\alpha$ mMT3 (o) M <sub>6</sub> - $\alpha$ mMT3 (o) M <sub>10</sub> - $\alpha$ mMT3 (o)	---
DC						

(\* ) Perfil d'elució obtingut per FPLC en la purificació dels complexos metall-MT. (&) a pH 7.0, excepte quan s'indiqui específicament. (✓) espècie majoritària, (X) intermèdia i (o) minoritària.

En la biosíntesis a baixa oxigenació s'obtenen complexos homometàl·lics de Cu(I) d'acord amb les dades d'ICP-OES dels quals tampoc s'ha pogut determinar l'estequiometria per ESI-MS. Els espectres de DC, de molt baixa intensitat, són equivalents per ambdós tipus de producció (Figura 56B).

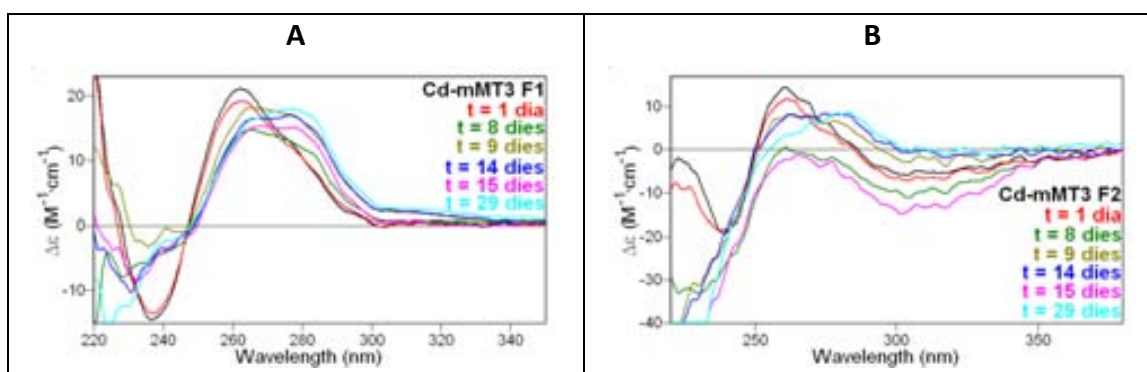


**Figura 56:** A: Espectre d'ESI-MS a pH 7.0 obtingut per a Cu-αmMT3 sintetitzada en medi ric en Cu(II) en cultiu sota una oxigenació normal. B: Superposició dels espectres de DC dels dos tipus de producció.

### 3.3.2.1 VARIACIÓ AMB EL TEMPS DELS COMPLEXOS Cd-mMT3, Cd-βmMT3 i Cd-αmMT3

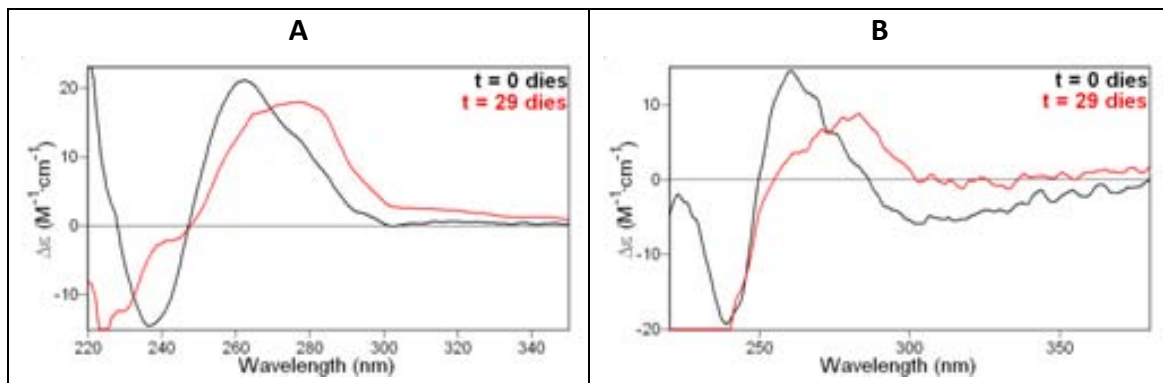
#### Variació amb el temps de Cd-mMT3:

S'ha estudiat l'evolució al llarg del temps dels espectres de DC de les dues fraccions de la producció de Cd-mMT3. En ambdues fraccions s'havien detectat espècies que contenien lligands sulfur i conseqüentment s'han observat variacions paral·leles dels seus espectres de DC que es desplacen cap a *ca.* 280 nm (Figura 57 i Figura 58).



**Figura 57:** Evolució durant 29 dies dels espectres de DC de les preparacions Cd-mMT3 a 25 °C: F1 (A) i F2 (B).

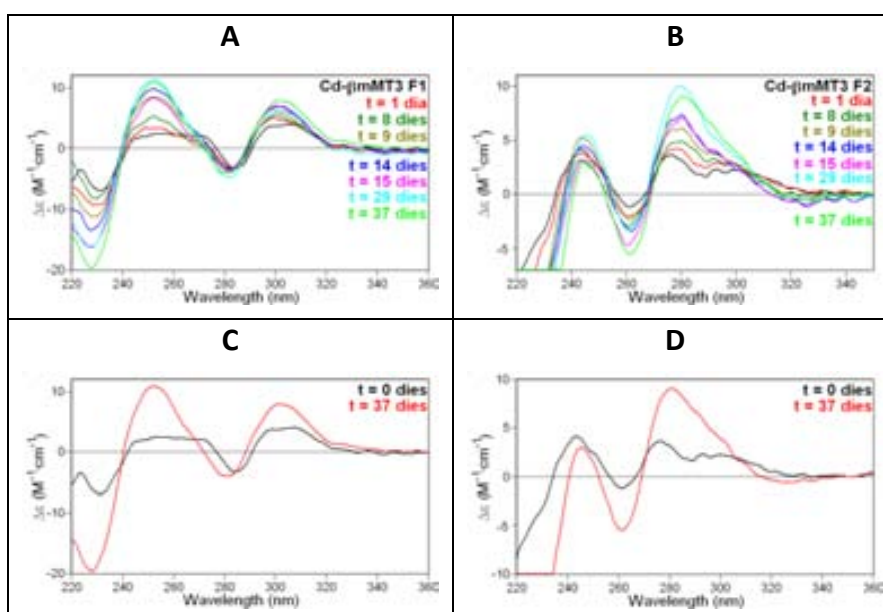




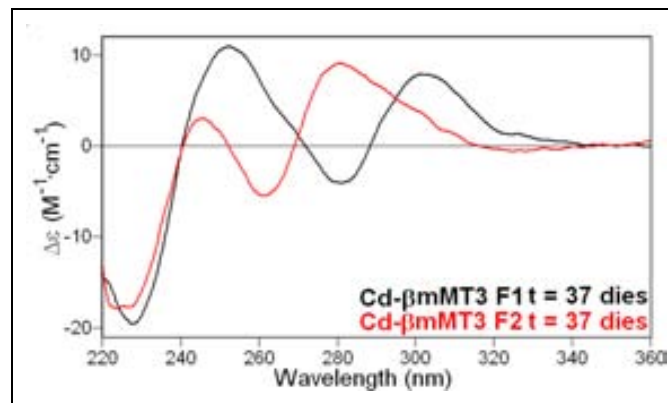
**Figura 58:** Superposició dels espectres de DC inicial i evolucionat 29 dies dels complexos Cd-mMT3 per a cadascuna de les fraccions de la producció: F1 (A) i F2 (B).

#### Variació amb el temps de Cd-βmMT3:

S'ha estudiat l'evolució dels espectres de DC de les dues fraccions de la síntesis de Cd-βmMT3 degut al fet que en ambdues s'havia detectat una presència important d'agregats Cd-S<sup>2-</sup>-MT. Els canvis observats en els espectres de DC indiquen que els complexos presents en solució s'estructuren a mesura que passen els dies, ja que es passa d'uns espectres poc habituals per a una Cd-MT a uns espectres molt més propers als esperats, que mostren molt més ben definides les absorpcions a 250 nm i a *ca.* 280-300 nm (Figura 59). Cada fracció segueix la seva pròpia evolució, arribant les dues a uns espectres de DC que suggereixen una estructuració diferent dels complexos de cada preparació (Figura 60).



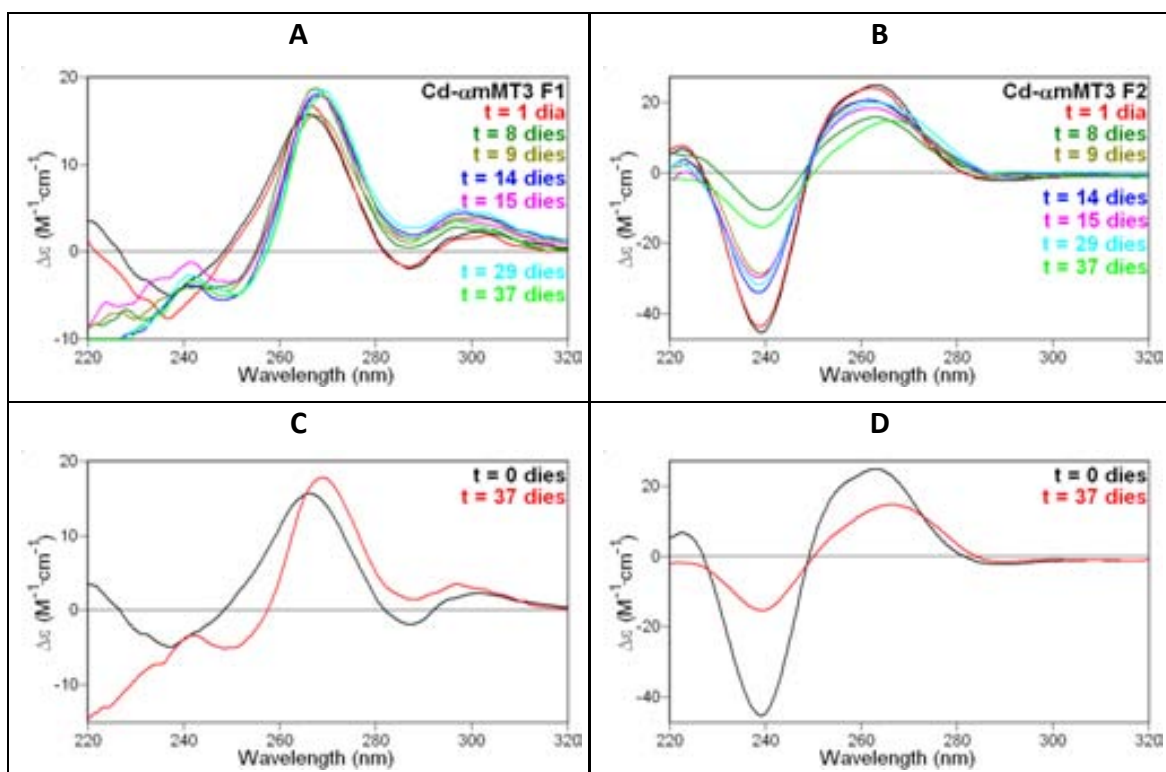
**Figura 59:** A i B: Evolució amb el temps dels espectres de DC de la preparació Cd-βmMT3 a 25 °C: F1 (A) i F2 (B). C i D: Superposició dels espectres de DC inicial i als 37 dies per a cadascuna de les fraccions de la biosíntesis de Cd-βmMT3: F1 (C) i F2 (D).



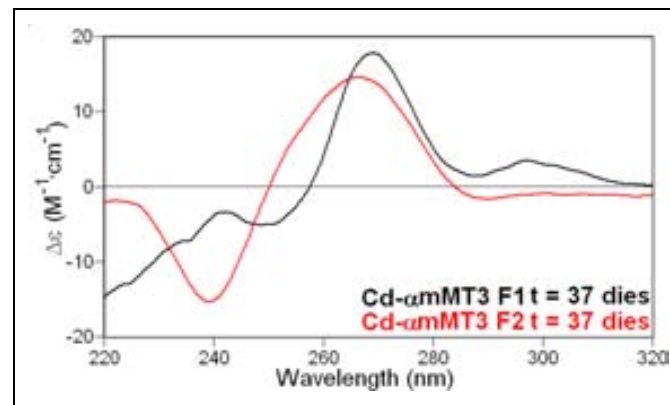
**Figura 60:** Superposició dels espectres de DC als 37 dies d'evolució a 25 °C de les dues fraccions Cd-βmMT3.

#### Variació amb el temps de Cd-αmMT3:

S'ha estudiat la variació al llarg del temps de les dues fraccions de les preparacions Cd-αmMT3 que contenen complexos Cd<sub>4</sub>S<sub>1</sub>-αmMT3. Els espectres de DC de les dues fraccions evolucionen al llarg del temps (Figura 61), cosa que indica canvis en la estructuració dels complexos que les componen (Figura 62).

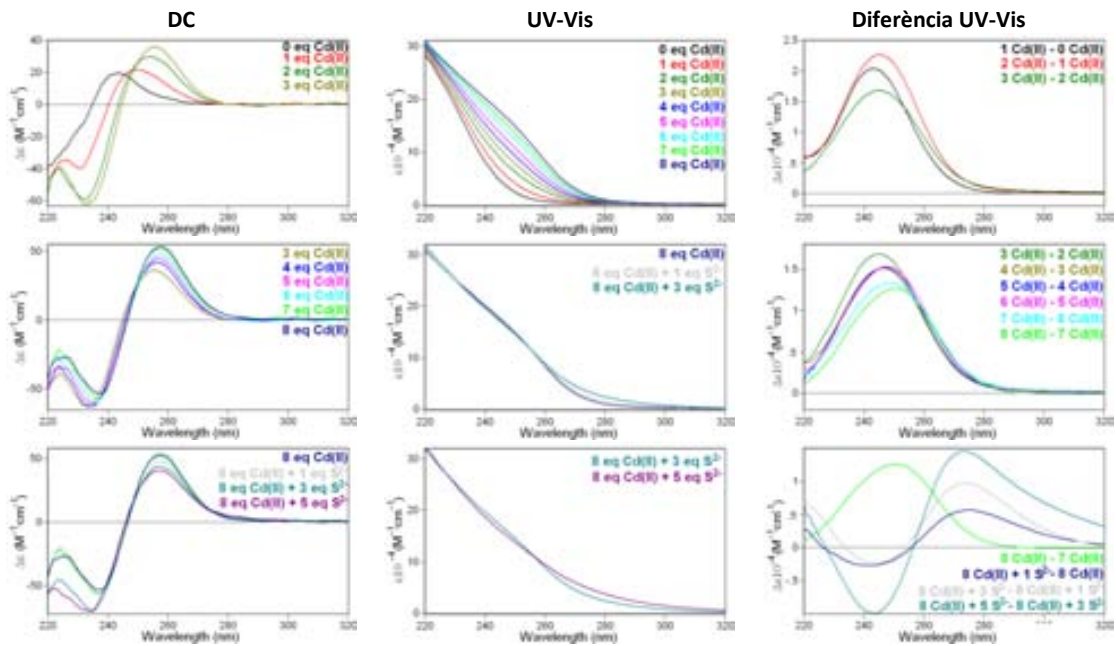


**Figura 61:** A i B: Evolució durant 37 dies a 25 °C dels espectres de DC dels complexos Cd-αmMT3 a 25 °C: F1 (A) i F2 (B). C i D: Superposició dels espectres inicial i evolucionat de les dues fraccions dels complexos Cd-αmMT3, F1 (C) i F2 (D).

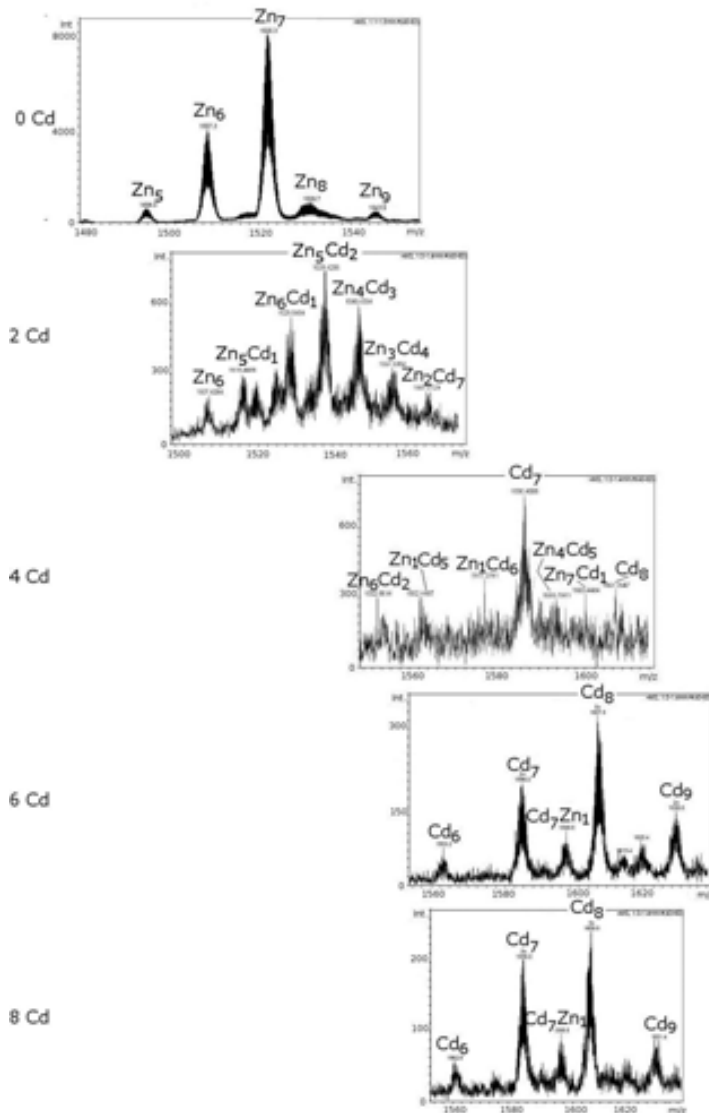


**Figura 62:** Superposició dels espectres finals de les dues fraccions de Cd- $\alpha$ MT3 que han variat al llarg del temps a 25 °C.

## LÀMINA 22. Valoració de Zn-mMT3 amb Cd(II)



### ESI-MS:



	Equivalents de Cd(II) afegits				
	0	2	4	6	8
Zn <sub>6</sub>	X	o			
Zn <sub>7</sub>	✓				
Zn <sub>5</sub> Cd <sub>1</sub>		o			
Zn <sub>6</sub> Cd <sub>1</sub>		X			
Zn <sub>5</sub> Cd <sub>2</sub>		✓			
Zn <sub>4</sub> Cd <sub>3</sub>		X			
Zn <sub>3</sub> Cd <sub>4</sub>		o			
Cd <sub>5</sub>				o	o
Zn <sub>1</sub> Cd <sub>5</sub>			X		
Cd <sub>7</sub>			✓	X	✓
Cd <sub>7</sub> Zn <sub>1</sub>			o	o	X
Cd <sub>8</sub>			o	✓	✓
Cd <sub>9</sub>				o	X

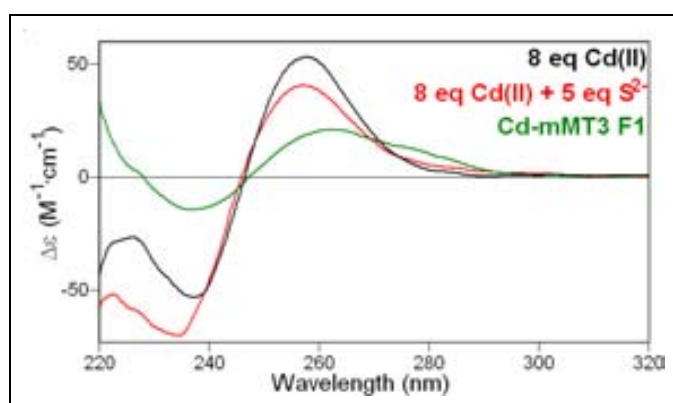
Espècies observades en els espectres d'ESI-MS: majoritària (✓), intermèdia (X) i minoritària (o).

### 3.3.2 Caracterització dels complexos *M*-mMT3 (*M*=Zn(II), Cd(II) o Cu(I)) formats *in vitro*

#### 3.3.2.1 VALORACIÓ DE Zn-mMT3, Zn- $\beta$ mMT3 I Zn<sub>4</sub>- $\alpha$ mMT3 AMB Cd(II)

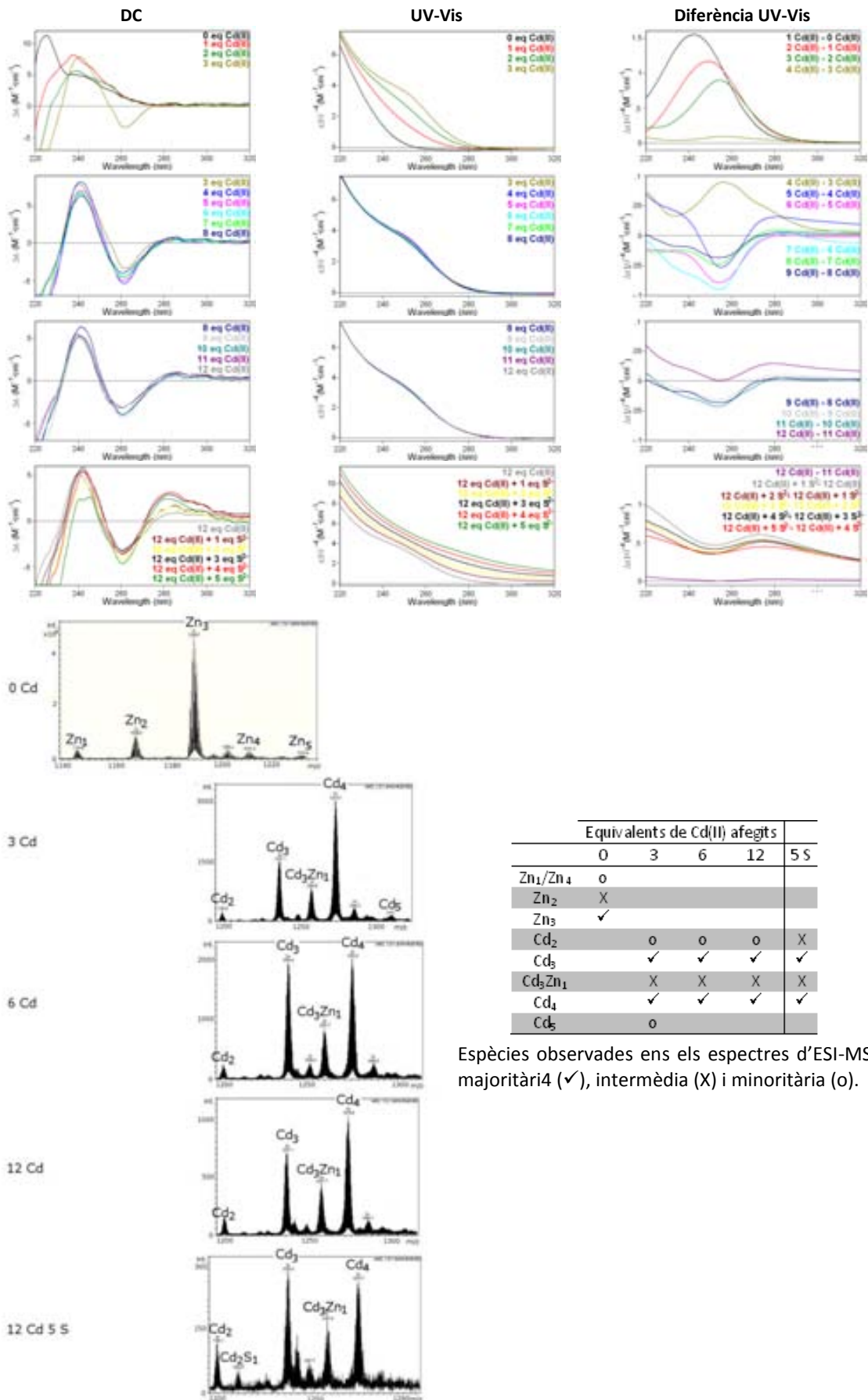
##### Zn-mMT3 amb Cd(II) (Làmina 22):

Les dades espectroscòpiques i espectromètriques enregistrades a llarg de les valoracions de la segona fracció de FPLC de mMT3 biosintetitzada en medis rics en Zn(II) indiquen la substitució de Zn per Cd. A partir del 7è equivalent de Cd<sup>2+</sup> afegit a la preparació Zn-mMT3, la mostra presenta un espectre de DC invariant que es manté tant en presència d'excés de metall com després d'afegir Na<sub>2</sub>S a la preparació. Al final de la valoració s'obté una barreja d'espècies amb Cd<sub>8</sub>- i Cd<sub>7</sub>-mMT3 com a majoritàries. S'ha observat que quan ja hi ha Cd<sub>7</sub>- i Cd<sub>8</sub>-mMT3 en solució i fins i tot en presència d'un clar excés de Cd(II), hi ha una espècie minoritària que conté un Zn<sup>2+</sup> (Cd<sub>7</sub>Zn<sub>1</sub>-mMT3) que es manté como a tal en solució, indicant que mMT3 és reticent a l'intercanvi total del Zn<sup>2+</sup> pel Cd<sup>2+</sup> en els seus complexos. L'espectre de DC de la mostra al final de la valoració no coincideix amb el de la preparació recombinant Cd-mMT3, ni tant sols després d'afegir-hi ions sulfur (Figura 63).



**Figura 63:** Superposició dels espectres de DC de Cd-mMT3 biosintetitzada amb els de les mostres obtingudes *in vitro* després d'afegir 8 equivalents de Cd(II) i 5 equivalents de S<sup>2-</sup> a Zn-mMT3.

## LÀMINA 23. Valoració de Zn-βmMT3 amb Cd(II)

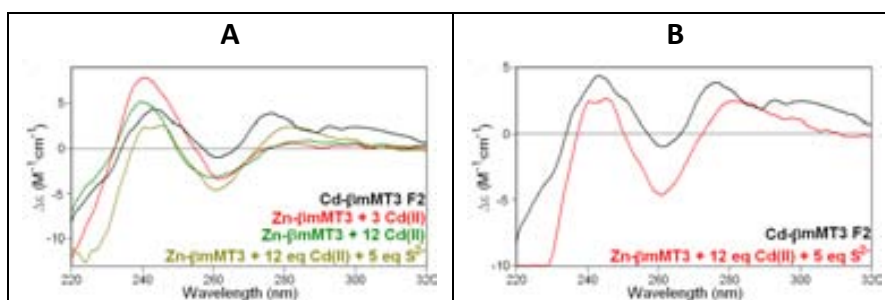


	Equivalents de Cd(II) afegits				
	0	3	6	12	5 S
Zn <sub>1</sub> /Zn <sub>4</sub>	o				
Zn <sub>2</sub>	X				
Zn <sub>3</sub>	✓				
Cd <sub>2</sub>	o	o	o	o	X
Cd <sub>3</sub>	✓	✓	✓	✓	✓
Cd <sub>3</sub> Zn <sub>1</sub>	X	X	X	X	X
Cd <sub>4</sub>	✓	✓	✓	✓	✓
Cd <sub>5</sub>	o				

Espècies observades en els espectres d'ESI-MS: majoritària (✓), intermèdia (X) i minoritària (o).

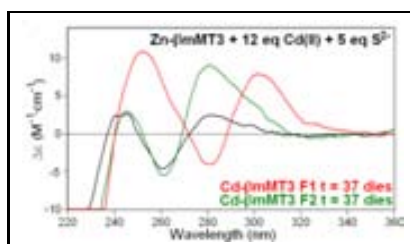
Zn- $\beta$ mMT3 amb Cd(II) (Làmina 23):

Al llarg de la valoració amb Cd(II) de les preparacions Zn- $\beta$ mMT3 biosintetitzades, s'observa la substitució del Zn(II) pel Cd(II) fins als 3 equivalents de Cd<sup>2+</sup> afegits, arribant a un espectre de DC que es manté en excés de Cd(II) i que és diferent al de les preparacions Cd- $\beta$ mMT3 recombinants (Figura 64A). En afegir ions sulfur al final de la valoració, s'observa una lleugera modificació de l'espectre de DC en la zona dels cromòfors Cd-S<sup>2-</sup> (ca. 280 nm) que fa que aquest s'apropi més al de la F2 de la biosíntesis de Cd- $\beta$ mMT3 (Figura 64B). D'acord amb les variacions observades per DC, els espectres d'ESI-MS mostren que les espècies formades després d'afegir el tercer equivalent de Cd(II) es mantenen en solució tan després d'afegir un excés de Cd(II) com ions sulfur. Com a espècies majoritàries s'observen Cd<sub>3</sub>- $\beta$ mMT3 i Cd<sub>4</sub>- $\beta$ mMT3 seguides de Cd<sub>3</sub>Zn<sub>1</sub>- $\beta$ mMT3 i d'altres minoritàries (algunes amb lligands sulfur). Cal destacar, que tal i com ja s'havia observat per mMT3,  $\beta$ mMT3 és reticent a substituir tot el Zn<sup>2+</sup> inicialment enllaçat per Cd<sup>2+</sup>, tal com mostra la persistència en solució de l'espècie Zn<sub>1</sub>Cd<sub>3</sub>- $\beta$ mMT3.



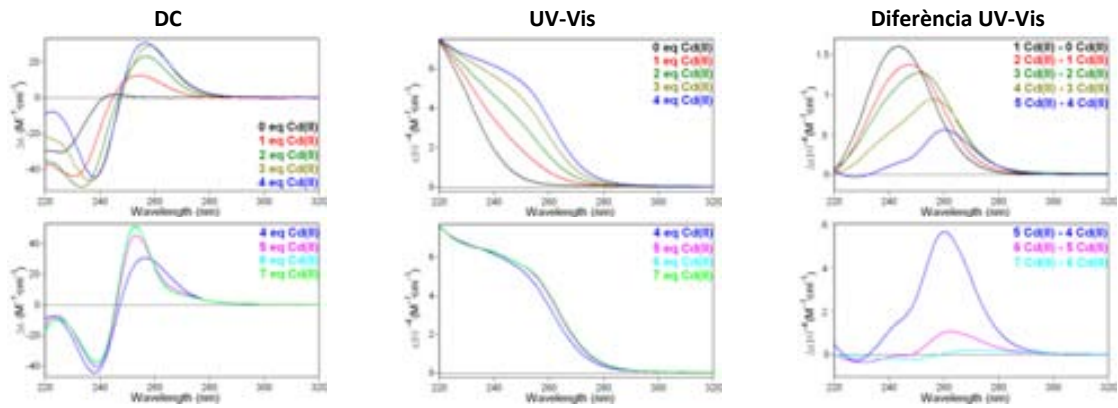
**Figura 64:** Superposició d'espectres de DC de la F2 de la biosíntesis de  $\beta$ mMT3 produïda en medi ric en Cd(II) i els complexos obtinguts *in vitro* en afegir a Zn- $\beta$ mMT3 3 i 12 eq de Cd(II) i 5 eq de Na<sub>2</sub>S.

És important mencionar aquí que l'espectre de DC de la mostra després d'haver afegit 12 equivalents de Cd<sup>2+</sup> i 5 de S<sup>2-</sup> té una semblança a l'espectre de DC de la fracció F2 obtinguda en la biosíntesis de Cd- $\beta$ mMT3 després d'haver-la deixat evolucionar durant 37 dies (Figura 65).

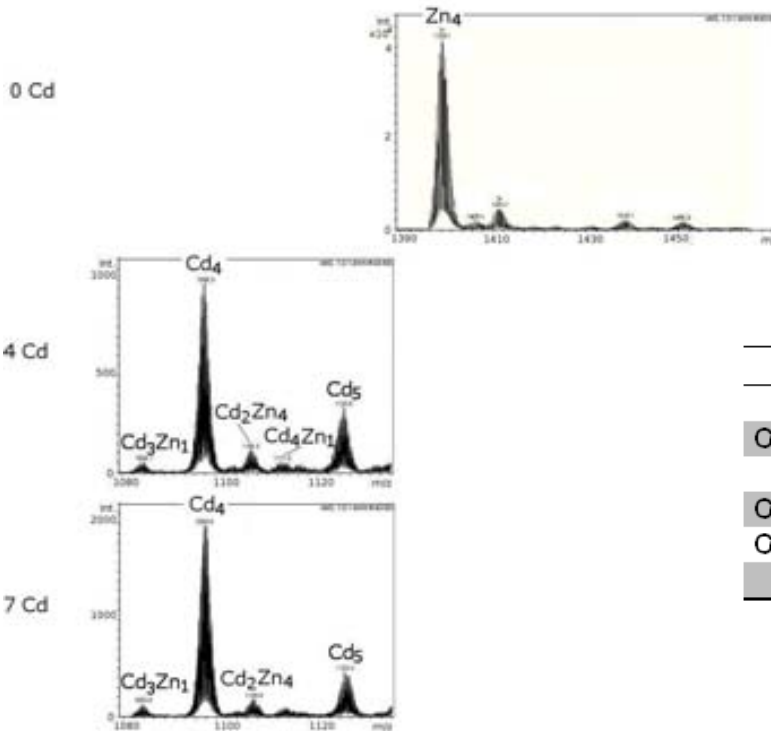


**Figura 65:** Superposició dels espectres de DC de l'evolució amb el temps de les dues fraccions de Cd- $\beta$ mMT3, amb el complex obtingut *in vitro* després d'afegir 12 eq de Cd<sup>2+</sup> i 5 de S<sup>2-</sup>.

## LÀMINA 24. Valoració de Zn-omMT3 amb Cd(II)



ESI-MS:



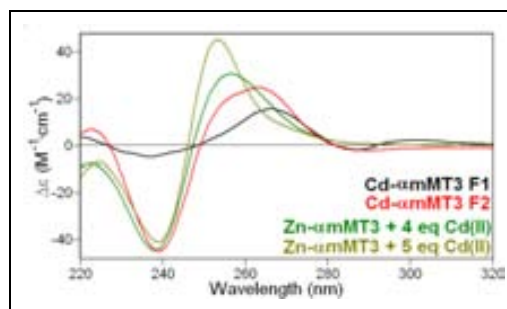
	Equivalent s de Cd(II) afegit s		
	0	4	7
Zn <sub>4</sub>	✓		
Cd <sub>3</sub> Zn <sub>1</sub>		o	o
Cd <sub>4</sub>		✓	✓
Cd <sub>2</sub> Zn <sub>4</sub>		o	o
Cd <sub>4</sub> Zn <sub>1</sub>		o	
Cd <sub>5</sub>		X	X

Espècies observades en els espectres d'ESI-MS: majoritària (✓), intermèdia (X) i minoritària (o).



Zn<sub>4</sub>- $\alpha$ mMT3 amb Cd(II) (Làmina 24):

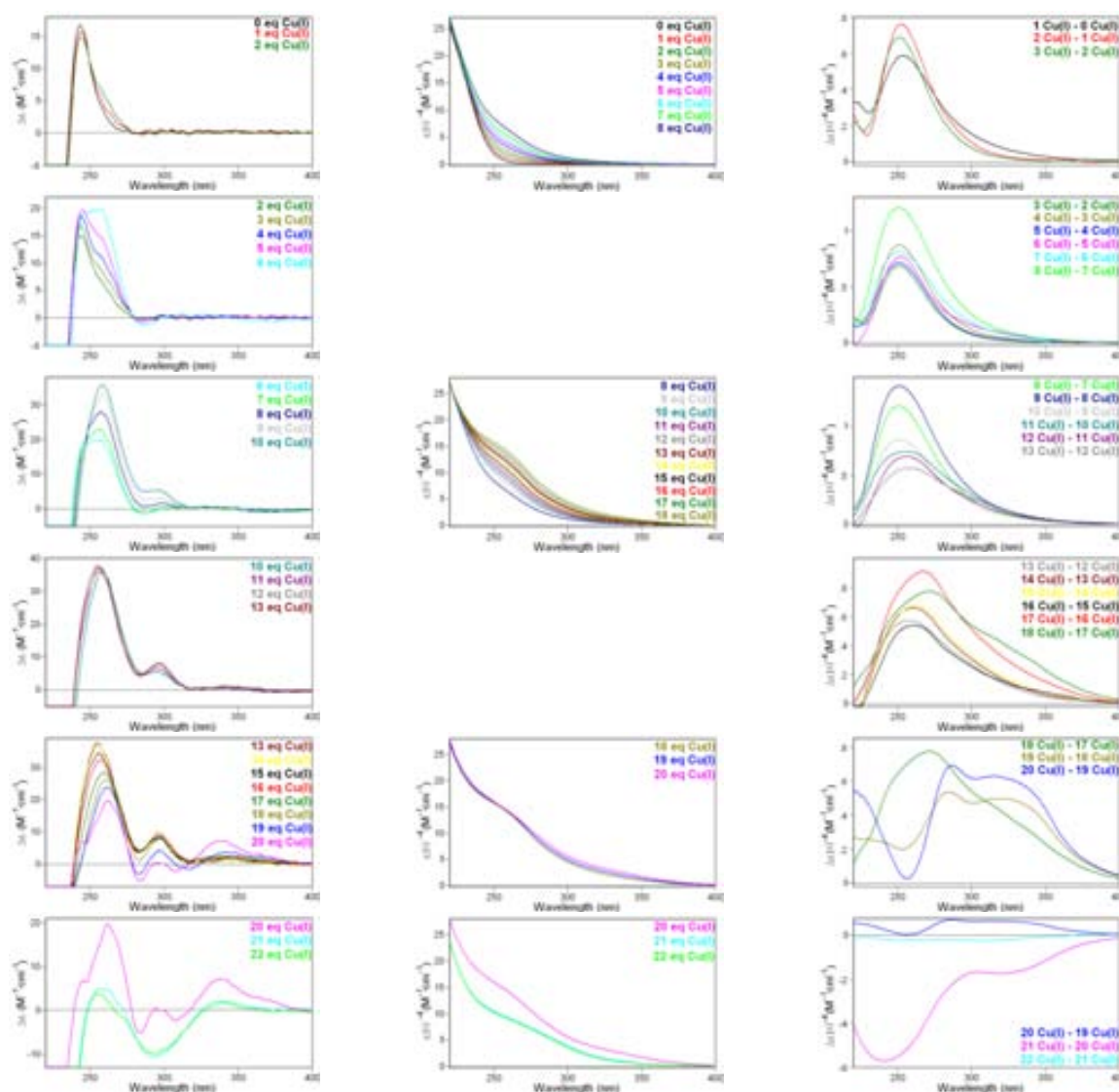
Les dades espectroscòpiques i espectromètriques enregistrades al llarg de les valoracions amb Cd(II) dels complexos Zn<sub>4</sub>- $\alpha$ mMT3 amb Cd(II) mostren la substitució no cooperativa del Zn<sup>2+</sup> pel Cd<sup>2+</sup>. Pel quart equivalent de Cd(II) afegit, s'obté com espècie majoritària Cd<sub>4</sub>- $\alpha$ mMT3, seguida de Cd<sub>5</sub>- $\alpha$ mMT3 i d'altres espècies minoritàries heteronuclears amb 4, 5 ó 6 metalls divalents complexats. L'espectre de DC en aquest punt presenta una banda en forma de derivada a 250 nm, i una certa semblança amb la F2 de les preparacions de  $\alpha$ mMT3 biosintetitzades en medi ric en Cd(II) (Figura 66). En afegir el 5è equivalent de Cd(II), l'espectre de DC pateix una modificació important, indicant un canvi conformacional dels complexos Cd- $\alpha$ mMT3 però que no modifica ni l'estequiometria ni la proporció relativa de les espècies presents en solució (Figura 66).



**Figura 66:** Superposició dels espectres de DC de les dues fraccions de Cd- $\alpha$ mMT3 recombinant amb els complexos obtinguts *in vitro* en afegir 4 i 5 equivalents de Cd(II) a Zn<sub>4</sub>- $\alpha$ mMT3.

## LÀMINA 25. Valoració de Zn-mMT3 amb Cu(I)

25A: Dades espectroscòpiques i taula de resultats d'ESI-MS (25B: pàgines següents)



pH7	Equivalents de Cu(I) afegits												
	0	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	21	22
Apo												✓	✓
M <sub>1</sub>												X	X
M <sub>2</sub>	X	X											
M <sub>7</sub>	✓	✓	X	o									
M <sub>8</sub>	X	✓	✓	X	o								X
M <sub>9</sub>		o	o	o									X
M <sub>10</sub>		o	o	✓	✓	✓	✓	✓	✓	X	X		
M <sub>11</sub>			o	o	X	o	X	o	✓	X			
M <sub>12</sub>			X	o	X	X	o	✓					
M <sub>13</sub>					o	X	X	X					
M <sub>14</sub>								X					
M <sub>15</sub>								X					
M <sub>15</sub>								X					

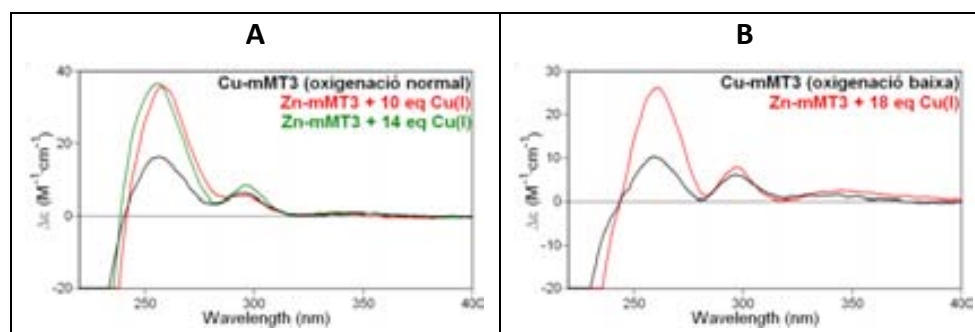
pH2.4	Equivalents de Cu(I) afegits													
	0	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	21	22	
Apo	✓	✓	✓	✓	✓	X						✓	✓	✓
Qu <sub>1</sub>												o	o	
Qu <sub>2</sub>		X	X	o										
Qu <sub>4</sub>			X	X	X	o								
Qu <sub>5</sub>		o	X	✓	✓	✓	X	o						
Qu <sub>7</sub>														
Qu <sub>8</sub>							o	o	o	o				
Qu <sub>9</sub>				o	X	o	o	o	o	o				
Qu <sub>10</sub>				o	X	✓	✓	X						
Qu <sub>11</sub>						o	X	✓						
Qu <sub>12</sub>								o	✓					
Qu <sub>13</sub>							o	o	X					
Qu <sub>14</sub>										o				

Especies observades en els espectres d'ESI-MS a pH 7.0 i a pH 2.4: majoritària (✓), intermèdia (X) i minoritària (o).

3.3.2.2 VALORACIÓ DE Zn-mMT3, Zn- $\beta$ mMT3 I Zn<sub>4</sub>- $\alpha$ mMT3 AMB Cu(I)Zn-mMT3 amb Cu(I) (Làmina 25):

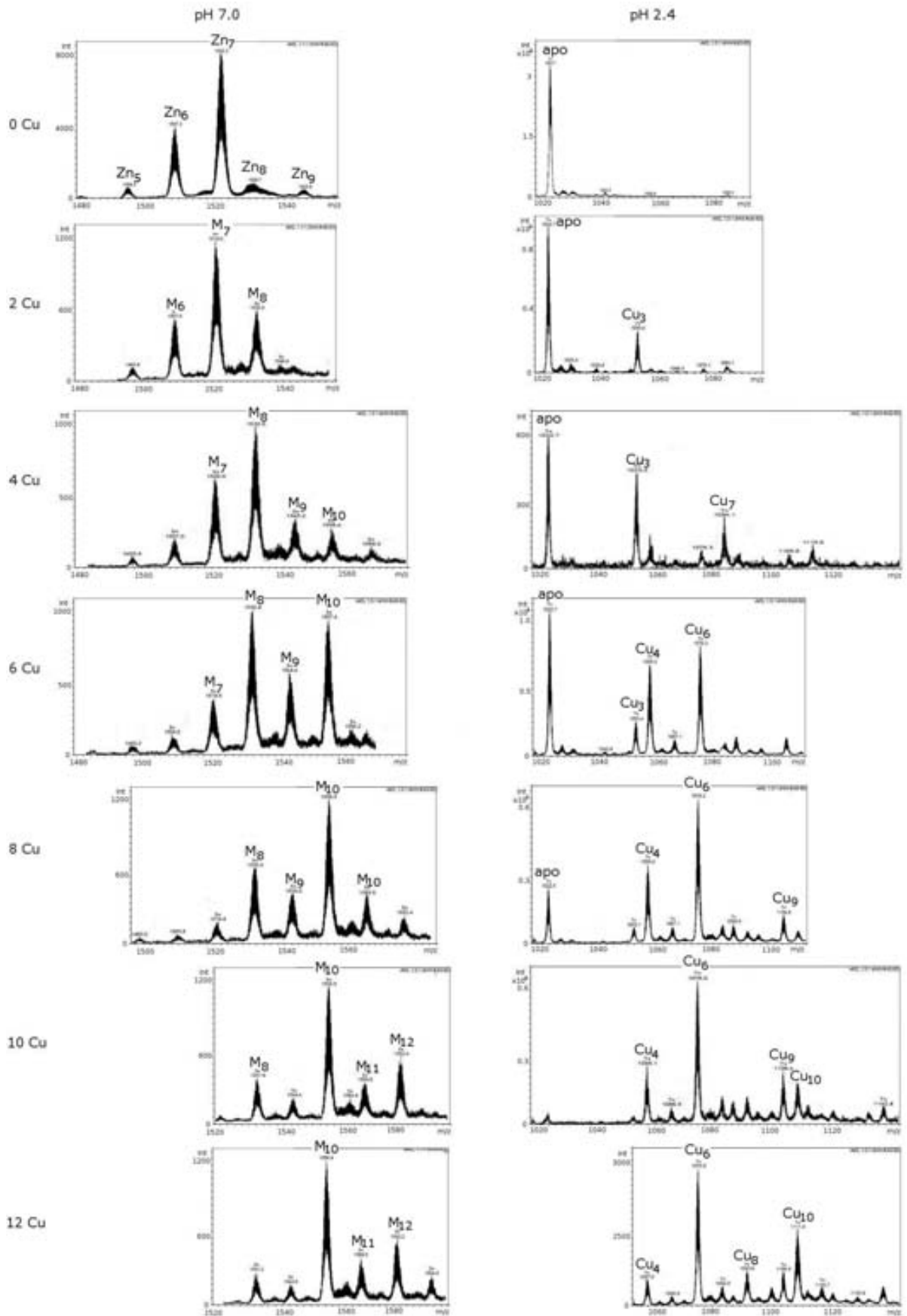
En les valoracions de Zn-mMT3 amb Cu(I), els espectres de DC evolucionen indicant la substitució del Zn(II) pel Cu(I) fins a un excés de metall. Les dades espectroscòpiques i espectromètriques mostren la coexistència de diferents espècies heteronuclears a l'inici de la valoració. Per a 14 equivalents de Cu(I) afegits s'observa una espècie majoritària composta per 10 metalls (M<sub>10</sub>) homonuclear, si bé en presència de més Cu(I) s'obtenen espècies de nuclearitzat superior, com s'observa als 18 equivalents de Cu(I) afegits en que hi ha fins 14 Cu(I) coordinats. Els espectres de DC enregistrats entre 10 i 18 equivalents de Cu(I) afegits són molt semblants als obtinguts en les biosíntesis de mMT3 sota condicions de cultiu d'oxigenació normal i baixa (Figura 67).

En incorporar més metall a la preparació, els espectres de DC indiquen la pèrdua de quiralitat de la mostra, que en excés de Cu(I) presenta uns espectres de DC de molt poca intensitat.



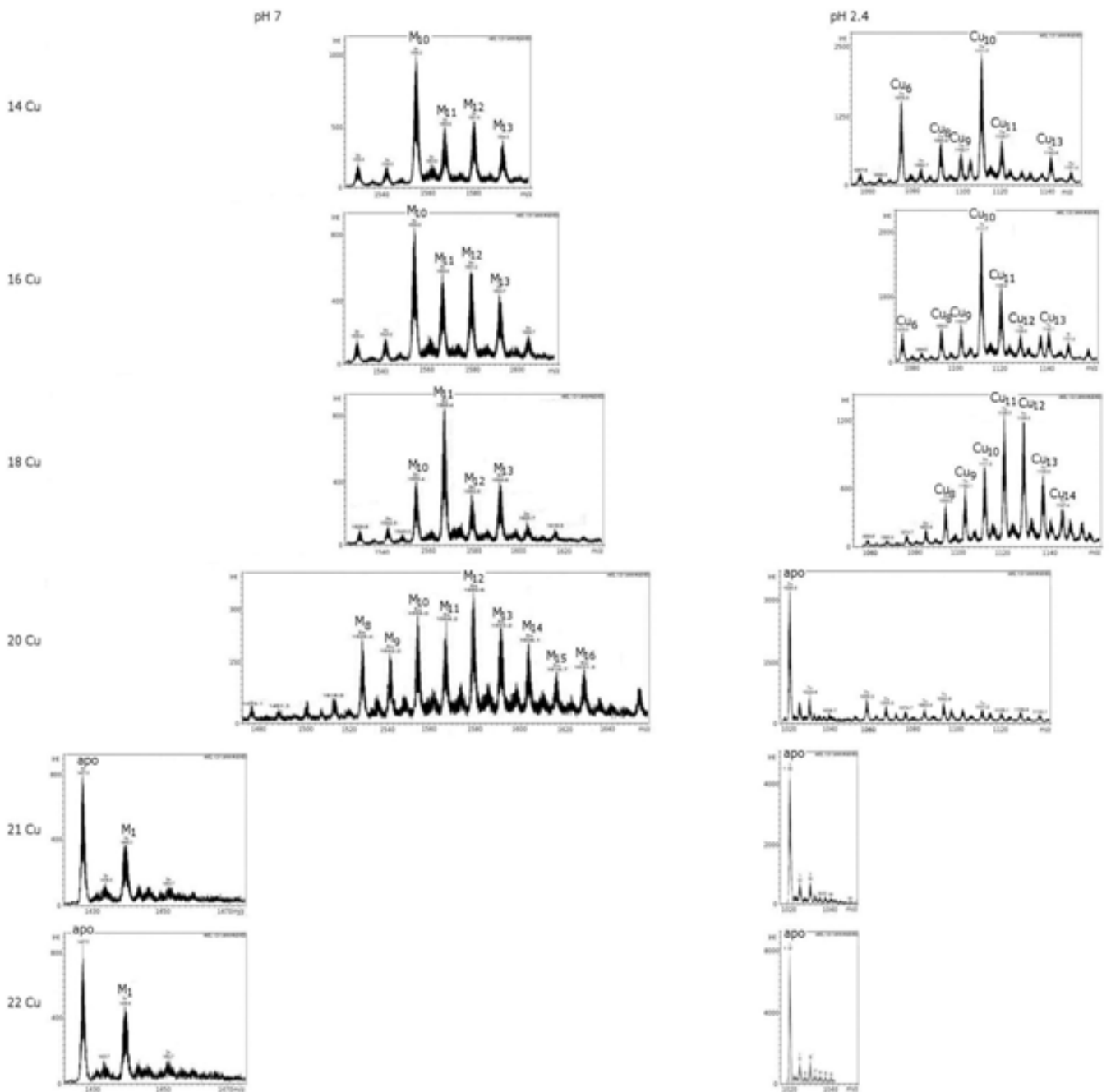
**Figura 67:** A: Superposició dels espectres de DC dels complexos Cu-mMT3 biosintetitzats en cultius a oxigenació normal, amb els espectres dels complexos obtinguts *in vitro* en afegir 10 i 14 equivalents de Cu(I) a Zn-mMT3. B: Superposició dels complexos Cu-mMT3 biosintetitzats en cultius a baixa oxigenació i dels complexos obtingut *in vitro* en afegir 18 equivalents de Cu(I) a Zn-mMT3.

LÀMINA 25. Valoració de Zn-mMT3 amb Cu(I)  
 25B: Dades Espectromètriques (ESI-MS)



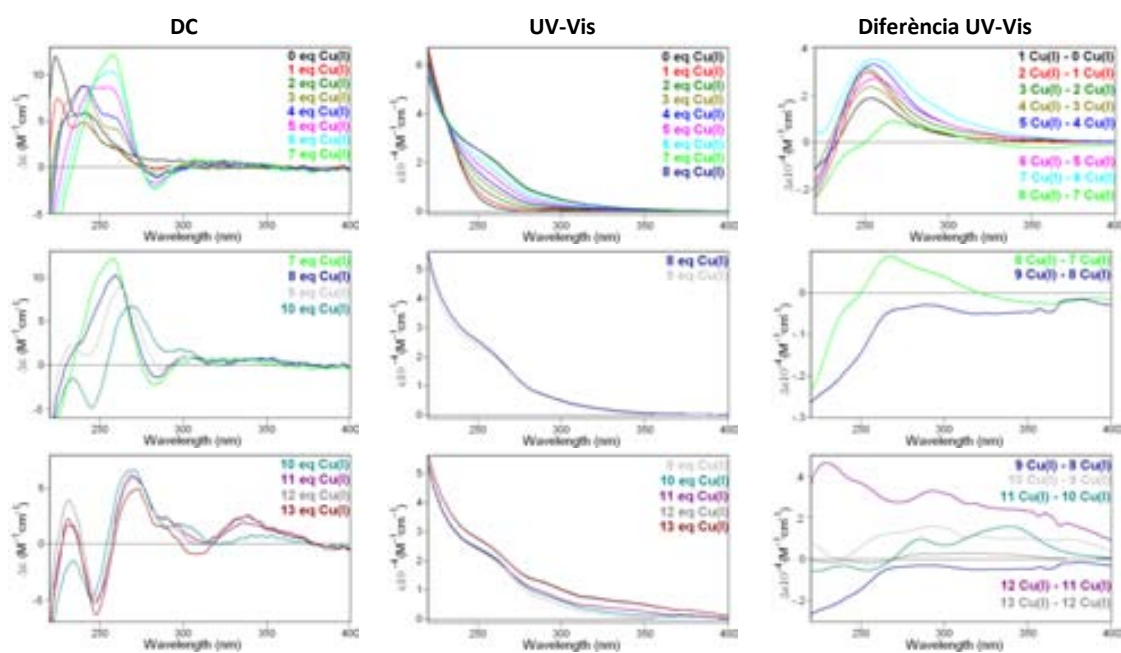
LÀMINA 25. Valoració de Zn-mMT3 amb Cu(I)  
 25B: Dades Espectromètriques (ESI-MS)

(cont.)



## LÀMINA 26. Valoració de Zn- $\beta$ mMT3 amb Cu(I)

26A: Dades espectroscòpiques i taula de resultats d'ESI-MS (26B: pàgines següents)



pH 7	Equivalents de Cu(II) afegits												
	0	2	4	6	7	8	9	11	13				
M <sub>2</sub>	X	o	o	o									
M <sub>3</sub>	✓	✓	o	o									
M <sub>4</sub>		✓	✓	✓	✓	✓	o	o	o				
M <sub>5</sub>			o	o		X	X	✓	✓				
M <sub>6</sub>			o	X	✓	✓	✓	X	X				
M <sub>7</sub>										o	o		

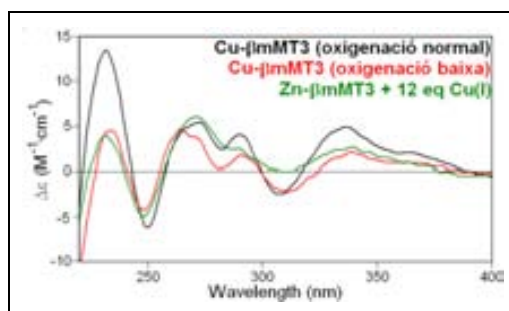
  

pH 2.4	Equivalents de Cu(II) afegits												
	0	2	4	6	7	8	9	11	13				
Apo	✓	✓	✓	X	o	o	o	o	o				
Cu <sub>1</sub>		o	o										
Cu <sub>2</sub>				o	o								
Cu <sub>4</sub>		o	X	✓	✓	✓	X	X	X				
Cu <sub>5</sub>			o	o	o	o	o	o	o	✓	✓		
Cu <sub>6</sub>			X	X	X	✓	✓	X	X				
Cu <sub>7</sub>										o	o		
dimers										o	o	X	

Espècies observades en els espectres d'ESI-MS a pH 7.0 i a pH 2.4: majoritària (✓), intermèdia (X) i minoritària (o).

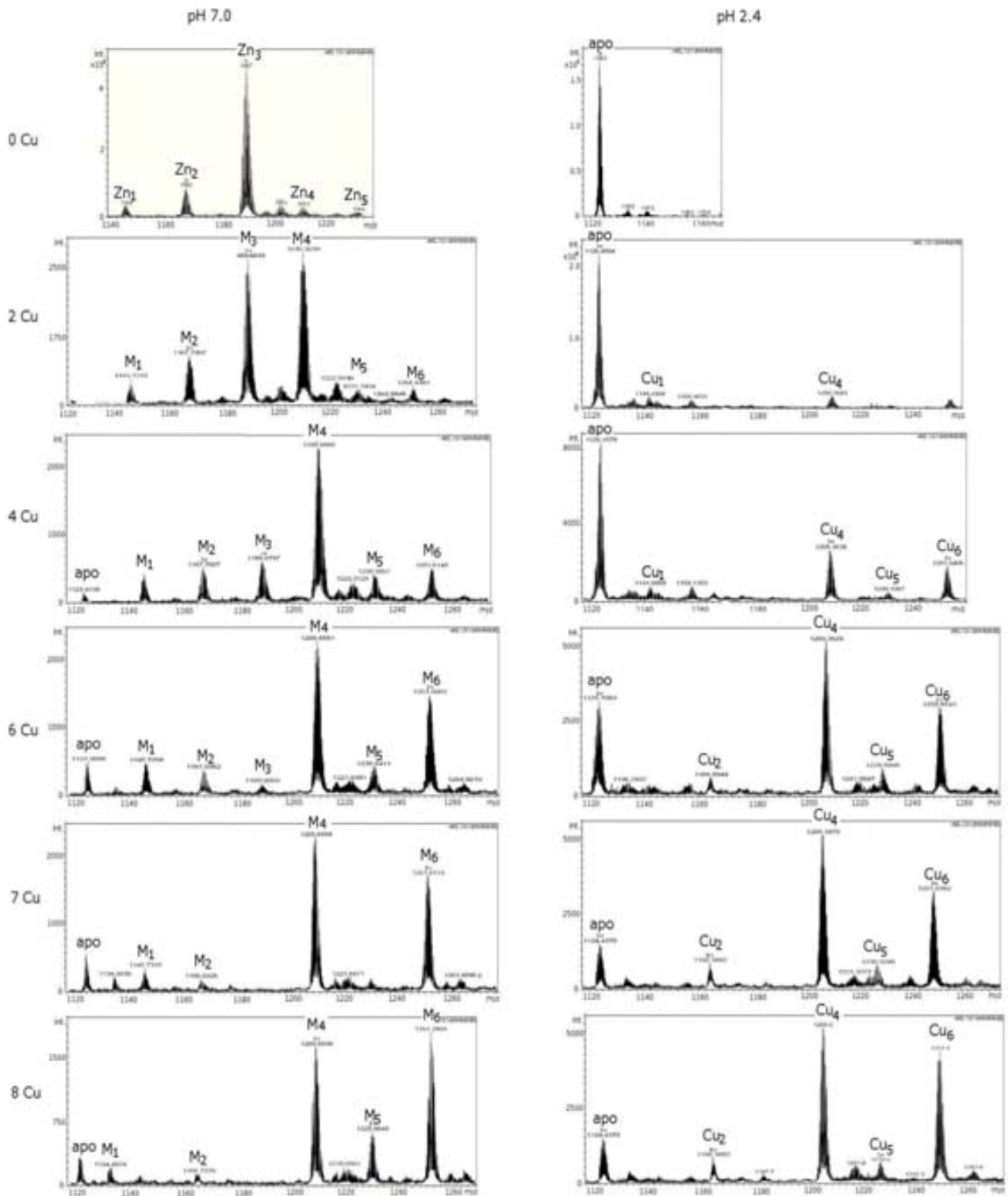
Zn- $\beta$ mMT3 amb Cu(I) (Làmina 26):

La valoració de Zn- $\beta$ mMT3 amb Cu(I), fins al 6è equivalent de Cu(I) dóna lloc a uns espectres de DC, UV-Vis i ESI-MS complexos que evolucionen a mesura que s'afegeix Cu(I) a la solució. De manera interessant, cap a 6-7 equivalents de Cu(I) afegits, que és quan s'observen els primers canvis de tendència espectroscòpica, els espectres d'ESI-MS indiquen la presència de dues espècies majoritàries,  $M_4$  i  $M_6$ - $\beta$ mMT3, a pH 7 que es revelen com a  $Cu_4$ - i  $Cu_6$ - $\beta$ mMT3 a pH àcid, suggerint la seva naturalesa homonuclear. Aquestes espècies es mantenen en solució fins i tot en presència d'un excés important de Cu(I) i donant lloc a una espècie  $M_5$ - $\beta$ mMT3, que correspon a  $Cu_5$ - $\beta$ mMT3 a pH àcid, que esdevé majoritària per a 11 equivalents de Cu(I) afegits. Curiosament, és per 10-11 equivalents de Cu(I) afegits que s'observa l'aparició d'una absorció a *ca.* 340-350 nm anàloga a la de les mostres biosintetitzades. Al final de la valoració, l'espectre de DC final és equiparable al dels complexos recombinants produïts en medis rics en Cu(II) (Figura 68).



**Figura 68:** Superposició dels espectres de DC de  $\beta$ mMT3 produïda en medi ric en Cu(II) a normal i baixa oxigenació, amb el de la mostra obtinguda *in vitro* en afegir 12 equivalents de Cu(I) a Zn- $\beta$ mMT3.

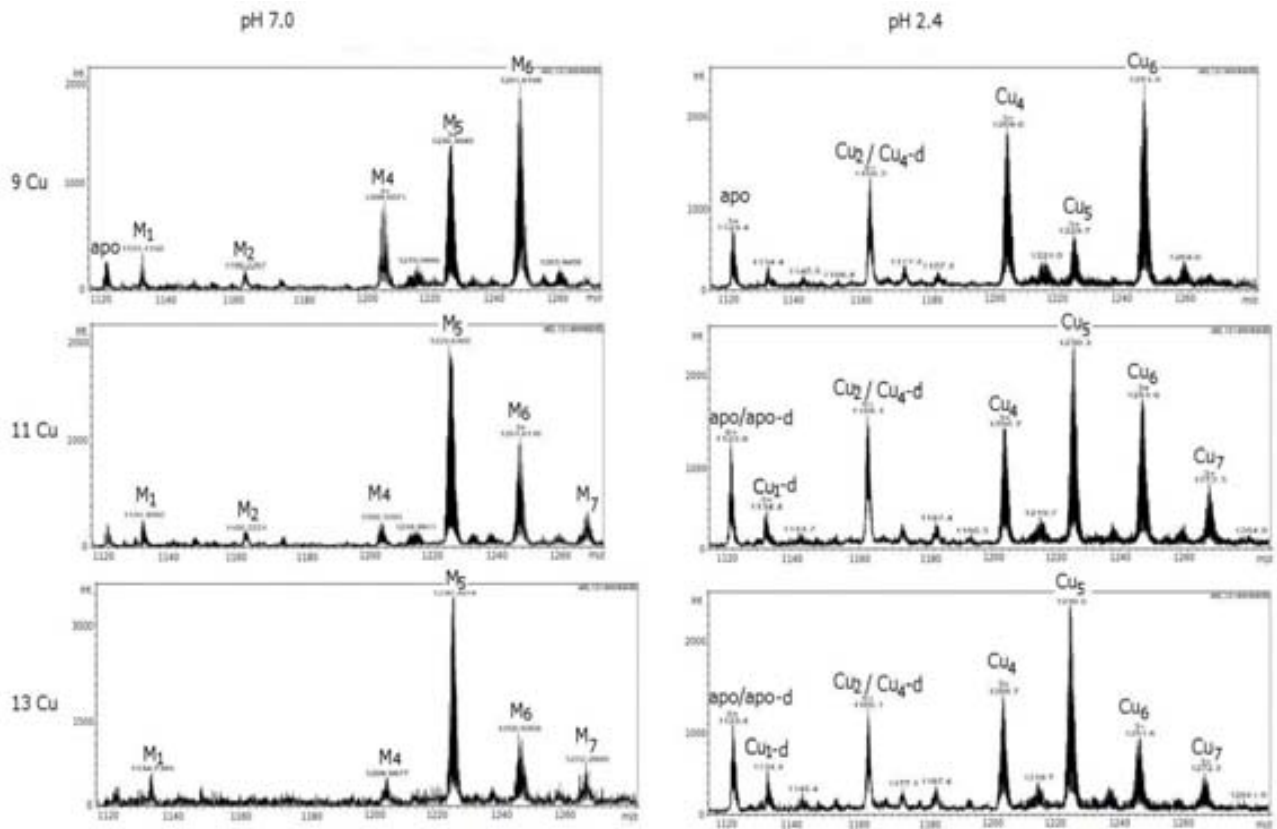
LÀMINA 26. Valoració de Zn- $\beta$ mMT3 amb Cu(I)  
 26B: Dades Espectromètriques (ESI-MS)





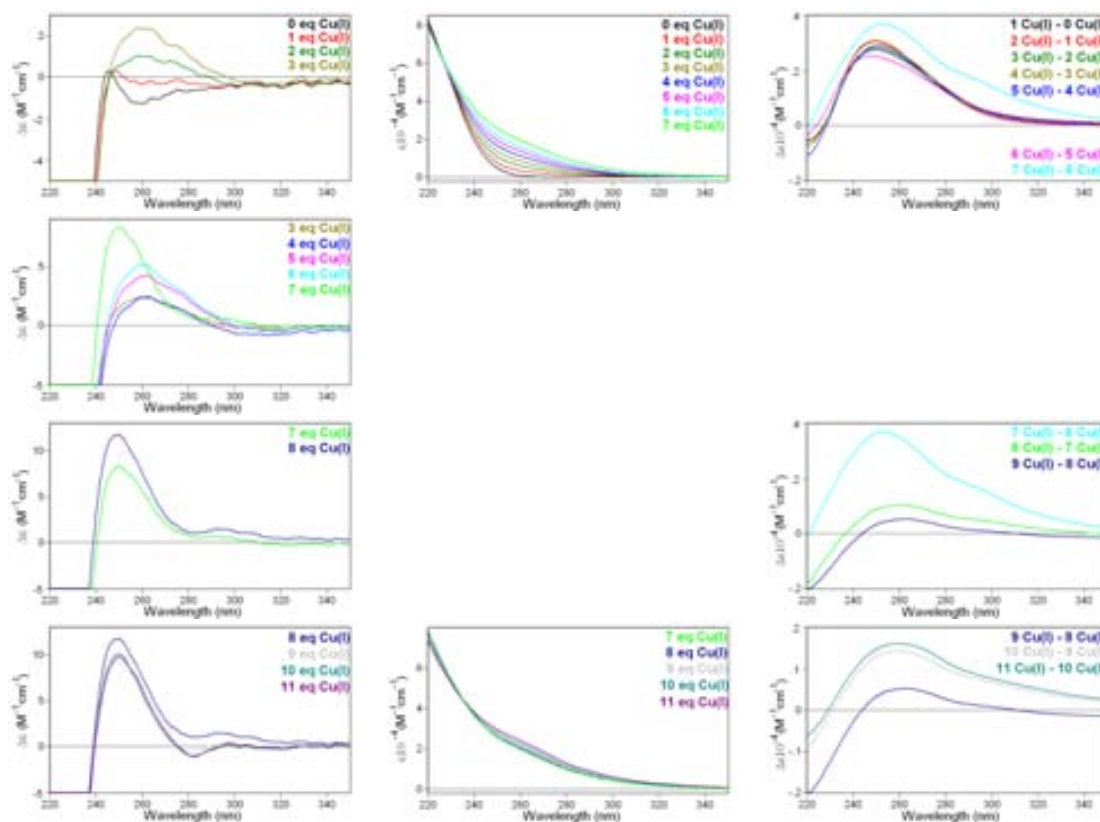
LÀMINA 26. Valoració de Zn- $\beta$ mMT3 amb Cu(I)  
26B: Dades Espectromètriques (ESI-MS)

(cont.)



## LÀMINA 27. Valoració de Zn- $\alpha$ MT3 amb Cu(I)

27A: Dades espectroscòpiques i taula de resultats d'ESI-MS (27B: pàgines següents)



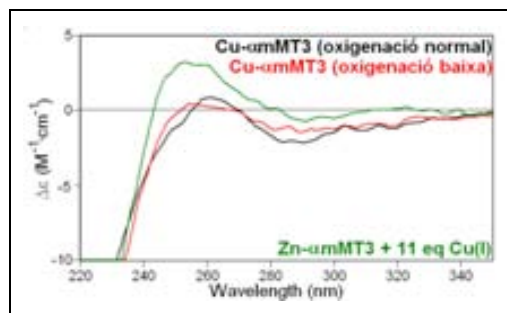
pH 7	Equivalentents de Cu(II) afegits						
	0	2	5	6	7	8	11
M <sub>4</sub>	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
M <sub>5</sub>	o	o	X	o	o	X	X
M <sub>6</sub>	o	X	✓	X	X	X	X
M <sub>7</sub>					o	o	o
pH 2.4	Equivalentents de Cu(II) afegits						
	0	2	5	6	7	8	11
Apo	✓	✓	✓	✓	X	✓	X
Q <sub>4</sub>	o	X	✓	✓	✓	✓	✓
Q <sub>5</sub>							X

Espècies observades en els espectres d'ESI-MS: majoritària (✓), intermèdia (X) i minoritària (o).

Zn<sub>4</sub>- $\alpha$ mMT3 amb Cu(I) (Làmina 27):

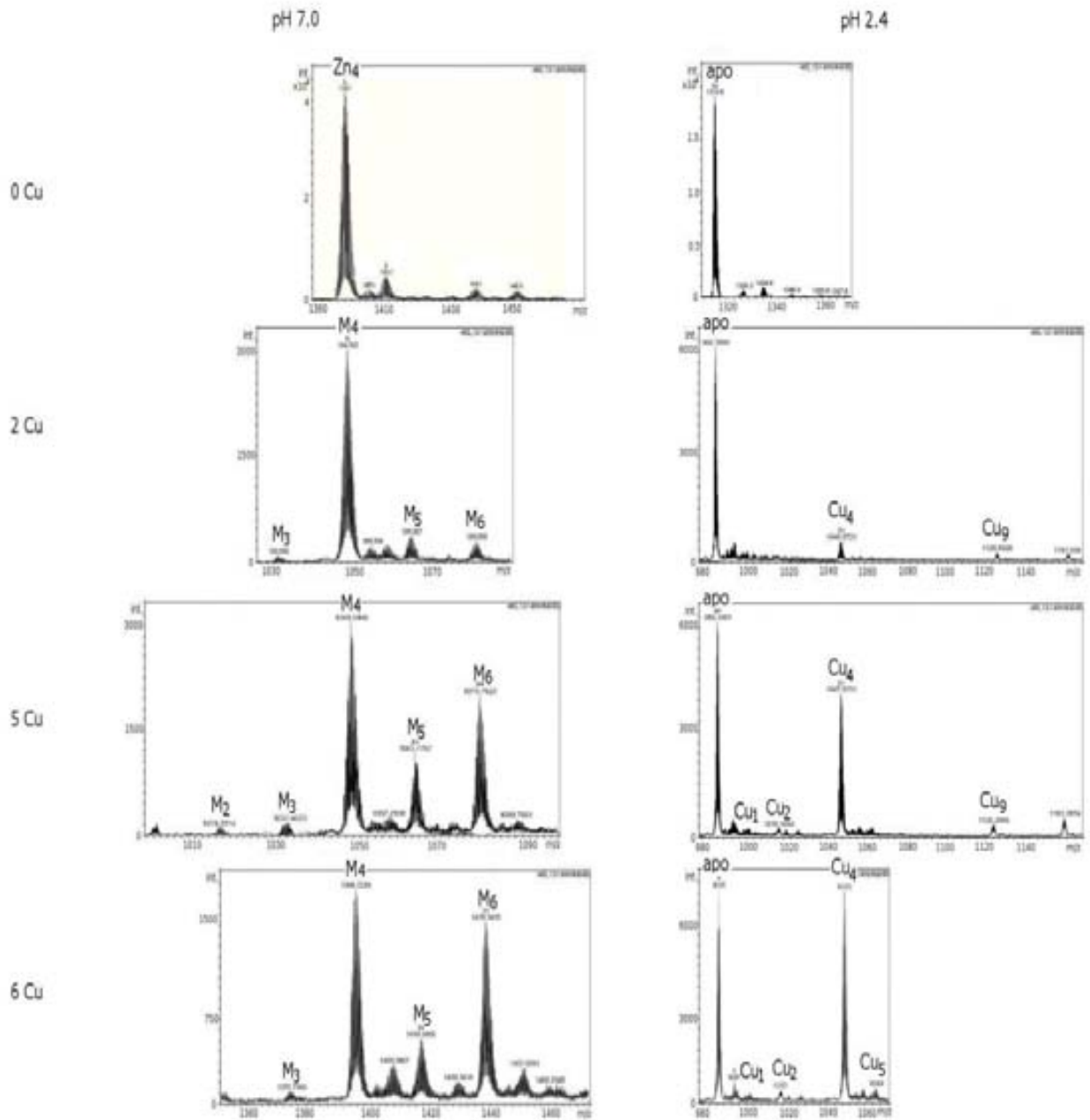
La valoració dels complexos Zn<sub>4</sub>- $\alpha$ mMT3 amb Cu(I) mostra la incorporació d'aquest ió a la proteïna sense que es produeixin canvis espectroscòpics importants. En afegir el 7è i el 8è equivalents de Cu(I) s'observa una variació en l'espectre de DC que no comporta canvis espectromètrics en les dades d'ESI-MS, que indiquen que el Zn(II) es manté present al llarg de tota la valoració. Així doncs, l'espècie majoritària a pH 7 sempre és M<sub>4</sub>- $\alpha$ mMT3, seguida de M<sub>6</sub>- i M<sub>5</sub>- $\alpha$ mMT3, que corresponen a Cu<sub>4</sub>- $\alpha$ mMT3, espècies heteronuclears i d'altres formades únicament per Zn(II) segons indiquen els espectres d'ESI-MS durant tota la valoració.

Al final de la valoració s'obté un espectre de DC semblant al dels complexos Cu- $\alpha$ mMT3 biosintetitzats en medis rics en Cu(II) (Figura 69).



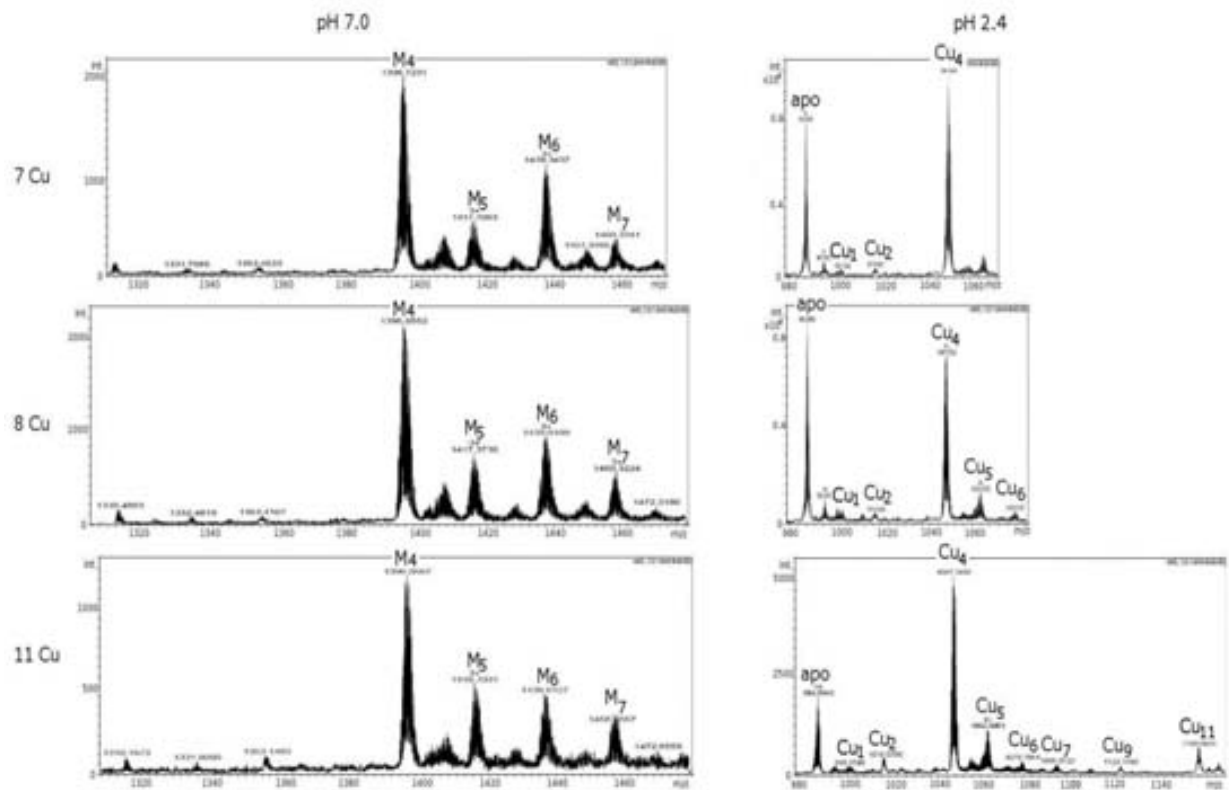
**Figura 69:** Superposició dels espectres de DC de Cu- $\alpha$ mMT3 biosintetitzada en medis amb oxigenació normal i baixa oxigenació, respecte a l'espectre de DC de la preparació obtinguda *in vitro* en afegir 11 equivalents de Cu(I) a Zn- $\alpha$ mMT3.

LÀMINA 27. Valoració de Zn- $\alpha$ mMT3 amb Cu(I)  
 27B: Dades Espectromètriques (ESI-MS)

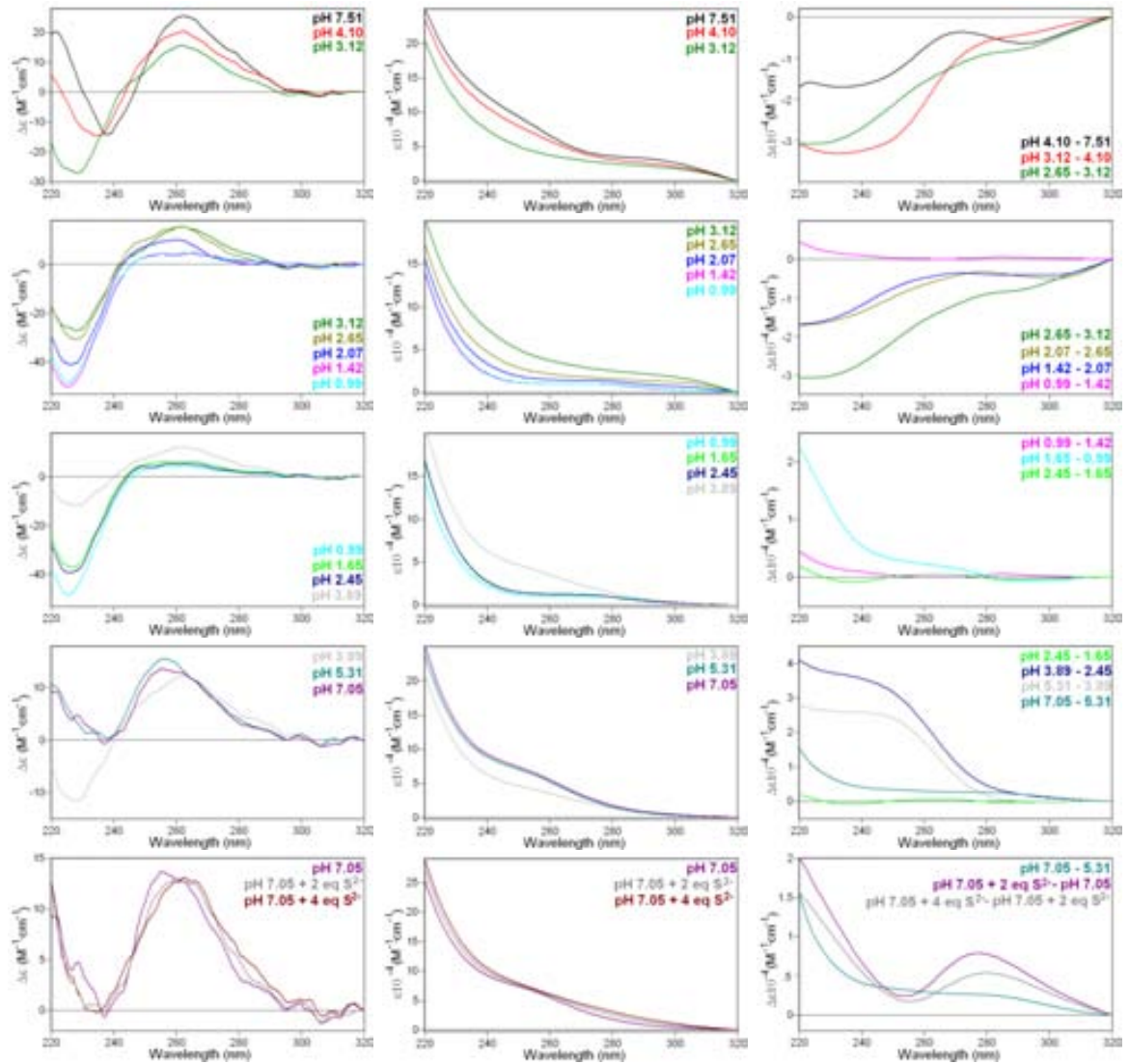


LÀMINA 27. Valoració de Zn- $\alpha$ mMT3 amb Cu(I)  
27B: Dades Espectromètriques (ESI-MS)

(cont.)



LÀMINA 28. Acidificació i reneutralització de Cd-mMT3

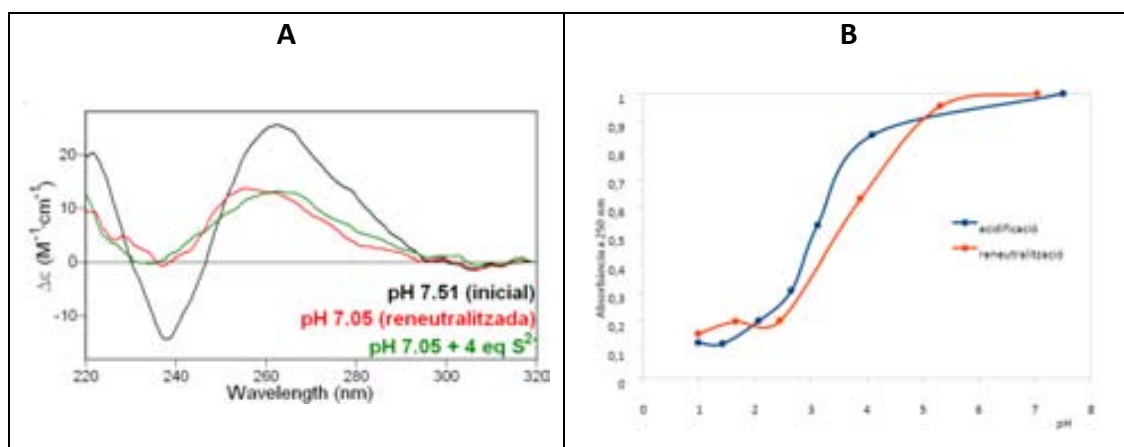


### 3.3.2.3 ACIDIFICACIÓ I RENEUTRALITZACIÓ DELS COMPLEXOS Cd-mMT3, Cd- $\beta$ mMT3 i Cd- $\alpha$ mMT3

#### Acidificació i reneutralització de Cd-mMT3 (Làmina 28):

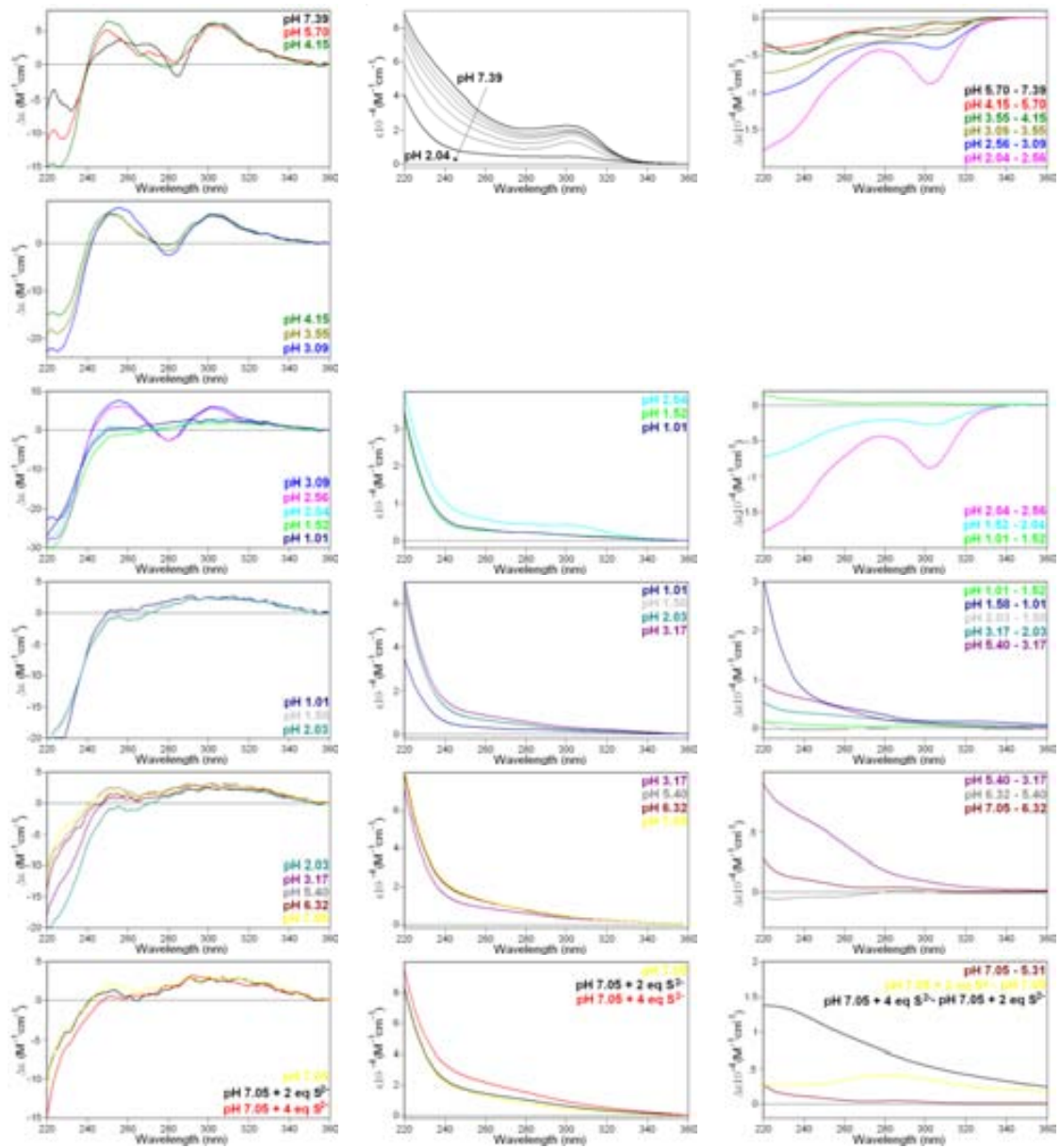
S'han estudiat els canvis que comporten el processos d'acidificació i reneutralització de les dues fraccions de la producció Cd-mMT3. En la làmina 28 tan sols es mostra l'acidificació i reneutralització de la primera fracció ja que ambdues han donat el mateix resultat.

Al llarg de l'acidificació s'observa la pèrdua d'intensitat de l'espectre de DC, que indica la desestructuració dels complexos presents en solució. En tornar a neutralitzar el medi, no s'aconsegueix reproduir el mateix espectre de DC inicial, ni tant sols després d'afegir-hi ions sulfur (Figura 70A). El replegament de la proteïna a partir de la forma apo no segueix el camí invers que el seu desplegament a mesura que s'acidifica el medi (Figura 70B).



**Figura 70:** A: Superposició dels espectres de DC dels complexos Cd-mMT3 inicial i després de reneutralitzar i afegir 4 equivalents de  $S^{2-}$ . B: Gràfica d'absorció d'UV-Vis a 250 nm d'una mostra de Cd-mMT3 en funció del pH del medi.

LÀMINA 29. Acidificació i reneutralització de Cd-βmMT3

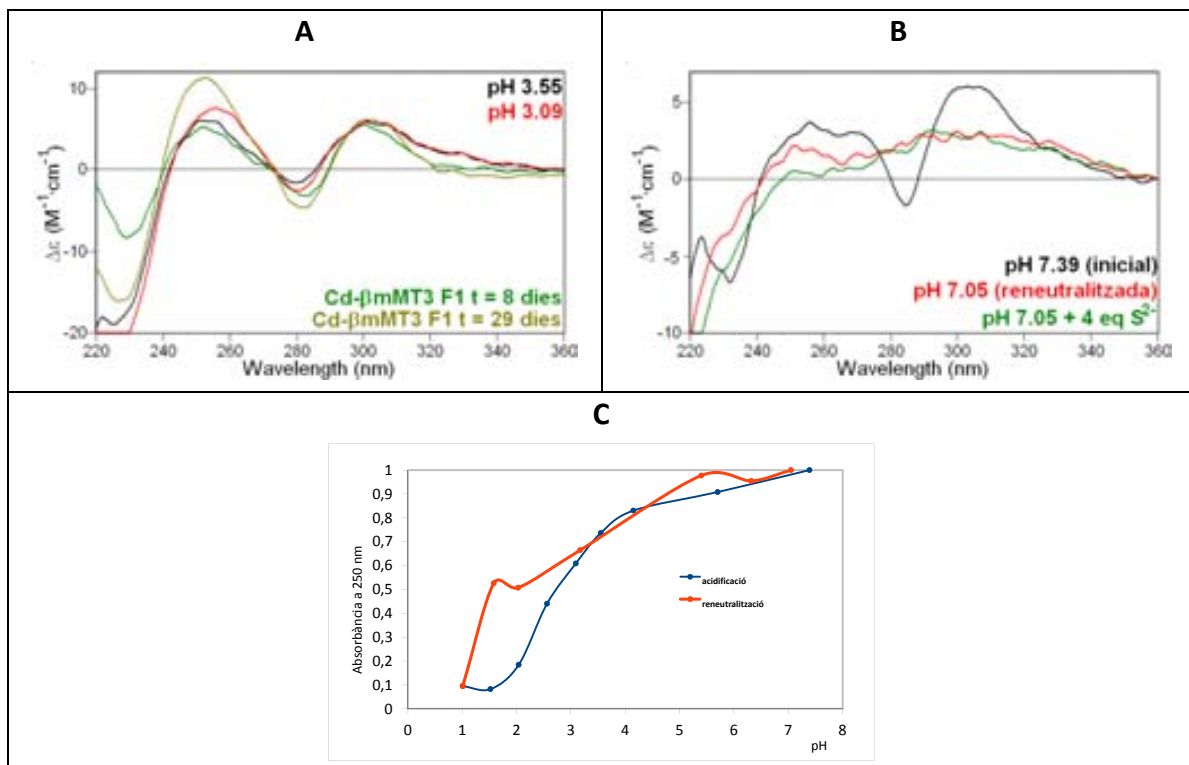




Acidificació i reneutralització de Cd- $\beta$ mMT3 (Làmina 29):

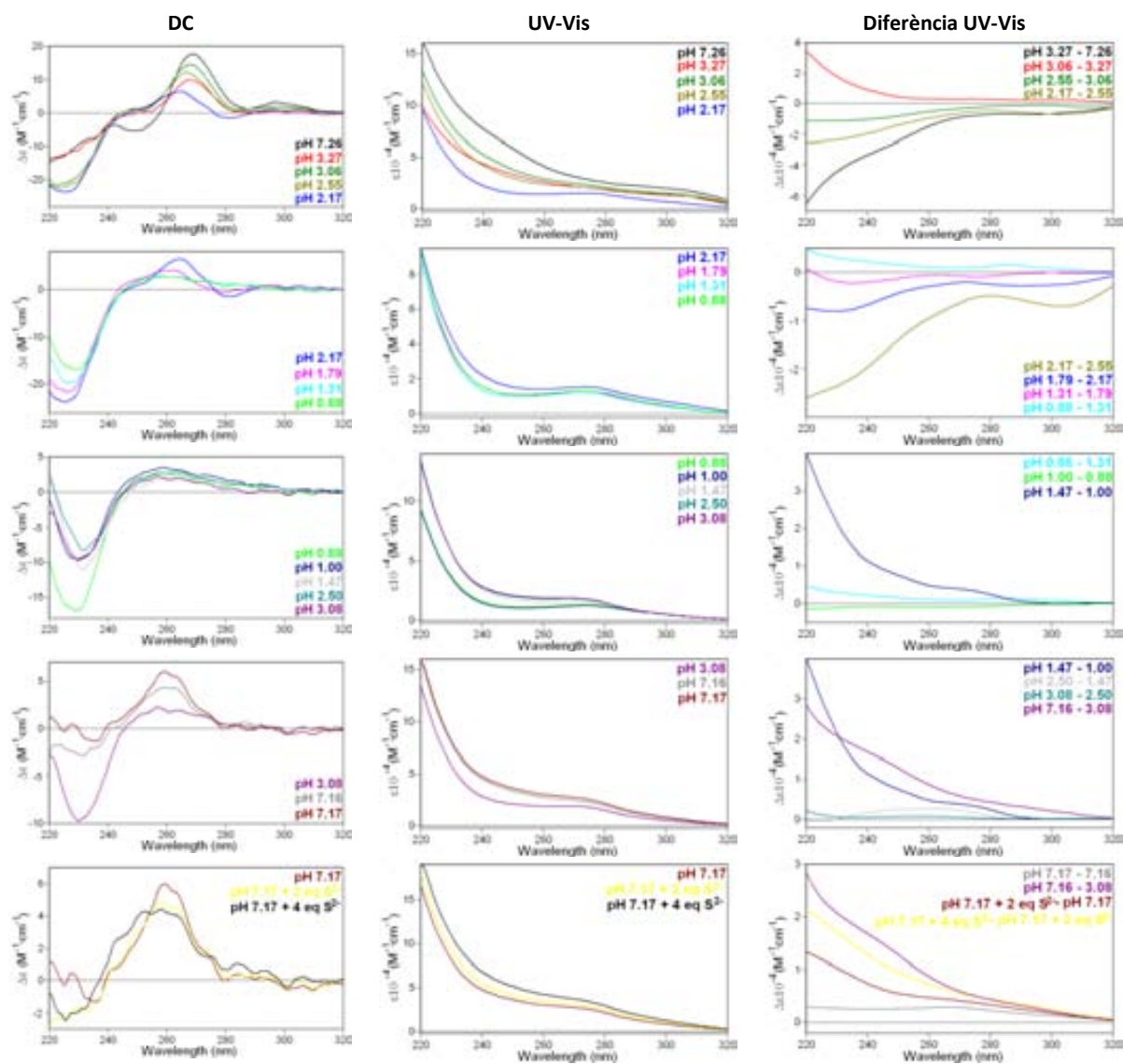
Per als estudis d'acidificació i reneutralització dels complexos Cd- $\beta$ mMT3 s'ha utilitzat la segona fracció de FPLC. Els espectres de DC, fins a pH 3, es defineixen apropant-se a l'espectre característic d'una Cd-MT de mamífer (Figura 71A). Aquest mateix canvi s'ha observat en l'evolució amb el temps d'aquest mateix complex (apartat 3.3.2.4). Si es disminueix encara més el pH de la mostra, els espectres de DC perden la seva forma, indicant la pèrdua de quiralitat del complex.

En reneutralitzar la preparació, no s'aconsegueix recuperar l'espectre de DC inicial, ni tampoc afegint-hi ions sulfur (Figura 71B), indicant que el replegament del complex a partir de la forma apo no segueix el canvi invers al seu desplegament en acidificar el medi (Figura 71C).



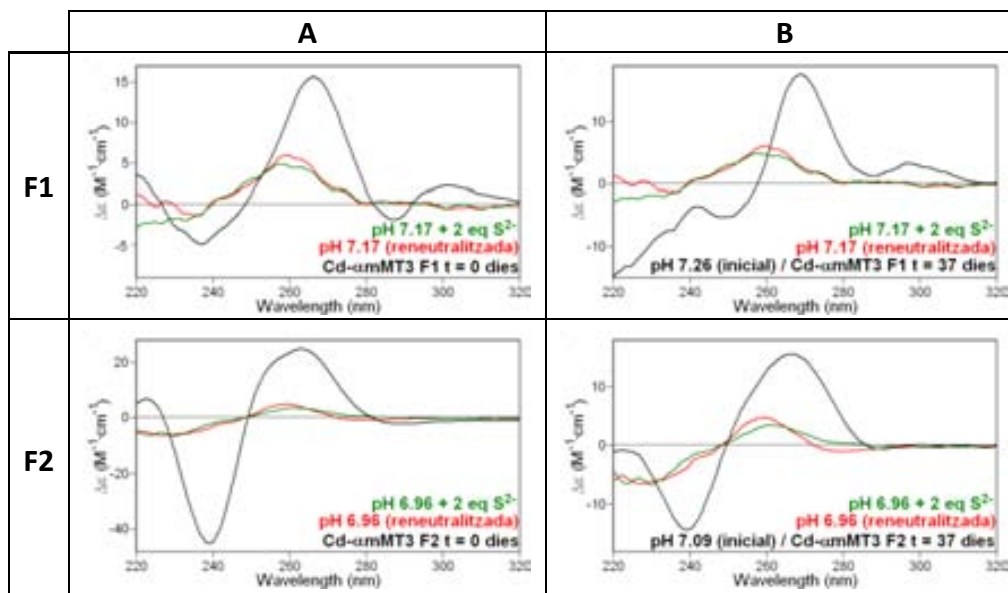
**Figura 71:** A: Superposició dels espectres de DC del complex Cd- $\beta$ mMT3 acidificat fins a pH 3 amb l'evolució en el temps del mateix complex. B: Superposició de l'espectre de DC del complex Cd- $\beta$ mMT3 inicial amb el mateix complex després d'acidificar, reneutralitzar i afegir 4 equivalents de  $S^{2-}$ . C: Gràfica d'absorció d'UV-Vis a 250 nm d'una mostra de Cd- $\beta$ mMT3 en funció del pH del medi.

LÀMINA 30. Acidificació i reneutralització de Cd- $\alpha$ mMT3  
 30A: Acidificació i reneutralització de la F1 (30B: pàgines següents)

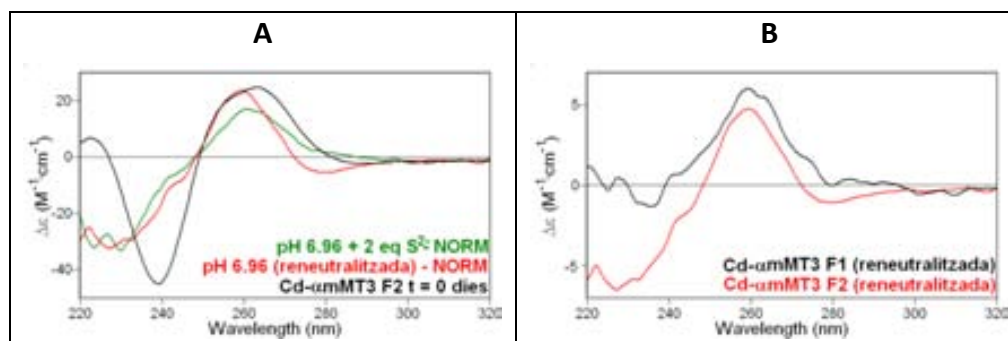


Acidificació i reneutralització de Cd- $\alpha$ MT3 (Làmina 30):

Es va realitzar l'acidificació i posterior reneutralització de les dues fraccions de Cd- $\alpha$ MT3 biosintetitzada. En cap dels dos casos es reproduïx l'espectre de DC inicial un cop reneutralitzada la mostra (Figura 72) ni tampoc després d'afegir-hi variis equivalents de  $S^{2-}$ , malgrat que la F2 s'hi assembla força (Figura 73A). Els espectres de DC inicials i els canvis soferts per a cadascuna de les fraccions són diferents, però el repliegament dels complexos després del procés d'acidificació, reneutralització i addició d'ions sulfur és semblant sigui quin sigui el material de partida, com es pot constatar pel fet que els espectres finals en ambdues fraccions presenten una gran similitud (Figura 73B).



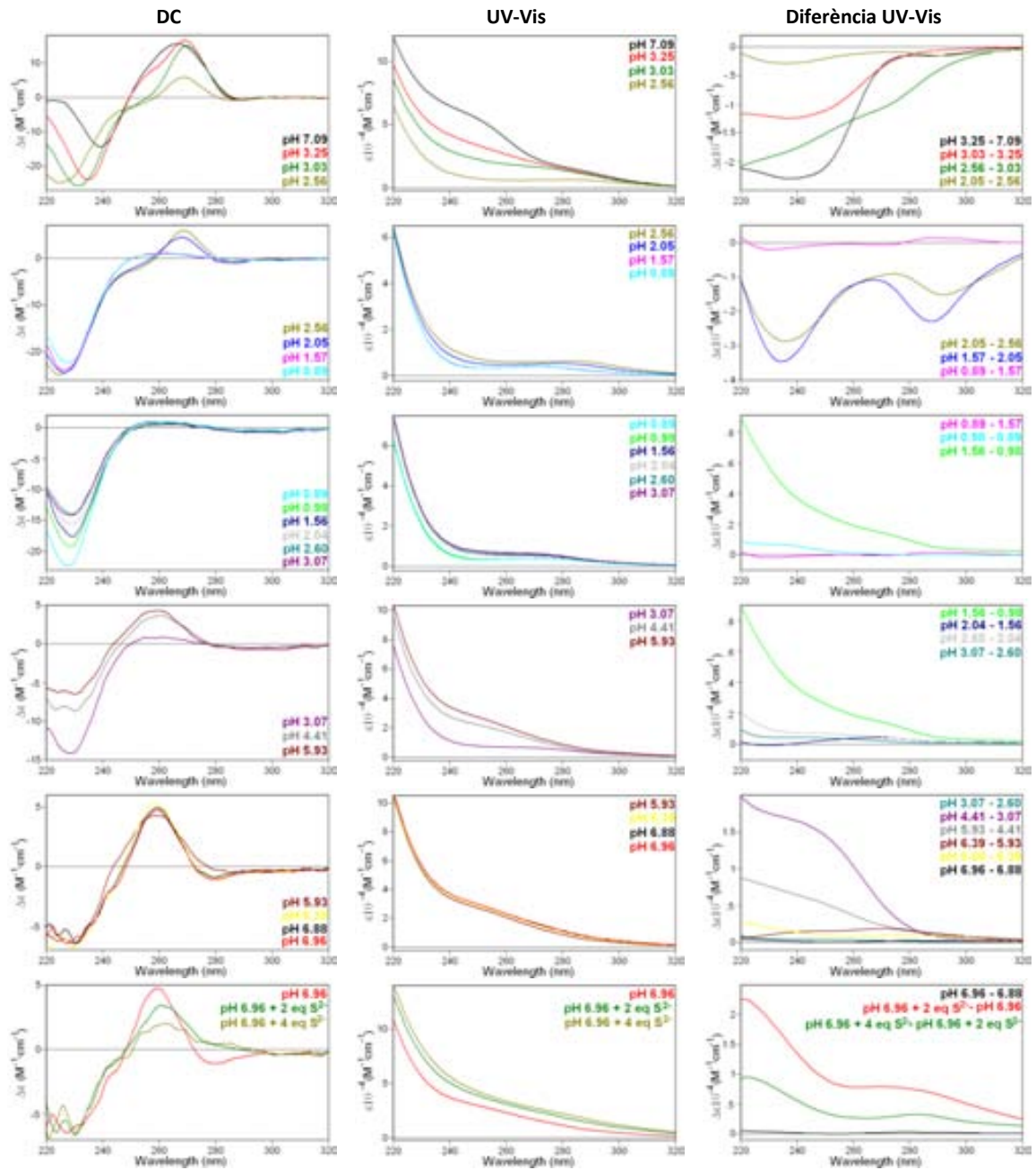
**Figura 72:** Superposició dels espectres de DC de cadascuna de les fraccions (F1 i F2) del complex Cd- $\alpha$ MT3 reneutralitzat amb 2 equivalents de sulfur, amb els seus espectres inicials, acabat de descongelar (A) o després d'evolucionar 37 dies (B).



**Figura 73:** A: Superposició dels espectres de DC de F2 de Cd- $\alpha$ MT3 reneutralitzat (espectres normalitzats) amb el mateix complex acabat de descongelar. B: Superposició dels espectres de DC de les dues fraccions del complex reneutralitzat.

# LÀMINA 30. Acidificació i reneutralització de Cd- $\alpha$ mMT3

## 30B: Acidificació i reneutralització de la F2



## **4. DISCUSSIÓ**



## 4. DISCUSSIÓ

En el present capítol es discutiran els resultats obtinguts en aquesta tesis doctoral, dividint-los en dos grans blocs. En el primer es classificaran les proteïnes mMT2 i mMT3 estudiades respecte el seu comportament envers d'ions metàl·lics divalents ( $Zn^{2+}$  i  $Cd^{2+}$ ) i monovalents ( $Cu^+$ ). A més d'indicar les propietats coordinants a partir dels resultats explicats en l'apartat anterior, es farà una atenció especial a les característiques específiques de cada isoforma, tot comparant-les amb les altres dues isoformes de mamífer, mMT1 i mMT4. D'aquesta manera, en el segon apartat, s'ordenaran les 4 MTs de mamífer en funció de la seva preferència pels ions metàl·lics divalent o monovalents. Per acabar, s'inclourà aquesta ordenació en el conjunt de les MTs de diferents organismes estudiades, donant una visió global des del punt de vista biològic de totes les MTs.

## 4.1 CLASSIFICACIÓ DE mMT2 I mMT3 RESPECTE EL SEU COMPORAMENT ENVERS Zn(II), Cd(II) I Cu(I)

### 4.1.1 Preferències de coordinació metàl·lica de mMT2

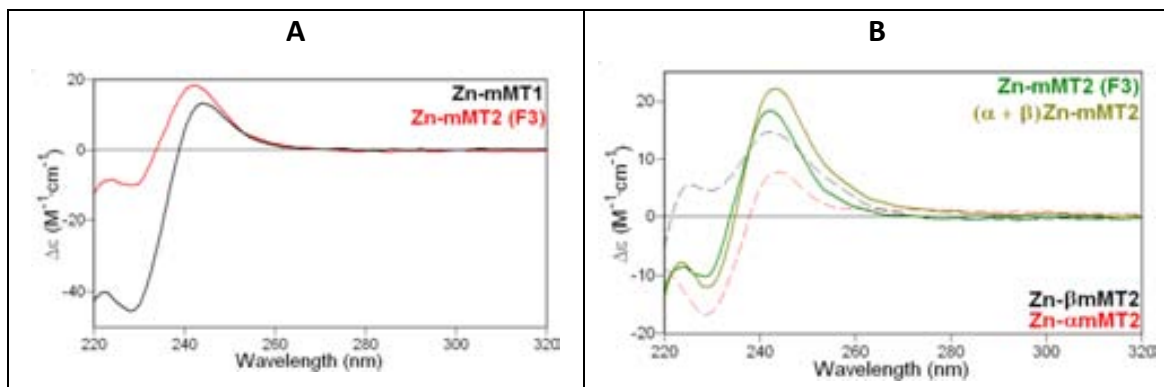
#### 4.1.1.1 PROPIETATS COORDINANTS DE mMT2 ENVERS Zn(II)

L'obtenció de tres tipus de complexos separables per FPLC, que s'observa en la síntesi de la proteïna recombinant mMT2 en medis rics en  $Zn^{2+}$ , no es dona en cap altra MT estudiada fins al moment. La dimerització de la isoforma MT2 de mamífer quan coordina  $Zn^{2+}$  ha estat descrita en proteïna nativa<sup>[170, 173]</sup>, així doncs l'obtenció de dímers i monòmers quan es sintetitza en cultius d'*E. coli* no és sorprenent. Cal remarcar que la dimerització de la isoforma biosintetitzada s'observa únicament per a la proteïna sencera, mentre que els dominis produïts independentment en medis rics en  $Zn^{2+}$  generen espècies monomèriques. Per tant, és evident la necessitat dels dos dominis per a la formació d'aquesta estructura quaternària per part de la mMT2 sencera.

Els complexos de  $Zn^{2+}$  amb les Zn-MT de mamífer estudiades prèviament en aquest grup de recerca (mMT1 i mMT4) sempre han donat lloc a un espectre de DC amb l'*exciton coupling* a 240 nm característic, tant per a la proteïna sencera com per als dominis per separat. Tal com s'ha comentat, l'espectre de DC de  $Zn_7$ -mMT2 (F3), en canvi, genera una gaussiana a 240(+) nm, enlloc de l'*exciton coupling* habitual d'una Zn-MT, com és mMT1 (Figura 74). Aquesta característica s'ha observat en els complexos de  $Zn^{2+}$  de MT d'altres organismes no mamífers: la isoforma ckMT1 de pollastre *Gallus gallus*<sup>[58]</sup>, la isoforma HpCdMT del cargol *Helix pomatia*, i Crs5 del llevat *Saccharomyces cerevisiae*<sup>[53]</sup>. L'espectre de DC obtingut per al complex  $Zn_4$ - $\alpha$ mMT2 sí que presenta l'*exciton coupling* a 240 nm, però el complex  $Zn_3$ - $\beta$ mMT2, mostra un espectre de DC molt diferent, amb dues gaussianes a 220(+) nm i 240(+) nm, anàlogues a les que s'observen per al mateix fragment de ckMT1 (Figura 75B). Tot i el particular espectre de DC dels complexos obtinguts en la síntesi del domini  $\beta$ mMT2 en medis rics en  $Zn^{2+}$ , els resultats obtinguts permeten deduir que els dos dominis de mMT2 per separat s'estructuren d'una manera similar quan enllacen Zn(II) a com ho fan quan formen part de la proteïna sencera, ja que la suma dels espectre de DC de

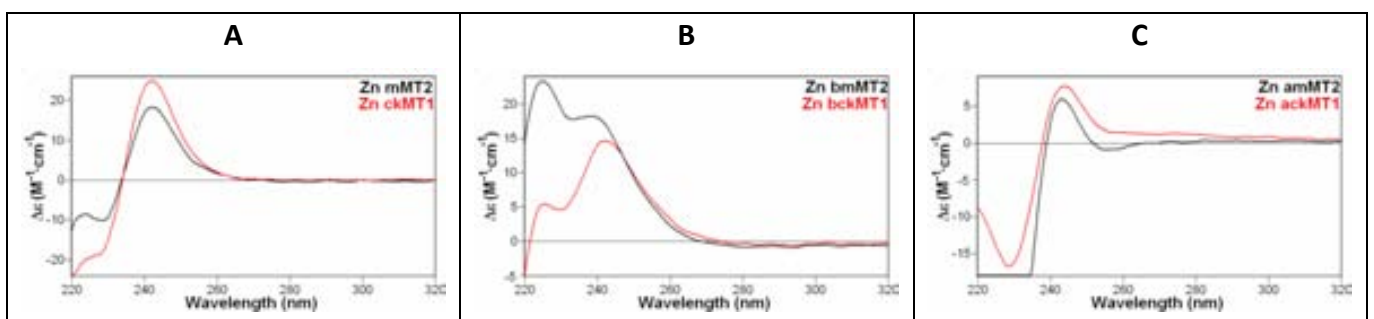


Zn<sub>3</sub>-βmMT2 i Zn<sub>4</sub>-αmMT2 proporciona un espectre molt semblant a l'enregistrat per al complex Zn<sub>7</sub>-mMT2 (Figura 74). De fet, mMT2 i els seus dominis adopten un plegament en coordinar Zn<sup>2+</sup> més proper a ckMT1 que a les de mamífer (Figura 75). Així, les característiques diferencials mostrades per βckMT1 i βmMT2 en coordinar Zn<sup>2+</sup> (Figura 75B) respecte a les de βmMT1 i βmMT4 podrien explicar perquè els complexos Zn-MT de les respectives proteïnes senceres presenten una gaussiana a 240(+) nm en ckMT1 i mMT2 enlloc de l'exciton coupling que s'observa en el mateix cas per a mMT1 i mMT4.



**Figura 74:** A: Comparació de l'espectre de DC del complex Zn<sub>7</sub>-mMT2 amb el d'una Zn-MT típica (Zn-mMT1). B: Superposició dels espectres de DC dels complexos de mMT2, βmMT2 i αmMT2 sintetitzats en medis rics en Zn<sup>2+</sup>, i suma dels espectres de DC dels dominis biosintetitzats en medis rics en Zn(II).

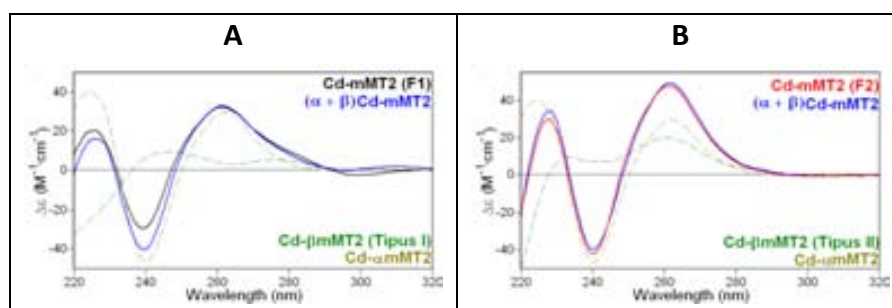
Les espècies obtingudes en sintetitzar la isoforma mMT2 i els seus dominis en medis rics en Zn(II) presenten estequiometries equivalents a les de les isoformes mMT1 i mMT4 caracteritzades anteriorment, és a dir, que la proteïna enllaça 7 Zn<sup>2+</sup>, 3 Zn<sup>2+</sup> i 4 Zn<sup>2+</sup> segons es biosintetitzi la isoforma sencera, el domini β o el domini α, respectivament. En canvi, les característiques estructurals dels complexos, com s'ha indicat, no coincideixen amb les d'aquestes isoformes.



**Figura 75:** Comparació dels espectres de DC de les espècies Zn<sub>7</sub>-MT (A), Zn<sub>4</sub>-αMT (B) o Zn<sub>3</sub>-βMT (C) de mMT2 (negre) i ckMT1 (vermell).

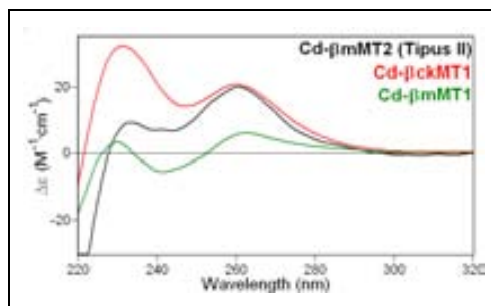
## 4.1.1.2 PROPIETATS COORDINANTS DE mMT2 ENVERS Cd(II)

Les anàlisis realitzades de les síntesis de mMT2 i els seus dominis en medis rics en  $\text{Cd}^{2+}$  permeten destacar la importància del domini  $\beta$ mMT2 en el plegament dels respectius complexos. En la síntesi de Cd- $\beta$ mMT2 s'han obtingut repetidament 2 tipus de resultats, proposant-se com a factor determinant d'un o altre, la congelació o no de la massa cel·lular en les etapes inicials de la purificació de la proteïna recombinant. Hipotetitzem que aquesta congelació pot afectar a l'estabilitat de les unions entre  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{S}^{2-}$  i el pèptid, ja que s'observa una clara manca de lligands sulfur en les mostres provinents de massa cel·lular congelada. Conseqüentment, els dos tipus de síntesi proporcionen preparacions amb composició estequiomètrica, i conseqüentment característiques estructurals, ben diferenciades. De fet, el tipus de complexos a que donin lloc les preparacions Cd- $\beta$ mMT2 condicionaria directament la possibilitat d'obtenir un tipus o altre de preparacions Cd-mMT2 sencera, fet que es fa palesa en la separació de dues fraccions ben diferenciades en la purificació dels complexos de  $\text{Cd}^{2+}$  de la mMT2. Així doncs, la primera fracció de la cromatografia FPLC recolliria complexos Cd-mMT2 amb una major presència de lligands sulfur, on el domini  $\beta$  presentaria donaria lloc a complexos Cd- $\beta$ mMT2 anàlegs als obtinguts en la biosíntesi sense congelació de massa bacteriana ( $\text{Cd}_3\text{S}_2$ - $\beta$ mMT2 com a espècie majoritària). En canvi, la segona fracció FPLC de Cd-mMT2, inclouria espècies Cd-MT en les que els lligands sulfur es trobarien en el domini  $\beta$  en menor quantitat anàlegs als obtinguts en les biosíntesis de  $\beta$ mMT2 que s'han realitzat amb massa bacteriana congelada, i on no hi ha presència important de lligands sulfur (Figura 76). L'estructura dels agregats  $\text{Cd}_4$ - $\alpha$ mMT2 seria la mateixa en els dos casos.



**Figura 76:** Superposició dels espectres de DC de mMT2 en medis rics en  $\text{Cd}^{2+}$ , F1 (negre) i F2 (vermell), amb els espectres de DC dels complexos Cd- $\alpha$ mMT2 i Cd- $\beta$ mMT2 (línies puntejades) i la suma dels mateixos. Es pot observar com la suma dels espectres de DC dels complexos Cd- $\alpha$ mMT2 amb Cd- $\beta$ mMT2 de Tipus I o Tipus II proporciona un espectre equivalent a F1 o F2 de la biosíntesi de Cd-mMT2, respectivament.

Els espectres de DC dels complexos  $Zn_3$ - $\beta$ mMT2 i  $Cd_3$ - $\beta$ mMT2 (aquests darrers obtinguts en les produccions de Tipus II en els que els agregats  $Cd$ - $\beta$ mMT2 no incorporen lligands sulfur) són molt semblants, per tant es proposa que ambdós complexos són isoestructurals y a l'hora propers als observats per al domini  $\beta$  de la isoforma de pollastre ckMT1<sup>[132]</sup>. Així és que, en absència de lligands sulfur, el plegament de  $\beta$ mMT2 en coordinar metalls divalents, és, de nou, més semblant al de  $\beta$ ckMT1 que al dels dominis  $\beta$  de les altres isoformes de mamífer (Figura 77).. Cal remarcar, a més a més, que els espectres de DC de les preparacions de mMT2 en medis rics en  $Cd^{2+}$  presenten una intensitat molt superior a les observades per als complexos  $Cd$ -MT de les altres isoformes de ratolí estudiades fins ara, indicant una major quiralitat.



**Figura 77:** Superposició dels espectres de DC dels complexos obtinguts en sintetitzar en medis rics en  $Cd(II)$  el domini  $\beta$  de ckMT1, mMT1 i mMT2 (síntesis de Tipus II).

Pel que fa al domini  $\alpha$ , els resultats obtinguts són els esperats, amb una sola espècie  $Cd_4$ - $\alpha$ mMT2 i un espectre de DC característic d'una  $Cd$ -MT. Cal remarcar que l'existència de dímers en la primera fracció de la purificació per FPLC de la biosíntesis de  $\alpha$ mMT2 en medis rics en  $Cd^{2+}$  pot ser explicada per una alta concentració del complex, juntament a certes variacions en la seva estructura respecte al domini  $\alpha$  quan es troba dins el complex  $Cd_7$ -mMT2, que facilitarien la formació d'aquests dímers mediatitzats per coordinació metàl·lica<sup>[174]</sup>. Així, aquesta part de la proteïna podria estar implicada en la dimerització però en funció del seu replegament. Malgrat tot, no hi ha prou dades actualment per assegurar que és a partir d'aquest domini que es produeix la dimerització dels complexos de mMT2 amb  $Zn^{2+}$ .

Els estudis realitzats *in vitro* amb les preparacions  $Cd$ -mMT2 corroboren la presència de sulfurs en els seus agregats. D'una banda, les preparacions  $Cd$ - $\beta$ mMT2,

que contenen espècies sulfurades com a majoritàries, mostren variació amb el temps dels seus espectres de DC, augmentant la intensitat del senyal per damunt dels 280 nm. D'altra banda, les reaccions de bescanvi  $Zn^{2+}/Cd^{2+}$  dels complexos  $Zn_7$ -mMT2,  $Zn_3$ - $\beta$ mMT2 i  $Zn_4$ - $\alpha$ mMT2 permeten reproduir els espectres de DC de les respectives preparacions recombinants en medis enriquits en Cd(II), quan aquestes contenen pocs o cap lligand sulfur en l'estructura dels seus complexos, mentre els espectres de DC de les preparacions que contenen complexos que contenen lligands sulfur no es reproduïen.

El bescanvi de  $Zn^{2+}$  per  $Cd^{2+}$  no és cooperatiu. Tot i que s'arriba a saturació dels senyals de DC en afegir el nombre d'equivalents de Cd(II) canònics (7 per a la proteïna sencera, 3 per al domini  $\beta$  i 4 per al  $\alpha$ ), s'observa la persistència en solució de complexos minoritaris que han mantingut un Zn(II), fins i tot en presència d'un excés important de Cd(II). Aquesta reticència al bescanvi complet de Zn(II) per Cd(II) indicaria que el plegament de la proteïna amb Cd(II) no està molt afavorit i això fa necessària la presència bé d'un ió  $Zn^{2+}$ , bé de lligands sulfur. La necessitat de la presència de  $Zn^{2+}$  per tal que el complex mantingui un plegament adequat/òptim ja havia estat descrita amb anterioritat per a mMT1<sup>[131, 228]</sup>, mMT4 i  $\beta$ mMT4<sup>[132]</sup>.

En les valoracions del complex  $Zn_4$ - $\alpha$ mMT2 amb Cd(II), es produeix, en excés de metall, un procés de dimerització, obtenint-se complexos  $Cd_8$ - $(\alpha$ mMT2)<sub>2</sub>, com els observats en la biosíntesis de  $\alpha$ mMT2 en medis rics en Cd(II). La dimerització del domini  $\alpha$  es va observar també en les valoracions de  $Zn_4$ - $\alpha$ ckMT1 amb Cd(II). En aquest cas es va determinar que els residus d'His estaven implicats en el procés de dimerització<sup>[58]</sup> i, el fet que els espectres de diferència UV-Vis no indiquessin la formació de nous cromòfors, va permetre eliminar la hipòtesis de dimerització per metall. En  $\alpha$ mMT2, els dímers no es detecten en la valoració fins que hi ha un excés de  $Cd^{2+}$ , de manera que es proposa una dimerització per metall d'aquest domini, tot i que fins ara la dimerització per metall de mMT2 només s'havia proposat per al domini  $\beta$ <sup>[168, 171, 175-176, 229]</sup>.

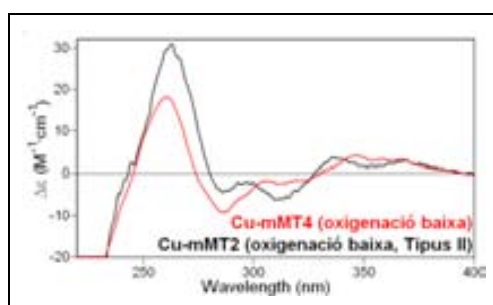
En els experiments d'acidificació-reneutralització dels complexos Cd-MT, només s'aconsegueix reproduir l'espectre de DC inicial en el cas de  $Cd_4$ - $\alpha$ mMT2. Això

corroborar el fet que mMT2, en presència de Cd(II) en el medi, necessita, bé de  $Zn^{2+}$ , bé de lligands sulfur per generar la seva estructura inicial.

El conjunt de resultats recollits i discutits en aquests dos apartats (veure el quadre-resum en l'apartat 4.2.1, Taula 17) han permès concloure que mMT2 presenta un comportament coordinant enfront de metalls divalents amb característiques comunes amb mMT1 o amb mMT4 segons es consideri la proteïna sencera o els dominis, i el tipus de metall. Concretament, l'afinitat d'aquesta isoforma per als ions metàl·lics divalents es troba, com ckMT1, entremig de mMT1 i de mMT4.

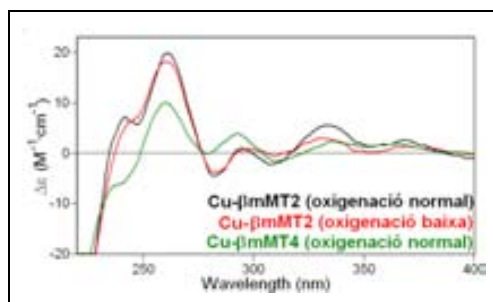
#### 4.1.1.3 PROPIETATS COORDINANTS DE mMT2 ENVERS Cu(I)

La isoforma mMT2 i els seus dos dominis han estat sintetitzats diverses vegades, a condicions d'oxigenació del cultiu diferents (veure capítol 6). En totes les biosíntesis s'ha obtingut complexos homometàl·lics amb Cu(I), excepte per a la proteïna sencera en condicions normals d'oxigenació, on s'ha obtingut una barreja d'espècies heterometàl·liques. En la producció de mMT2 en medis rics en Cu(II) a oxigenació normal, no s'obté  $Zn_3Cu_7$  com s'ha descrit en mMT1 i mMT4<sup>[131-133]</sup>, sinó que molt probablement l'espècie majoritària conté 10 Cu(I). En condicions de cultiu a baixa oxigenació, les espècies obtingudes són homometàl·liques de Cu(I) en tots els casos. L'obtenció d'espècies homometàl·liques de  $Cu^+$  en condicions de baixa oxigenació del cultiu no s'ha observat mai per a mMT1, però sí per a mMT4<sup>[133]</sup>. Les preparacions de mMT4 en aquestes condicions exhibien un espectre de DC que suggeria un lloc de coordinació per al  $Cu^+$  característic entre 340 i 360 (+) nm, que també s'observa en aquelles produccions de de mMT2, que en l'aparta de resultats hem anomenat de Tipus II (Figura 78).



**Figura 78:** Superposició dels espectres de DC de les síntesis en medis rics en Cu(II) a baixa oxigenació de mMT2 (de Tipus II) i mMT4.

La síntesi del domini  $\beta$ mMT2 en presència de Cu(II), en ambdues condicions d'oxigenació del cultiu, sempre han donat lloc a una barreja d'espècies homometàl·liques, amb  $\text{Cu}_6$  com a majoritària. Els espectres de DC d'ambdues produccions són molt semblants entre ells i propers al de  $\beta$ mMT4 produïda en medis rics en Cu(II), sobretot en la regió per sobre els 340 nm (Figura 79).



**Figura 79:** Superposició dels espectres de DC de la síntesi del domini  $\beta$ mMT2 en medis rics en Cu(II) a oxigenació normal i baixa, amb l'espectre de DC de la síntesi del domini  $\beta$ mMT4 en medis rics en Cu(II) a oxigenació normal.

La característica diferencial més important de mMT2 produïda en medis rics en Cu(II) ha estat la dificultat de sintetitzar el domini  $\alpha$ . Tant en cultius amb una oxigenació normal com baixa, la proteïna s'estructura molt deficientment, per la qual cosa es dedueix que davant aquest metall, l'estructura de mMT2 sencera depèn del domini  $\beta$ . El seu plegament no és prou estable com per a mantenir-se sense presència de Zn(II), la qual cosa explicaria perquè s'han obtingut resultats variables en les síntesis de la proteïna sencera a baixa oxigenació.

Els estudis de substitució del Zn pel Cu en  $\text{Zn}_3$ - $\beta$ mMT2 mostren evolucions molt properes a  $\beta$ mMT1 i  $\beta$ mMT4, aconseguint-se als 6 equivalents de  $\text{Cu}^+$  afegits un espectre de DC molt proper al de la producció de  $\beta$ mMT4 en medis rics en Cu(II). En excés de metall, però, s'observa la dimerització de la proteïna.

En valorar  $\text{Zn}_7$ -mMT2 i  $\text{Zn}_4$ - $\alpha$ mMT2 amb Cu(I) s'observen evolucions molt properes mentre hi ha Zn(II) enllaçat a les proteïnes. El domini  $\alpha$  mostra la seva dificultat per enllaçar el Cu(I), ja que per al 5è equivalent de Cu(I) afegit, els espectres de DC comencen a perdre intensitat y les espècies  $\text{Cu}_4$  i  $\text{Cu}_8$  que s'havien format perden estabilitat.

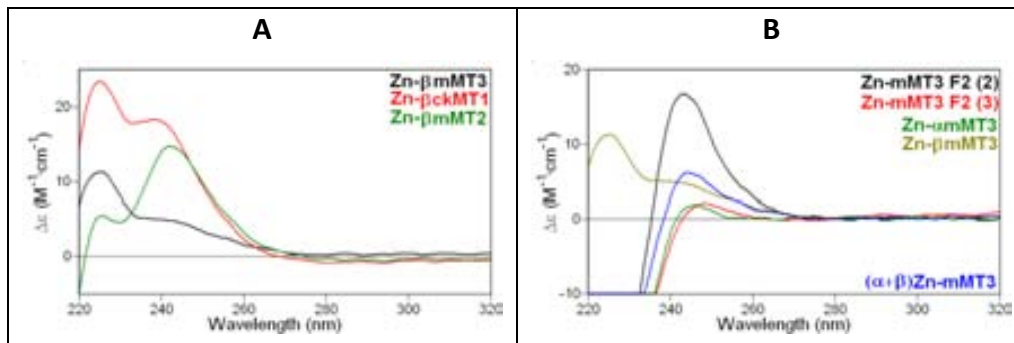
El conjunt de resultats observats per a mMT2 i els seus dominis (veure el quadre-resum en l'apartat 4.2.1, Taula 17) ha portat a classificar aquesta isoforma com intermèdia entre mMT1 (Zn-tioneïna) i mMT4 (Cu-tioneïna). Si bé presenta una certa dificultat per a la unió a Cu(I), aquesta és deguda al seu domini  $\alpha$ mMT2 que es classificaria com a Zn-tioneïna, però no al mateix nivell que mMT1. El domini  $\beta$ mMT2, en canvi, presenta característiques de Cu-tioneïna com mMT4. Així, si bé els dos dominis presenten independència de comportament envers Zn(II) i Cd(II), davant de Cu(I), hi ha una interacció important. Si el comportament coordinant de la proteïna davant metalls divalents porta a classificar-la prop de ckMT1, davant la marcada influència del domini  $\beta$ mMT2, que permet obtenir espècies de mMT2 amb un important contingut de Cu<sup>+</sup>, es considera que aquesta proteïna es trobaria entre ckMT1 i mMT4, allunyada de mMT1 però sense poder atribuir-li un elevat caràcter Cu-tioneïna a causa del seu domini  $\alpha$ . Així, l'esquema de preferència de coordinació d'aquestes proteïnes envers Cu(I) seria: mMT4 > mMT2 > ckMT1 > mMT1.

#### 4.1.2 Preferències de coordinació metàl·lica de mMT3

##### 4.1.2.1 PROPIETATS COORDINANTS DE mMT3 ENVERS Zn(II)

La biosíntesis de mMT3 en medis rics en Zn(II) proporciona una barreja d'espècies, amb Zn<sub>7</sub>-mMT3 com a majoritària, seguida d'espècies amb 6 Zn<sup>2+</sup> i amb 8-9 Zn<sup>2+</sup> com a minoritàries. Els seus dominis independents també es sintetitzen com una barreja d'espècies amb els complexos canònics com a majoritaris: Zn<sub>3</sub>- $\beta$ mMT3 i Zn<sub>4</sub>- $\alpha$ mMT3. Els espectres de DC de les preparacions Zn-mMT3 sencera presenten característiques diferents d'una Zn-MT, des del típic *exciton coupling* a 240 nm (que també es troba per als complexos formats pel domini  $\alpha$ ), a una gaussiana en aquest punt, o desplaçada més a la dreta. Pel que fa als complexos amb Zn(II) del domini  $\beta$ , el seu espectre de DC és atípic, presentant una major semblança a l'espectre de DC dels complexos Zn- $\beta$ ckMT1 que a Zn- $\beta$ mMT2 (Figura 80A). La suma dels espectres de DC les preparacions Zn- $\beta$ mMT3 i Zn- $\alpha$ mMT3 biosintetitzades separatament dóna lloc a un espectre de DC proper a una de les produccions de la proteïna sencera (Figura 80B), indicant una independència dels dos dominis en aquest cas. Aquestes característiques

de mMT3 indiquen una preferència més baixa d'aquesta proteïna envers la unió d'ions  $Zn^{2+}$  que mMT1.



**Figura 80:** A: Superposició dels espectres de DC de la síntesis recombinant del domini  $\beta$ mMT3,  $\beta$ ckMT1 i  $\beta$ mMT2 en medis rics en Zn(II). B: Superposició dels espectres de DC de dues biosíntesis de mMT3 en medis rics en  $Zn^{2+}$ , amb els espectres de DC dels complexos Zn- $\alpha$ mMT2 i Zn- $\beta$ mMT3 i la suma d'ambdós dominis amb la proteïna sencera.

#### 4.1.2.2 PROPIETATS COORDINANTS DE mMT3 ENVERS Cd(II)

La purificació de mMT3 i els seus dos dominis biosintetitzats en medis rics en Cd(II) proporciona, en tots els casos, dues fraccions separables per FPLC. S'observa sempre presència d'espècies sulfurades en les preparacions, fet que avança ja un caràcter de Cu-tioneïna per als tres pèptids<sup>[59]</sup>. Tant les preparacions Cd-mMT3 com les Cd- $\alpha$ mMT3 presenten espectres de DC amb els *exciton couplings* esperats a 250 nm. També, la presència d'espècies riques en lligands sulfur en ambdós casos es posa de manifest a partir dels 280 nm. Contràriament, les preparacions Cd- $\beta$ mMT3 presenten uns espectres de DC poc habituals, diferents als de les altres MT de mamífer, i diferents d'una fracció a l'altra, tal i com es correspon amb la diferent abundància d'espècies Cd-S<sup>2-</sup>- $\beta$ mMT3 que les caracteritza.

Els estudis de variació amb el temps dels espectres de DC de les preparacions Cd-mMT3, Cd- $\beta$ mMT3 i Cd- $\alpha$ mMT3 indiquen importants evolucions estructurals per a tots els casos, tal i com era previsible si es té en compte la important presència de lligands sulfur en tots aquestes mostres.

Quan el Zn(II) és substituït per Cd(II), tant en els complexos Zn<sub>7</sub>-mMT3 com en els dels dos dominis independents, sempre s'observa que almenys un  $Zn^{2+}$  queda retingut en la proteïna al final de la valoració. Addicionalment, i també en tots els casos, el



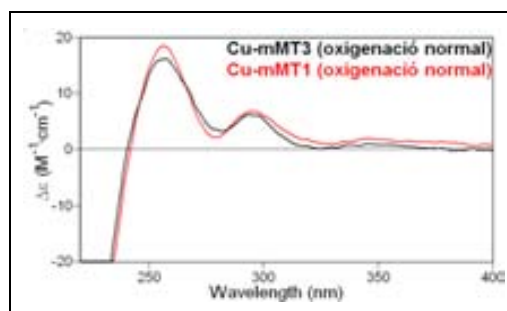
bescanvi Zn/Cd no és cooperatiu, i s'arriba finalment a barreges de diferents espècies Cd-MT.

Els processos d'acidificació i reneutralització donen el resultat esperat si es té en compte que en totes les preparacions es van detectar espècies que contenen lligands sulfur: en cap dels casos es recupera la composició ni empremta espectroscòpica inicial.

El conjunt de resultats discutits en aquests dos darrers subapartats (veure el quadre-resum en l'apartat 4.2.1, Taula 17) porten a la conclusió que mMT3 no presenta característiques de Zn-tioneïna. Es trobaria doncs, més propera a mMT4 dins del conjunt de les 4 isoformes de les MT de ratolí.

#### 4.1.2.3 PROPIETATS COORDINANTS DE mMT3 ENVERS Cu(I)

Les síntesis de la isoforma mMT3 en medis rics en Cu(II) proporciona una barreja d'espècies heterometàl·liques (Zn,Cu-MT) en cultius a oxigenació normal, i una barreja d'espècies homometàl·liques de  $\text{Cu}^+$  en cultius a oxigenació baixa. Els espectres de DC d'ambdós tipus de preparacions són molt semblants entre ells, i l'espectre de DC provinent de la biosíntesi a oxigenació normal és pràcticament igual al de les preparacions Cu-mMT1 amb la mateixa oxigenació (Figura 81). Entre aquestes dues preparacions, però, hi ha diferències de composició importants. Si bé en Cu-mMT1 l'espècie majoritària és  $\text{Zn}_3\text{Cu}_7\text{-mMT1}$ , mMT3 també uneix majoritàriament 10 metalls però aquests segurament són espècies  $\text{Cu}_{10}\text{-mMT3}$ . Complexos d'estequiometria  $\text{Cu}_{10}\text{-MT}$  també s'han descrit en mMT4 biosintetitzada en medis rics en Cu(II) amb una baixa oxigenació del cultiu, però l'espectre de DC no és equivalent.



**Figura 81:** Superposició dels espectres de DC de les síntesis de mMT3 i mMT1 en medis rics en Cu(II) a oxigenació normal.

La síntesi del domini  $\beta$  en medis ric en Cu(II) en les dues condicions d'oxigenació del cultiu no ha donat lloc a diferències importants. Ambdós tipus de produccions donen lloc a una mescla barrejada d'espècies homometàl·liques de Cu(I) en les que l'espècie  $\text{Cu}_6\text{-}\beta\text{mMT3}$  és clarament majoritària. Contràriament, el resultat obtingut amb el domini  $\alpha\text{mMT3}$  indiquen clarament la poca afinitat d'aquest pel Cu(I).

La substitució de Zn(II) per Cu(I) permet reproduir *in vitro* els espectres de les biosíntesis en medis rics en Cu(II) tant de la proteïna sencera com dels dos dominis. En concret la proteïna sencera reproduïx força bé, per a 14 eq de Cu(I) afegits, el resultat de les bioproduccions a oxigenació normal tant pel que fa a la seva composició com la seva empremta espectroscòpica. En canvi, el fragment  $\beta$  dona lloc, per a 12 eq de Cu(I) afegits, a un espectre força proper al de les bioproduccions, però no a la seva composició. Pel que fa al domini  $\alpha$ , fins i tot en excés de Cu(I), les espècies heterometàl·liques es mantenen en solució i l'espectre de DC és de baixa intensitat com en el cas de les síntesis d'aquest domini en medis rics en Cu(II).

Les anàlisis de preferència de coordinació metàl·lica de mMT3 i els seus dominis indiquen que aquesta proteïna presenta característiques de Cu-tioneïna, amb un domini  $\beta$  clarament "Cu-tioneïna" i un domini  $\alpha$  amb característiques intermèdies, fet que explicaria que la isoforma nativa sigui aïllada com a complex  $\text{Cu}_4\text{Zn}_3\text{-mMT3}^{[5]}$ , així com que s'hagi descrit a la literatura que en les valoracions amb Cu(I) fetes des d'apo-MT, el primer clúster format és a la part N-terminal (domini  $\beta$ ) i conté 4  $\text{Cu}^{+226}$ . Aquesta isoforma tindria unes característiques properes a mMT4 en el conjunt de les MT de ratolí, que, per ordre de preferència envers el  $\text{Cu}^+$  es classificarien segons:  $\text{mMT3} > \text{mMT4} > \text{mMT2} > \text{mMT1}$  (veure el quadre-resum en l'apartat 4.2.1, Taula 17).

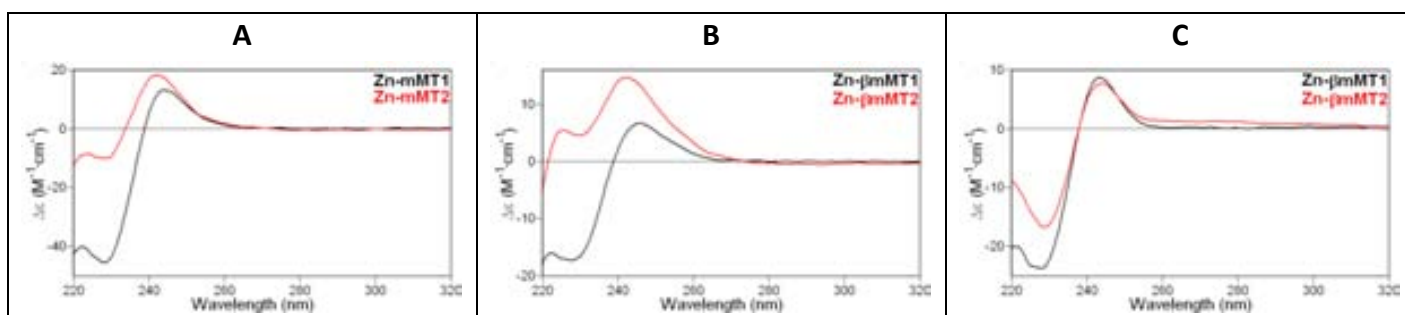
#### **4.1.3 El conjunt paradigmàtic MT1/MT2: igual o diferents?**

En la major part dels treballs publicats sobre les MTs de mamífer, no es diferencien les isoformes mMT1 i mMT2, considerant-se les dues proteïnes com equivalents pel que fa a la seva funció i localització, de manera que s'anomenen conjuntament mMT1/2. Així i tot, les seves seqüències no són idèntiques i hi ha estudis que indiquen una diferent localització dins un mateix teixit així com una diferent

resposta d'inducció enfront de metalls (veure Introducció de la present tesi). Malgrat això, fins al moment no hi havia estudis realitzats sobre la seva possible diferenciació en quant a la preferència de coordinació de metalls pesants, raó per la qual s'ha portat a terme aquesta tesi doctoral.

La primera diferència observada en la síntesis d'aquestes dues isoformes en medis rics en Zn(II) és el fet que mMT2 dona lloc a dímers, a més dels monòmers Zn<sub>7</sub>-mMT2 esperats. La dimerització de mMT2 en presència de Zn(II) s'havia observat en la reconstitució d'apo-MT2a de conill amb Zn(II)<sup>[173]</sup> però la major part d'estudis de dimerització fan referència a complexos formats en presència d'excés de Cd(II)<sup>[171-172, 174-176, 229-230]</sup>. La dimerització de MT2 ja va donar problemes en la determinació de la seva estructura per NMR<sup>[169]</sup>. De fet, cap altra isoforma de mamífer ha proporcionat dímers en la seva biosíntesis en medis rics en metall o en la purificació de proteïna nativa.

Per altra banda, els espectres de DC de Zn<sub>7</sub>-mMT2 i Zn<sub>7</sub>-mMT1 indiquen diferències en l'estructuració dels complexos: mMT1 presenta un *exciton coupling* a 240 nm mentre que mMT2 hi té una gaussiana, característica indicativa d'una estructura més estable/compacta en mMT1 que en mMT2. Aquesta diferència és deguda sobretot al domini  $\beta$ , que molt probablement presenta una estructura diferent en cada isoforma, tal i com indiquen els espectres de DC (Figura 82).



**Figura 82:** Superposició dels espectres de DC dels complexos de Zn(II) de les isoformes mMT1 i mMT2 i els seus dominis  $\alpha$  i  $\beta$ .

Pel que fa a la seva capacitat de formació de complexos de Cd(II), s'ha observat que les preparacions Cd-mMT2 contenen complexos Cd<sub>7</sub> amb i sense lligands sulfur mentre que no s'han detectat lligands sulfur en les preparacions Cd-mMT1.

En referència a l'afinitat per al  $\text{Cu}^+$ , mMT2 té una major preferència per a aquest metall que no pas mMT1. De fet, les biosíntesis de mMT1 en medis rics en  $\text{Cu}^{2+}$  proporcionen espècies heterometàl·liques  $\text{Cu}_7\text{Zn}_3\text{-mMT1}$  en cultius amb una oxigenació normal, i una barreja d'espècies també heterometàl·liques en cultius amb una oxigenació baixa. En la biosíntesi d' $\alpha\text{mMT1}$  en les mateixes condicions també s'obté una barreja d'espècies heterometàl·liques. En canvi, la síntesi d' $\alpha\text{mMT2}$  o  $\beta\text{mMT2}$ , en qualsevol d'aquestes condicions, sempre proporciona complexos homometàl·lics de  $\text{Cu(I)}$ , i en el cas de mMT2, només en condicions d'oxigenació normal s'observen espècies heterometàl·liques, juntament amb homometàl·liques. Cal destacar també que en condicions d'oxigenació baixa, aquesta isoforma ha format complexos  $\text{Cu}_{18}\text{-mMT2}$ , indicatius de gran capacitat d'unió envers aquest metall.

Les diferències observades entre les isoformes mMT1 i mMT2 pel que fa a l'expressió dels seus gens i la resposta biològica davant diferents estímuls han estat explicades amplament en la introducció d'aquesta tesis doctoral, i es poden relacionar amb les diferències de preferència a metalls pesants (Taula 16).

Davant aquestes diferències, a nivell genètic, fisiològic i de preferència metàl·lica, es proposa que les isoformes mMT1 i mMT2 haurien de ser considerades de manera diferenciada i no conjuntament com s'ha realitzat fins ara en una gran major part de treballs per molts grups de recerca:

- La isoforma mMT1 és clarament una Zn-tioneïna mentre que mMT2 no ho és. mMT2 presenta característiques de preferència d'enllaç pel  $\text{Cu(I)}$ , però es classificaria com una MT de caràcter intermedi entre les Zn-tioneïnes i les Cu-tioneïnes. Més endavant s'inclourà en la classificació general de les MTs realitzada per el grup de recerca on s'ha realitzat aquesta tesis doctoral.
- La isoforma mMT1 té tendència a retenir els seus ions  $\text{Zn(II)}$  inicialment coordinats mentre mMT2 té una major facilitat per intercanviar-los, corroborant el fet que mMT1 tindria una funció relacionada amb la destoxicació de metalls pesants de l'organisme mentre que mMT2 participaria preferentment en la homeòstasi de metalls fisiològics gràcies a la seva capacitat per interaccionar i intercanviar els ions metàl·lics amb altres proteïnes.

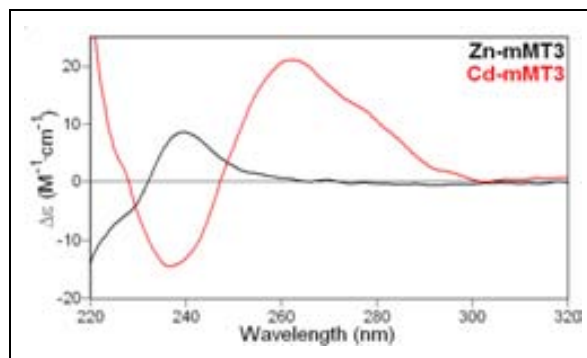
	mMT1	mMT2
<b>Inducció del gen</b> <sup>[114-118]</sup>	Inducció més elevada per Cd(II).	Inducció per Zn(II), Cd(II) (en menor mesura) i glucocorticoides.
<b>Seqüència aminoacídica</b>	7 canvis importants: 3 aa sense càrrega en mMT1 són aas amb càrrega en mMT2. 4 aa petits en mMT1 són aas grans en mMT2. 2 d'aquests canvis es troben entre dues Cys. Un 80% de mMT2 de fetge es troba acetilada <sup>[147]</sup> .	
<b>Teixit on es troba la proteïna</b>	Ubiqua, en el Sistema Nerviós preferentment en neurones <sup>[90]</sup> .	Ubiqua, en el Sistema Nerviós preferentment en cèl·lules de la glia <sup>[90]</sup> . Major quantitat d'aquesta proteïna en cèl·lules tumorals <sup>[138]</sup> .
<b>Funció</b> <sup>[137]</sup>	Preferentment implicada en la detoxicació per metall.	Preferentment implicada en l'homeòstasi de metalls fisiològics.
<b>Biosíntesis en medis rics en Zn(II)</b>	Un sol complex Zn <sub>7</sub> -mMT1. Espectre de DC característic d'una Zn-MT <sup>[128]</sup> .	Diferenciació entre dímers i monòmers.
<b>Biosíntesis en medis rics en Cd(II)</b>	Un sol complex Cd <sub>7</sub> -mMT1. Espectre de DC característic d'una Cd-MT <sup>[132]</sup> .	Presència de lligands sulfur (molt probablement en el domini β). Complexos Cd-αmMT2 que poden ser dimèrics.
<b>Biosíntesis en medis rics en Cu(II)</b>	Complexos heterometal·lics amb Zn(II), en mMT1 i αmMT1. Complexos homometal·lics de Cu(I) en βmMT1 <sup>[127, 131, 231]</sup> .	Únicament es formen complexos heterometal·lics, juntament amb homometal·lics, en mMT2 sintetitzada en cultius amb una oxigenació normal.

Taula 16: Taula-resum de les diferències entre les isoformes mMT1 i mMT2.

#### 4.1.4 La MT del Sistema Nerviós: mMT3

En la introducció d'aquesta Tesi Doctoral s'ha parlat àmpliament de les característiques diferencials de la isoforma mMT3 conegudes fins ara. Amb aquest treball s'ha posat de manifest la seva capacitat coordinant preferent per al Cu<sup>+</sup> enfront dels metalls divalents Cd(II) i Zn(II). De fet, les biosíntesis de mMT3 en medis rics en Zn(II) o en Cd(II) donen lloc a uns espectres de DC que mostren com els complexos amb un i altre metall no són isoestructurals (Figura 83). Aquesta dada és important per a les anàlisis estructurals per NMR, ja que es determina en complexos que contenen Cd(II) i aquesta estructura no coincideix amb la del complex amb Zn(II). Això s'ha pogut observar en el domini β, on s'ha determinat que té una estructura més compacta amb

Cd(II) que amb Zn(II)<sup>[37, 232]</sup>, i l'intercanvi Zn/Cd no és isomorfe en aquest domini<sup>[210]</sup>. Així doncs, el caràcter Cu-tioneïna d'aquesta isoforma és significatiu, tant més quan l'intercanvi Zn/Cd no és cooperatiu, ni en la proteïna sencera ni en els seus dominis, confirmant l'observat en la reconstitució dels complexos Zn-MT3 i Cd-MT3 des d'apo-MT<sup>[204]</sup>.



**Figura 83:** Espectres de DC de les biosíntesis de mMT3 en medis rics en Zn(II) i en Cd(II).

La purificació de MT3 humana nativa proporciona complexos heterometàl·lics amb 4 Cu(I) i 3 Zn(II)<sup>[5, 191]</sup>, i també homometàl·lics de Zn(II)<sup>[211, 232]</sup>. Les evidències d'un lloc addicional d'unió per al Zn(II)<sup>[209, 219]</sup> concorden amb l'existència d'espècies amb 8 Cd(II) així com el manteniment d'una espècie Cd<sub>7</sub>Zn<sub>1</sub>-mMT3 en els estudis d'intercanvi Zn/Cd d'aquesta isoforma realitzats en aquesta Tesi Doctoral. Aquest lloc addicional d'unió per a ions divalents podria estar situat en el domini α de la proteïna, ja que els nostres resultats (bioproducció de αmMT3 y estudis de reemplaçament Zn/Cd), indiquen que és aquest domini el que dona lloc a complexos de Cd(II) amb un ió divalent més de l'esperat, Cd<sub>5</sub><sup>-</sup>, per un domini α.

Però com ja s'ha indicat, aquesta isoforma té unes característiques preferencials de coordinació al Cu<sup>+</sup>, de fet, ja s'havia detectat una major afinitat per aquest metall respecte al conjunt MT1/2<sup>[222]</sup>. Molt probablement és gràcies a això que el complex Zn<sub>7</sub>-mMT3 i, en concret el seu domini β, pot interaccionar amb les plaques Aβ de la malaltia d'Alzheimer, formant complexos heterometàl·lics Zn,Cu-mMT3, impedit la seva agregació i protegint el cervell.

De les 4 MTs de mamífer, MT3 és la que presenta unes característiques funcionals diferencials. De fet, a part de funcions de protecció i homeòstasis enfront de metalls pesants, per a la comprensió de les quals els estudis publicats en aquesta

Tesi seran molt útils, cal recordar que la seqüència aminoacídica presenta dues insercions: un Thr en la posició 5 i un hexapèptid en el domini  $\alpha$  de la proteïna. El motiu TCPCP, confereix l'acció inhibidora del creixement neuronal característica de mMT3<sup>[180-183, 233]</sup>. Pel que fa als sis aminoàcids del domini  $\alpha$ , la seva deleció porta a una disminució de l'activitat GIF, degut a una alteració de les interaccions intramoleculares, afectant l'estructura del domini  $\beta$  i, per tant, al motiu TCPCP.





## 4.2 CONSIDERACIÓ DE LES 4 MTs DE MAMÍFER EN LA CLASSIFICACIÓ GLOBAL DE LES MTs COM A Zn- O Cu-TIONEÏNES

### 4.2.1 Les 4 MT de mamífer: ordenació respecte la seva preferència metàl·lica i possible significat biològic.

Les característiques més importants de les quatre MTs de mamífer es troben resumides en la Taula 17 que permetrà relacionar i classificar les isoformes respecte la seva preferència metàl·lica.

En comparar les característiques de preferència metàl·lica de les 4 MTs de ratolí, i tal com s'ha indicat en l'apartat 4.1 d'aquesta discussió, s'observa que mMT3 és una Cu-tioneïna, com mMT4. Però l'elevada presència de lligands sulfur en la biosíntesis de  $\alpha$ mMT3 en medis rics en  $\text{Cd}^{2+}$ , així com la major capacitat coordinat d'ions  $\text{Cu}^+$  indiquen que aquest domini té major preferència per al metall monovalent que  $\alpha$ mMT4. Per aquesta raó, es considera que el caràcter de Cu-tioneïna de mMT3 és més acusat que el de mMT4. Els dos dominis de mMT3 tenen característiques de Cu-tioneïna.

Pel que fa a mMT2, s'ha indicat que és clarament una MT intermèdia. En les síntesis en medis rics en  $\text{Cd}^{2+}$  s'obtenen espècies amb lligands sulfur, característiques d'una Cu-tioneïna i és capaç d'unir més ions  $\text{Cu}^+$  que d'altres isoformes. Però el fet que presenti dificultats en mantenir l'estructura en augmentar el seu contingut de  $\text{Cu}^+$  la situa, en la nostra classificació, en un punt intermedi.

Així, com a conclusió global d'aquest treball, proposem la següent assignació de preferència de coordinació de metalls pesants de les 4 isoformes de ratolí:

- mMT1: Zn-tioneïna.  $\beta$ mMT1, Cu-tioneïna.  $\alpha$ mMT1, Zn-tioneïna.
- mMT2: intermèdia.  $\beta$ mMT2, Cu-tioneïna.  $\alpha$ mMT2, intermèdia.
- mMT3: Cu-tioneïna.  $\beta$ mMT3, Cu-tioneïna.  $\alpha$ mMT3, Cu-tioneïna.
- mMT4: Cu-tioneïna.  $\beta$ mMT4, Cu-tioneïna.  $\alpha$ mMT4, Cu-tioneïna.

		mMT1	mMT2	mMT3	mMT4
Biosíntesis amb Zn <sup>2+</sup>	sencera	Zn <sub>7</sub>	Zn <sub>7</sub> (dímers)	Zn <sub>7</sub> >Zn <sub>6</sub> >Zn <sub>5</sub>	Zn <sub>7</sub>
	β	Zn <sub>3</sub>	Zn <sub>3</sub>	Zn <sub>3</sub> >Zn <sub>2</sub> >Zn <sub>1</sub>	Zn <sub>3</sub>
	α	Zn <sub>4</sub>	Zn <sub>4</sub>	Zn <sub>4</sub>	Zn <sub>4</sub>
Biosíntesis amb Cd <sup>2+</sup>	sencera	Cd <sub>7</sub> >>Cd <sub>7</sub> Zn <sub>1</sub> >Cd <sub>6</sub> Zn <sub>1</sub>	Cd <sub>7</sub> >Cd <sub>7</sub> S <sub>2</sub>	Cd <sub>7</sub> >Cd <sub>7</sub> S <sub>2</sub> >Cd <sub>8</sub>	Zn <sub>4</sub> Cd <sub>3</sub> >Zn <sub>x</sub> Cd <sub>y</sub> >Cd <sub>7</sub> (x+y=7)
	β	Cd <sub>3</sub>	Tipus I: Cd <sub>3</sub> S <sub>2</sub> >Cd <sub>3</sub> Tipus II: Cd <sub>3</sub>	Cd <sub>3</sub> >Cd <sub>3</sub> S <sub>2</sub> ≈Cd <sub>4</sub>	Cd <sub>3</sub> >Cd <sub>2</sub> Zn <sub>1</sub> >Cd <sub>1</sub> Zn <sub>2</sub>
	α	Cd <sub>4</sub>	Cd <sub>4</sub> (dímers)	Cd <sub>4</sub> >Cd <sub>4</sub> S <sub>1</sub> ≈Cd <sub>5</sub>	Cd <sub>4</sub>
Són isoestructurals?		SI	NO	NO	NO
Biosíntesis amb Cu <sup>+</sup> a oxigenació normal	sencera	Cu <sub>7</sub> Zn <sub>3</sub>	M <sub>10</sub> >M <sub>11</sub> ≈M <sub>12</sub> >M <sub>7-9</sub> (Cu <sub>10</sub> >Cu <sub>6</sub> >Cu <sub>8</sub> )	M <sub>10</sub> >M <sub>11-12</sub> (Cu <sub>10</sub> >Cu <sub>6</sub> >Cu <sub>11</sub> )	Cu <sub>7</sub> Zn <sub>3</sub>
	β	Cu <sub>7</sub> >Cu <sub>6</sub>	Cu <sub>6</sub> >Cu <sub>7</sub> >Cu <sub>5</sub>	Cu <sub>6</sub> >Cu <sub>5</sub> >Cu <sub>7</sub>	Cu <sub>7</sub> >Cu <sub>6</sub> >Cu <sub>4-5</sub>
	α	Cu <sub>4</sub> Zn <sub>1</sub> >Cu <sub>5</sub> Zn <sub>1</sub> >Cu <sub>7</sub>	ICP: 9.67 Cu / 0 Zn	M <sub>4</sub> >M <sub>11</sub> ≈M <sub>13</sub> >M <sub>1</sub> ≈M <sub>6</sub> ≈M <sub>10</sub>	Cu <sub>5</sub> >Cu <sub>4-7</sub>
Biosíntesis amb Cu <sup>+</sup> a oxigenació baixa	sencera	M <sub>11</sub> >M <sub>10</sub> >M <sub>6-9</sub> ≈M <sub>13,15</sub> (Cu <sub>7</sub> >Cu <sub>5</sub> >Cu <sub>4</sub> )	Tipus I: Cu <sub>18</sub> Tipus II: Cu <sub>8-12</sub> Tipus III: Cu <sub>4</sub> >apo	Cu <sub>10</sub> >Cu <sub>12</sub> >Cu <sub>9-11</sub>	Cu <sub>10</sub> >Cu <sub>13</sub> >Cu <sub>15</sub>
	β	--	Cu <sub>6</sub> >Cu <sub>7</sub> >Cu <sub>5</sub>	Cu <sub>6</sub> >Cu <sub>5</sub> ≈Cu <sub>7</sub>	--
	α	--	ICP: 7.32 Cu / 0 Zn	ICP: 6.8 Cu / 0 Zn	--
Valoració amb Cd <sup>2+</sup> . Reprodueix els complexos recombinants?		DC : SI ESI-MS : SI	DC : SI ESI-MS : NO Es manté el Zn <sup>2+</sup> . Espècies de 8 metalls.	DC : NO ESI-MS : NO Es manté el Zn <sup>2+</sup> .	DC : NO ESI-MS : NO
Valoració amb Cu <sup>+</sup> . Reprodueix els complexos recombinants?		DC : SI ESI-MS : SI	DC : SI ESI-MS : SI En excés, dimeritza.	DC : SI ESI-MS : SI Reprodueix en excés de metall. Després dimeritza.	DC : SI ESI-MS : SI

**Taula 17:** Resum de les característiques de les 4 MTs de mamífer. Les dades de mMT1 i mMT4 provenen d'estudis anteriors realitzats pel grup de recerca on s'ha realitzat la present Tesi Doctoral<sup>[59, 132]</sup>.

Aquesta classificació permet una major comprensió de les funcionalitats establertes per a aquestes MTs en l'organisme. La isoforma mMT4 ha estat detectada en l'epiteli estratificat, on la seva principal funció és la regulació i l'homeòstasi de metalls intracel·lulars<sup>[4, 113]</sup>.

La isoforma mMT3 es troba en el sistema nerviós central, en les vesícules sinàptiques de les neurones que segresten zinc<sup>[88-89]</sup>, on, el lloc d'unió preferencial per al Zn<sup>2+</sup> és molt útil, però la seva superior afinitat per al Cu<sup>+</sup> permet que, quan mMT3 es

troba en l'espai intracel·lular, realitzi una funció de protecció en impedir que es formin les plaques  $\beta$ -amiloides causants de la malaltia d'Alzheimer<sup>[107, 193]</sup>.

La isoforma mMT2 no té una preferència clara per un o altre metall, de fet, presenta característiques tant de Zn-tioneïna com de Cu-tioneïna. Això, juntament amb la seva capacitat de dimeritzar i interaccionar amb altres proteïnes i elements del metabolisme, que no tenen les altres MTs de mamífer, indica el paper clau de mMT2 en la distribució i homeòstasi dels metalls intracel·lulars, tant mono com divalents. A més, la seva capacitat d'interacció amb altres proteïnes seria imprescindible per actuar com a xaperona molecular.

Finalment, mMT1, és una Zn-tioneïna, la seva gran afinitat per als metalls divalents la fan idònia per al paper detoxificador que ja se li ha atribuït en treballs anteriors<sup>[71, 137]</sup>. A més, la seva expressió gènica és més elevada en presència de Cd(II) que no pas altres isoformes<sup>[90]</sup>.

#### ***4.2.2 El sistema MT de mamífer respecte la resta de MTs: forces de diferenciació/selecció***

El grup de recerca on s'ha realitzat aquesta tesi doctoral ha proposat una classificació gradual de les MTs que va de les MTs especialitzades per a enllaçar Zn(II) a les Cu-tioneïnes genuïnes<sup>[59]</sup> (Figura 84). Les isoformes mMT2 i mMT3 estudiades en aquest treball es situarien, segons la seva preferència metàl·lica:

- mMT2: Entre ckMT1 i MTH. Com s'ha indicat anteriorment, presenta característiques molt properes a la MT de pollastre, que és també una MT intermèdia.
- mMT3: Entre QsMT i HpCuMT.

Les 4 MTs de mamífer no es troben properes entre elles en aquesta classificació, tot i que els 20 residus de Cys presents en la seva seqüència es troben altament conservats. Les quatre isoformes han aparegut en l'evolució per duplicació gènica i posterior divergència. Així, les diferències aminoacídiques indicades en la introducció d'aquesta Tesi Doctoral serien les responsables de la variabilitat existent en preferència metàl·lica, de la mateixa manera que s'ha pogut observar en les MTs de

mol·lusc<sup>[234]</sup>. La variació evolutiva dels residus no cisteínics pot imposar un o altre tipus de coordinació metàl·lica degut a variacions estructurals. No es coneix encara com afectaria a la coordinació un o altre aminoàcid en relació de proximitat a una Cys. Aquest és un dels aspectes a estudiar en propers treballs: anàlisis estructurals de les MT de les quals es desconeix l'estructura, anàlisis filogenètiques i alineaments de seqüència peptídica, i estudis de canvis d'aminoàcid en relació a canvis de preferència metàl·lica entre isoformes d'un mateix organisme i entre organismes.

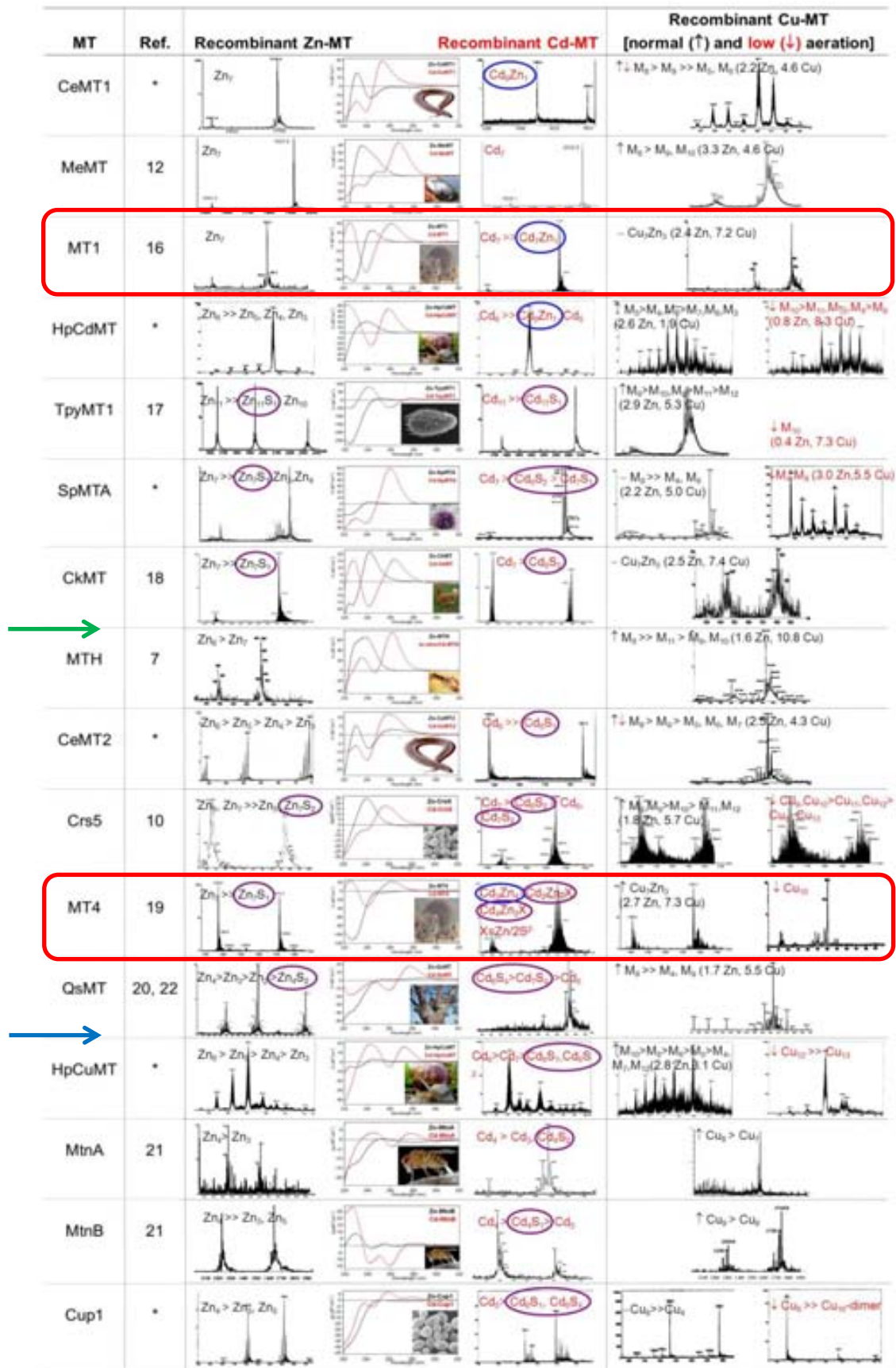


Figura 84: Ordenació de les MTs de Zn-tioneïna genuïna a Cu-tioneïna genuïna<sup>[59]</sup>. S'han ressaltat les isoformes de mamífer i s'indica amb fletxes on es situarien mMT2 (verda) i mMT3 (blava).



## **5. CONCLUSIONS**





## 5. CONCLUSIONS

El treball realitzat en el marc d'aquesta Tesi Doctoral ha permès arribar a un conjunt de conclusions que s'exposen a continuació agrupades d'acord amb els diferents objectius proposats.

1. La isoforma mMT2 en biosintetitzar-se en medis rics en Zn(II) forma dímers; en medis rics en Cd(II) dóna lloc a complexos que contenen lligands sulfur; en medis rics en Cu(II) genera espècies homometàl·liques de Cu(I) i pot arribar a unir fins a 18 ions monovalents.
2. Aquests resultats permeten concloure que la isoforma mMT2 té característiques de preferència metàl·lica a mig camí entre les Zn-les i Cu-tioneïnes genuïnes, amb un domini  $\beta$  amb característiques de Cu-tioneïna i un domini  $\alpha$  també de caràcter intermedi.
3. Les isoformes mMT1 i mMT2 no tenen les mateixes característiques de preferència metàl·lica: per comparació amb resultats previs del nostre grup, es pot afirmar que mMT2 presenta unes característiques de Cu-tioneïna més pronunciades que les de mMT1.
4. El fet que la isoforma mMT2 tingui una major facilitat per bescanviar els ions Zn(II) inicialment coordinats, la seva facilitat per dimeritzar i el seu caràcter més marcat de Cu-tioneïna, suggeriria una participació preferent d'aquesta isoforma en la homeòstasi de metalls intercel·lulars i l'intercanvi de metall amb altres proteïnes.
5. Es proposa que en tot tipus d'estudis, mMT1 i mMT2 s'haurien de considerar separatament, i no conjuntament (sistema MT1-2) com es troba tradicionalment en la literatura.
6. La isoforma mMT3 sintetitzada en medis rics en Zn(II) no dóna lloc a una única espècie Zn-MT i s'observa un lloc d'unió preferencial per al Zn(II). La biosíntesis d'aquesta isoforma en medis rics en Cd(II) genera espècies riques en lligands

sulfur. En biosintetitzar-se en medis rics en Cu(II) forma tant espècies homometàl·liques de Cu(I) com heterometàl·liques Zn,Cu-MT.

7. Aquests resultats permeten concloure que la isoforma mMT3 és una Cu-tioneïna, i que els seus dos dominis independents també presenten característiques de Cu-tioneïna.
8. Les característiques de preferència metàl·lica de mMT3 concorden amb la seva doble funcionalitat: d'una banda té un lloc d'unió preferencial per al Zn(II) que seria d'utilitat per segrestar aquest metall en les neurones que acumulen Zn(II); d'altra banda, l'afinitat superior per al Cu(I), característica de Cu-tioneïna, permetria la protecció del cervell en impedir que s'hi acumulés aquest metall.
9. S'han incorporat les isoformes mMT2 i mMT3 en la classificació global de les MTs proposada pels nostres grups de treball. La isoforma mMT2 és una MT intermèdia que es situa entre una MT d'au (ckMT1) i una MT de crustaci (MTH), ambdues MTs intermèdies. La isoforma mMT3 és una Cu-tioneïna que es situa entre una MT vegetal (QsMT) i la isoforma de Cu del cargol (HpCuMT), que són clarament Cu-tioneïnes.

## **6. MATERIALS I MÈTODES**



## 6. MATERIALS I MÈTODES

En el present capítol s'explicaran els mètodes utilitzats en aquesta Tesi per tal de sintetitzar les metal·lotioneïnes recombinants com a complexos metàl·lics amb diferents elements de transició per estudiar-ne així les seves preferències de coordinació metàl·lica.

Aquesta secció es divideix en dos apartats, un primer on s'indiquen les tècniques d'enginyeria genètica realitzades al Departament de Genètica de la Universitat de Barcelona, i un segon apartat on hi ha explicats els mètodes espectroscòpics i espectromètrics que han servit per determinar les característiques de coordinació metàl·lica de les proteïnes. Aquestes anàlisis han estat efectuades al Servei d'Anàlisi Química del Departament de Química de la Universitat Autònoma de Barcelona i als Serveis Científico-Tècnics de la Universitat de Barcelona.

## 6.1 ENGINYERIA GENÈTICA

Per realitzar l'estudi de proteïnes és necessari tenir-ne una gran quantitat, ja sigui a partir de la purificació del pèptid des d'òrgans o l'organisme sencer, la síntesis química en fase sòlida o bé, produint-ne en bacteries recombinants. Cadascun d'aquests mètodes té avantatges i desavantatges. Així, la utilització de proteïna nativa implica nombrosos passos d'aïllament llargs i costos, i se n'obté poca quantitat, sovint amb un grau de puresa baix per les anàlisis que es desitgen fer. La síntesis química permet aconseguir una mostra amb una puresa idònia i en gran quantitat, però, en el nostre cas, l'elevat nombre de Cys en l'estructura primària de les metal·lotioneïnes les fan molt susceptibles a l'oxidació. La síntesis de proteïnes recombinants permet obtenir-ne una gran quantitat i a elevats nivells de puresa. La metal·lació de la proteïna es dona en l'interior de la cèl·lula, obtenint-se una proteïna recombinant equivalent a la nativa.

En aquest treball s'han sintetitzat les metal·lotioneïnes del mamífer *Mus musculus*, el ratolí comú, a partir de cèl·lules d'*E. coli* transformades amb un vector d'expressió induïble que conté la seqüència de DNA per expressar el gen desitjat.

### 6.1.1 Síntesi de segments de DNA per PCR

La PCR (de l'anglès *Polymerase Chain Reaction*) és una tècnica posada a punt l'any 1986 per Kary Banks Mullis (Premi Nobel de Química el 1993). Aquesta tècnica permet obtenir una gran quantitat de còpies d'un fragment de DNA gràcies a la propietat de l'enzim DNA polimerasa per copiar (replicar) molècules de DNA.

Material necessari per a la PCR:

- **DNA "motlle"**: DNA de doble cadena a partir del qual s'amplifica la regió desitjada.
- **Primers o "encebadors"**: oligonucleòtids dissenyats de manera que determinen la part a amplificar del total del DNA "motlle". Són complementaris a una de les cadenes originals del DNA. Poden incorporar una diana per a un enzim de

restricció que permetrà clonar posteriorment el producte de la PCR en el plasmidi necessari per a l'expressió.

- **Taq polimerasa:** DNA polimerasa, enzim termostable que realitza la còpia del DNA a partir de *primers* prèviament hibridats a la seqüència nucleotídica. S'ha utilitzat la GoTaq Flexi DNA Polymerase de Promega
- **dNTP:** desoxinucleòtids trifosfat. Són el substrat necessari per polimeritzar el nou DNA: dATP, dCTP, dGTP i dTTP.
- **MgCl<sub>2</sub>:** ions de Mg<sup>2+</sup>. Cofactor de la *Taq* polimerasa. En excés disminueix l'efectivitat de la PCR, mentre que a baixes concentracions n'augmenta l'especificitat. S'ha utilitzat el Magnesium Chloride Solution de Promega.
- **Solució tampó o *buffer*:** manté el pH adequat per al funcionament de la *Taq* polimerasa. Utilitzem el Green GoTaq Flexi Buffer o bé el Colorless GoTaq Flexi Buffer de Promega.
- **Aigua ultra pura (miliQ).**

Per evitar errors de pipeteig, es prepara una solució mare o *mix* (Taula 18) amb l'aigua, els dNTPs, els dos *primers*, el magnesi, el *buffer* i la polimerasa, en quantitat suficient per després poder al·liquotar en tubs on es farà la reacció individualment. El DNA motlle es posa separatament en cada tub, amb un volum total de 25 µL.

Agent	Concentració final (en 25 µL)
Primer 5'	0.1 – 1 µM
Primer 3'	0.1 – 1 µM
dNTPs	0.2 mM de cada
Buffer	1x
Mg <sup>2+</sup>	1 – 4 mM
Taq DNA polimerasa	0.5 – 1 Unitat
H <sub>2</sub> O miliQ	Fins a 25 µL
DNA motlle	0.01 – 1 ng (plasmidi) 0.1 – 1 µg (genòmic)

**Taula 18:** Condicions de PCR.

La PCR es basa en la repetició d'un cicle de tres passos (Figura 85):

1. **Desnaturalització** de la doble cadena del DNA
2. **Hibridació** del *primers* en el DNA motlle
3. **Elongació** per acció de la polimerasa a partir de l'encebador.

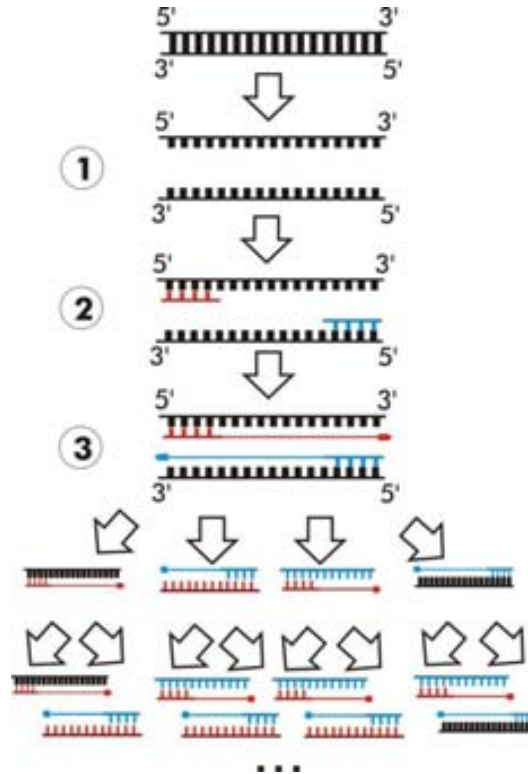


Figura 85: Esquema del cicle de PCR.

La desnaturalització es realitza a altes temperatures (95 °C). És un pas molt important ja que si no es desnaturalitza completament el motlle la quantitat final de producte de PCR serà molt més baixa.

Seguidament, la temperatura disminueix i això permet la renaturalització del DNA i, per tant, que els *primers* hibridin als llocs complementaris. La temperatura d'hibridació varia en funció de les característiques dels *primers*. Una temperatura més alta implica una unió més específica, mentre que una temperatura massa baixa produirà unions inespecífiques i, per tant, amplificacions finals no vàlides. Aquesta temperatura sol ser de 5 °C inferior a la temperatura de fusió o  $T_m$  del *primer* (la temperatura on la meitat dels dúplex formats es dissocien, indica l'estabilitat del dúplex DNA-*primer*).



En el tercer pas, la temperatura puja a nivells òptims per a la polimerasa (entre 70-75 °C) i aquesta comença a actuar i replicar el DNA a partir dels *primers*. El temps d'aquest pas varia segons la llargada del fragment a amplificar; es considera que es necessita un minut per uns 1000 bp.

Aquests tres passos es repeteixen unes 25-35 vegades, com més cicles, més quantitat de producte s'obté, ja que l'amplificació és exponencial: 1-2-4-8-16-32...

Finalment, es permet un darrer pas d'extensió de varis minuts per permetre a la polimerasa finalitzar totes les reaccions que estiguessin transcorrent.

Els productes de la reacció d'amplificació per PCR s'analitzen per electroforesis en gel d'agarosa al 1% (Figura 86).

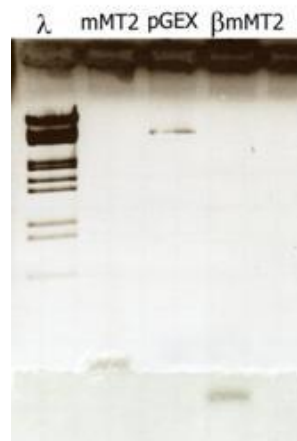


Figura 86: Gel d'agarosa.

### 6.1.2 Clonació i transformació bacterianes. Seqüenciació del DNA.

#### 6.1.2.1 EL SISTEMA D'EXPRESSIONIÓ pGEX

El vector d'expressió utilitzat en aquest treball és el pGEX-4T-1 de GE Healthcare (Figura 87), triat gràcies a les seves característiques que el fan idoni per a la producció de MTs recombinants:

- **Origen de replicació (ORI, pBR322):** permet la replicació del plasmidi de forma independent al genoma del bacteri.
- **Gen de resistència a l'ampicil·lina (Amp<sup>r</sup>):** codifica per la β-lactamasa, un enzim que degrada l'antibiòtic ampicil·lina permetent que les cèl·lules que hagin incorporat el vector siguin resistents a aquest antibiòtic.

- **Promotor induïble** (Ptac) per a l'activació de l'expressió del gen o cDNA clonat.
- **Gen Lacl**: codifica un inhibidor que s'uneix al Ptac i evita l'expressió de la proteïna tant que no hi ha l'inductor IPTG (isopropil- $\beta$ -D-tio-galactòsid). Quan en el medi hi ha IPTG, s'unirà a l'inhibidor de manera que el promotor quedarà lliure i s'expressarà el gen.
- **Polylinker**: regió del vector on hi ha una gran quantitat de dianes d'enzims de restricció, que permetran tallar el vector i clonar-hi l'insert.
- **Gen de la proteïna GST**: contigu al promotor Ptac i abans del polylinker, de manera que en activar-se el promotor, s'expressarà una proteïna de fusió GST-MT. Aquesta proteïna de fusió té unes característiques que permetran aïllar posteriorment la MT desitjada, tal i com s'explicarà en l'apartat 6.1.3.

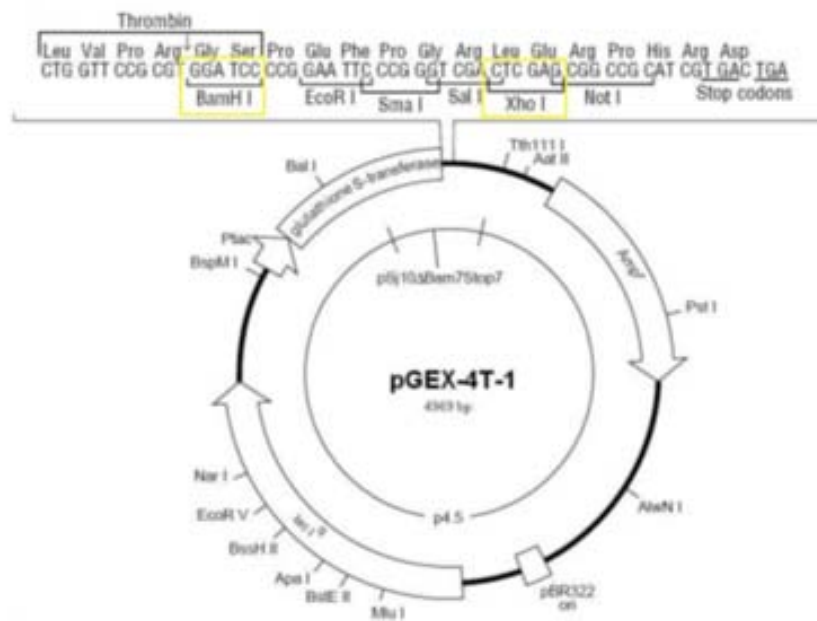
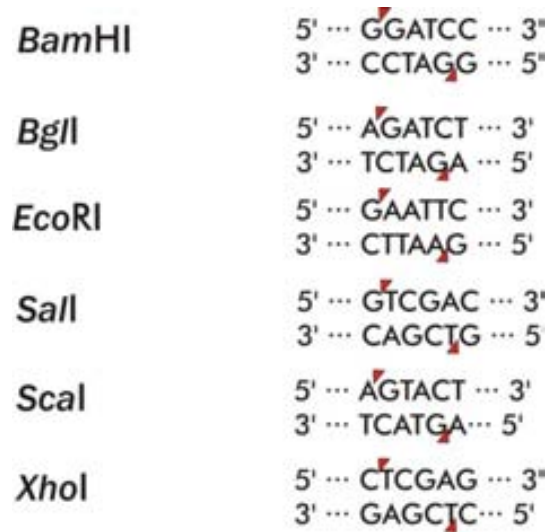


Figura 87: Vector PGEX-4T-1.

### 6.1.2.2 PREPARACIÓ DEL VECTOR I L'INSERT

Per tal de poder inserir el gen o cDNA en el vector, és necessari preparar les seqüències de DNA de manera que els seus extrems siguin *cohesius*, és a dir, produïts per talls en la doble cadena formant un biaix (Figura 88). D'aquesta manera, les dues seqüències s'uniran per complementarietat en el lloc desitjat i en la direcció idònia.

Aquesta operació la realitzen els **enzims de restricció**, enzims d'origen bacterià i que tallen en una seqüència específica (diana).



**Figura 88:** Seqüències de reconeixement i punts de tall dels enzims de restricció utilitzats en aquesta Tesi. El nom dels enzims prové de l'espècie de bacteri d'on es originari l'enzim, per exemple, *EcoR*-I és originari de *Escherichia coli*.

La digestió es porta a terme en unes condicions específiques per a cada tipus d'enzim de restricció. Per això és necessari precipitar separatament l'insert obtingut de la PCR i el vector. La precipitació del DNA es realitza amb el kit de co-precipitació seeDNA de GE-Amersham Biosciences. Aquest kit utilitza Acetat de Sodi com a agent precipitador del DNA i una molècula de color rosat, que precipitarà conjuntament, permetent visualitzar el DNA.

En alguns casos s'ha optat per purificar el DNA de la PCR directament des del gel d'Agarosa, utilitzant el kit QIAEX II de Qiagen. Aquest segon tipus de purificació és utilitzada en situacions especials, com és ara l'aparició de bandes no específiques d'amplificació de la PCR. Això permet retallar la banda desitjada i purificar únicament aquest fragment, evitant la possible clonació de fragments de DNA no desitjats.

El fragment serà inserit en el vector entre les dianes de restricció *Bam*HI i *Xho*I. Per aquesta raó, es digereix el vector amb aquests enzims. Pel que fa a l'insert, s'utilitzen els mateixos enzims de restricció, excepte quan s'han detectat dianes per a *Bam*HI a l'interior de la seqüència a clonar. Quan hi ha aquestes dianes internes, es fa la digestió amb *Bgl*II, enzim que reconeix una seqüència de DNA diferent però que

deixa extrems cohesius idèntics als de *Bam*HI (Figura 88). Tots els enzims de restricció utilitzats són de New England Biolabs. Inc. Cada enzim de restricció té unes característiques pròpies pel que fa a les unitats necessàries per digerir una mateixa quantitat de DNA, la temperatura idònia i el temps de digestió, el tipus de solució tampó que utilitza, si s'ha d'afegir BSA a la reacció i, finalment, si necessita o permet inactivació per calor.

*Bam*HI i *Bgl*II s'utilitzen amb les solucions tampó comercials NEBuffer 3, a 37 °C. *Xho*I, en canvi, es fa servir amb el NEBuffer 2. Aquesta diferència en el *buffer* emprat, ha condicionat que, per a un òptim procés, la digestió s'hagi fet separatament, enlloc de co-digerir amb *Bam*HI/*Bgl*II i *Xho*I al mateix temps. A més, *Bam*HI i *Xho*I requereixen ser suplementats amb BSA, i *Bgl*II no.

Una vegada acabada la digestió de restricció del vector, es desfosforil·la, evitant així la seva recircularització posterior durant la reacció de lligació. La desfosforil·lació es realitza amb l'enzim Antarctic Phosphatase de New England BioLabs, que elimina un grup fosfat de l'extrem 5' de les cadenes nucleotídiques. Aquest pas, si bé no és imprescindible, disminueix la quantitat de clons sense insert que podrien transformar les cèl·lules. L'esquema dels processos explicats es pot veure en la Figura 89.



**Figura 89:** Esquema del procés de digestió i desfosforil·lació anteriors a la clonació de l'insert en el vector.

### 6.1.2.3 INSERCIÓ DE LA SEQÜÈNCIA EN EL VECTOR (CLONACIÓ)

La inserció i unió finals del fragment desitjat en el vector es catalitza per a uns enzims anomenats lligases. Aquests enzims uniran entre sí les molècules de DNA que tinguin els extrems cohesius i compatibles.

Per realitzar una lligació, es precipiten conjuntament els DNA del vector i de l'insert digerits i es prepara la solució de lligació necessària segons el kit DNA Ligation Kit Ver 2.1 de Takara Bio Inc.

Un cop lligat, s'eliminen els plasmidis que s'hagin recircularitzat sense insert mitjançant una digestió amb un enzim de restricció que només es trobi en els vectors que no hagin incorporat l'insert, per exemple, *EcoRI*. Aquesta digestió linealitzada aquestes molècules, i s'ha de tenir en compte que el DNA lineal és molt ineficaç per a la transformació de les cèl·lules bacterianes.

### 6.1.2.4 OBTENCIÓ DE COLÒNIES BACTERIANES POSITIVES

#### Bactèries competents

La introducció d'un plasmidi en una cèl·lula bacteriana necessita que aquesta sigui *competent*, és a dir, que la paret bacteriana sigui permeable i permeti l'entrada de DNA. Per tal que les cèl·lules adquireixin aquesta propietat han de seguir un tractament previ amb  $\text{CaCl}_2$  o altres cations com  $\text{K}^+$ ,  $\text{Rb}^+$  o  $\text{Mn}^{2+}$ . En aquest treball s'ha utilitzat el següent protocol per obtenir cèl·lules competents:

- S'inocula un tub de 3 mL de medi LB amb la soca desitjada per tal que creixi a 37 °C, en agitació tota la nit.
- L'endemà, es dilueixen 2 mL d'aquest cultiu en 100 mL de LB i es deixa créixer durant 2 o 2.5 h fins que arribi a una  $\text{OD}_{550}$  de 0.4.
- Es posen els cultius en gel i es centrifuga en tubs FALCON de 50 mL durant 5 minuts a 2500 rpm a 4 °C.
- Sempre treballant en gel, es resuspèn el pelet en 15 mL de la solució TfBI. Després de reposar uns 5 minuts en gel, es centrifuga uns altres 5 minuts igualment a 2500 rpm a 4 °C.

- Ara es resuspèn de nou molt suaument amb la pipeta en 2 mL de la solució TfbII.
- Es preparen alíquotes de 100 µL en eppendorf estèrils, que s'introdueixen immediatament en nitrogen líquid. Es guarden en el congelador de -80 °C fins a la seva utilització.

La preparació de les cèl·lules competents té una dificultat afegida pel que fa a la contaminació dels stocks. Aquestes soques encara no tenen en el seu interior el plasmidi que utilitzem i que els dona la resistència a antibiòtics, de manera que els cultius es realitzen sense ampicil·lina, amb el risc suplementari de fer-hi créixer un bacteri o fong no desitjats. Per aquest motiu és encara més important treballar en condicions d'esterilitat.

### Transformació cel·lular

S'anomena transformació cel·lular a la introducció de DNA exogen en bacteris. En aquest treball s'insereix el plasmidi pGEX recombinant que conté el cDNA del gen de la metal·lotioneïna a produir.

Les soques d'*E. coli* utilitzades en la transformació són DH5α i BL21. La soca DH5α té inactivada una endonucleasa intracel·lular, impedit així la degradació del DNA plasmídic en les minipreps. La soca BL21 és defectiva per certes proteases, que podrien degradar la metal·lotioneïna durant l'expressió i purificació. Aquesta soca s'utilitza, doncs, per a la producció de proteïnes recombinants.

El procediment per a la transformació és el següent:

- Es descongela una alíquota de cèl·lules competents i es posen en gel durant 5-10 minuts.
- S'hi afegeix 0.05-1 µg del plasmidi, barrejant lleument i s'incuba durant 20 minuts.
- Es força l'entrada del DNA amb un xoc tèrmic de 90 segons a 42 °C i tot seguit 2 minuts en gel.
- S'hi afegeix 1 mL de medi de cultiu LB i s'incuba durant 45 minuts a 37 °C.

- Tot seguit, s'escampa tot el contingut en una placa de medi LB amb ampil·lina que s'incubarà durant tota la nit a 37 °C.

#### Comprovació de colònies positives

Després de la transformació, les colònies que creixen en la placa són les provinents de les cèl·lules que han introduït el plasmidi, sigui el vector de clonació pGEX no recombinant o amb l'insert, ja que totes hauran adquirit la resistència a l'antibiòtic.

Per tal de poder diferenciar quines d'aquestes colònies contenen el vector amb el cDNA de la metal·lotioneïna, es realitza una extracció del DNA plasmídic de les colònies i es fa una anàlisi de restricció que permet distingir els plasmidis amb l'insert d'aquells que no l'han incorporat.

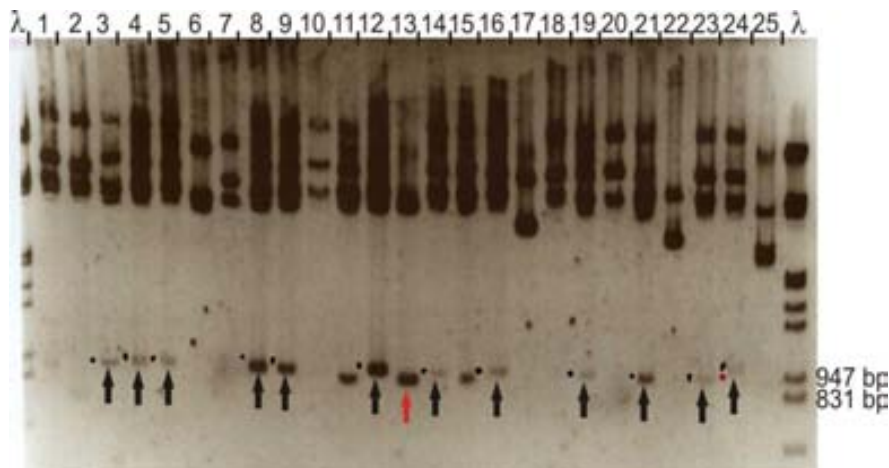
El protocol d'extracció del DNA plasmídic o miniprep és el que segueix:

- S'inocula cadascuna de les colònies en 3 mL de LB amb 12 µL d'ampil·lina (a 25 mg/mL) i es deixa créixer tota la nit a 37 °C en agitació.
- Es transfereix 1.5 mL de cultiu en eppendorf i es centrifuga durant un minut a 13000 rpm. Es descarta el sobrenedant.
- Es resuspèn el pellet amb el medi que ha quedat, agitant fort amb el vòrtex i s'afegeixen 400 µL del tampó TENS. S'agita de nou.
- S'afegeixen 200 µL de NaOAc 3 M a pH 5.2 i es torna a agitar fortament per tot seguit centrifugar 10 minuts a 13000 rpm.
- Es transfereix el sobrenedant en un nou tub i s'afegeix 1 mL d'etanol absolut. Es barreja per inversió i es centrifuga de nou durant 5 minuts a 13000 rpm.
- Es descarta el sobrenedant i es renta el pellet amb 500 µL d'etanol al 70% en volum. Es centrifuga durant 2 minuts a 13000 rpm.
- Es descarta el sobrenedant i s'asseca el pellet en un bany sec a 65 °C.

- Finalment, es resuspèn el pellet en 50  $\mu\text{L}$  de TE a pH 8.0 amb 1  $\mu\text{L}$  de RNAsa comercial de la casa Roche.

Un cop es té el cDNA, s'en fa una digestió amb l'enzim de restricció *ScaI*. Aquest enzim té dues dianes en el vector de clonació pGEX externes al *polylinker*, obtenint-se així un fragment de 4117 bp i un altre que farà 852 bp + la longitud de l'insert. En el cas que el clon sigui de pGEX sense insert, els fragments faran 4117 bp i 852 bp.

Per una electroforesis en gel d'agarosa a l'1% es poden diferenciar els clons sense insert dels potencialment positius, és a dir, que contenen el plasmidi amb l'insert, com es veu en la Figura 90.



**Figura 90:** Gel d'agarosa d'una anàlisi de restricció.  $\lambda$ : marcador de pes molecular Lambda DNA/*EcoRI+HindIII* Marker, 3 de Fermentas. 1 a 12 i 14 a 23: digestió amb *ScaI* de l'extracció de cDNA de les colònies obtingudes en transformar cèl·lules d'*E. Coli* DH5 $\alpha$  amb el producte de la lligació de pGEX amb  $\beta$ mMT2. 13: digestió del vector pGEX sense insert. 24 i 25: digestió amb *ScaI* de l'extracció de cDNA de les colònies obtingudes en transformar cèl·lules d'*E. Coli* DH5 $\alpha$  amb el producte de la lligació de pGEX amb mMT2. Les fletxes negres verticals indiquen els clons potencialment positius en relació amb el pGEX sense insert (fletxa vermella vertical).

#### 6.1.2.5 SEQÜENCIACIÓ I TRANSFORMACIÓ EN LA SOCA DE PRODUCCIÓ FINAL

L'últim pas per determinar si la clonació ha estat correcta és la seqüenciació dels clons potencialment positius triats en la digestió per *ScaI*. L'anàlisi de la seqüència permet veure si l'insert coincideix amb el cDNA codificant per la proteïna que es vol produir.

Per això, es fa una PCR de seqüenciació seguint el protocol del kit Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit d'Applied Biosystem. S'utilitza el seqüenciador



de DNA per electroforesi capil·lar *ABI Prism 3700 Applied Biosystems* del Servei de Genòmica dels Serveis Científic-Tècnics de la UB.

Els plasmidis dels quals la seqüenciació ha indicat una correcta construcció de fusió s'utilitzaran per a la transformació a la soca BL21, aquesta soca és on es durà a terme la producció de la proteïna.

### **6.1.3 Síntesi i purificació de proteïnes recombinants.**

#### 6.1.3.1 TEST DE PRODUCCIÓ. SÍNTESI A ESCALA ANALÍTICA

##### Cultiu

Els clons de BL21 que contenen el vector d'expressió pGEX recombinant, s'han de verificar per a la producció de la proteïna abans de passar a gran escala. Per això, es realitza un cultiu de 3 mL del clon a verificar i, com a control negatiu, un altre clon que contingui el vector sense insert.

Protocol a seguir:

- Pre-cultiu durant la nit en LB líquid amb ampicil·lina. L'endemà es fa una dilució al 10% d'aquest pre-cultiu en 3 mL de LB amb ampicil·lina.
- Es deixa créixer durant aproximadament 1.5 h. El cultiu ha d'estar en creixement exponencial ( $OD_{550}=0.4-0.5$ ).
- S'hi afegeix IPTG 100 mM, per tal que estigui a una concentració final de 100  $\mu$ M. L'IPTG induirà el promotor del gen la GST, de manera que en els clons amb insert es produirà la proteïna de fusió GST-MT, mentre que en els clons sense insert es sintetitzarà únicament GST.
- Després d'induir, es deixa créixer el cultiu durant 3 h. Eventualment, trenta minuts després de l'IPTG, s'hi afegeix una sal metàl·lica si cal, en una concentració de 300  $\mu$ M en el cas de Zn i Cd, o 500  $\mu$ M si es tracta de Cu. En aquests casos, la MT s'obtindrà com el corresponent complex metàl·lic.

### Obtenció i preparació de la mostra per a electroforesi

Per tal de purificar la proteïna del cultiu bacterià, el protocol a seguir és el següent:

- Es centrifuga durant un minut i es descarta el sobrenedant. S'hi afegeixen 50 µL de solució salina PBS 1x fred i es resuspèn el pellet amb el vòrtex.
- Es soniquen les cèl·lules i es centrifuga durant 10 min per tal de recuperar el sobrenedant.
- Es prepara el tampó de càrrega amb un 5% (w/V) de β-mercaptoetanol (agent reductor). El tampó de càrrega conté un tint, un agent fluïdificant de la solució i un detergent que conferirà càrrega negativa a les proteïnes de forma proporcional al seu pes molecular: SDS (Sodium-Dodecil-Sulfat)
- Es disposa cada mostra en una proporció 15 µL : 5 µL; mostra : tampó de càrrega, i es posa durant 5 min a 100 °C.

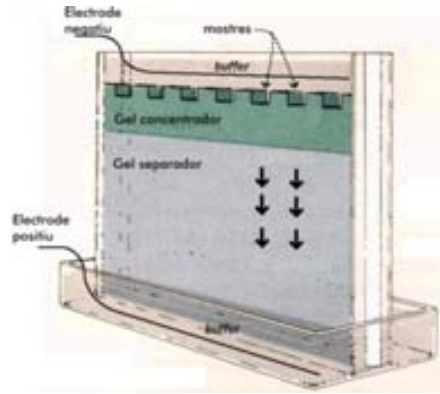
Les mostres estan ara preparades per a l'electroforesi.

### Electroforesi en gel de poliacrilamida-SDS

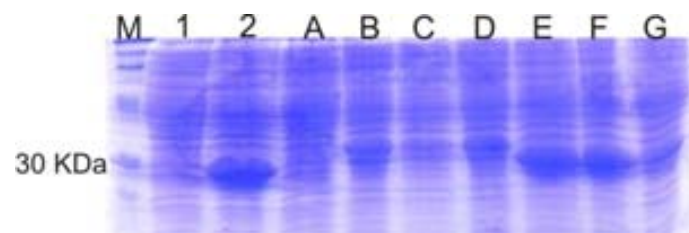
L'electroforesi en gel de poliacrilamida-SDS (*SDS-Page*) utilitza un gel amb dues fases. Una primera actua com concentrador de la mostra, a pH neutre i permet l'acumulació de la mostra abans d'entrar al gel separador, de pH bàsic, que separa els polipèptids proporcionalment al seu pes molecular.

S'instal·la el gel una vegada polimeritzat en la cubeta d'electroforesi i es carreguen les mostres. Finalment s'hi afegeix el tampó d'electroforesi i es connecta la font de voltatge (Figura 91). L'electroforesi es fa córrer a 200 V fins que la banda del blau de bromofenol arriba a la base del gel. En aquest moment, s'atura l'electroforesi i es col·loca el gel a tenyir amb Blau de Coomassie durant tota la nit.

L'endemà es destenyeix per tal de poder diferenciar les bandes de les proteïnes, com es pot veure en la Figura 92.



**Figura 91:** Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS, les fletxes indiquen el desplaçament de les proteïnes en posar-hi el camp elèctric.



**Figura 92:** Gel de poliacrilamida-SDS. M: marcador de pes molecular (SDS-Page Standard #161-0318 de Bio-Rad). 1 i 2: extracte proteic dels cultius cel·lulars transformats amb el vector sense insert, induïts (2) i no induïts (1). A, B, C i D: extracte proteic dels cultius cel·lulars dels transformats per produir la mMT2 sencera; sense induir (A), induït (B), induït i amb Zn afegit al cultiu bacterià (C), induït i amb Cu afegit(D). E, F i G: extracte proteic dels transformats per produir el domini  $\beta$  de la mMT2; sense induir (E), induït (F), induït i amb Cu afegit al cultiu (G).

### 6.1.3.1 PRODUCCIÓ I PURIFICACIÓ DE PROTEÏNES RECOMBINANTS

#### Cultiu cel·lular

Es prepara un pre-cultiu durant la nit en LB líquid amb ampicil·lina, en agitació (250 rpm). L'endemà es fa una dilució al 10% d'aquest pre-cultiu en 5 L de cultiu. Per als cultius amb una oxigenació normal es treballa amb volums parcials d'1 L, a 37 °C i 230 rpm. Per als cultius amb una baixa oxigenació es treballa amb volums parcials d'1.5 L, a 37 °C i 150 rpm.

Es fa créixer el cultiu durant 1.5 h. En aquest temps les cèl·lules es troben en fase de creixement exponencial, fins a una  $OD_{600} = 0.6$ .

S'afegeix l'inductor de l'expressió: IPTG (1 mL/L d'una concentració a 100 mM, per tal d'obtenir una concentració final de 100  $\mu$ M).

Al cap de 30 min de creixement en les mateixes condicions, s'afegeix el metall amb el qual es vol obtenir complexada la metal·lotioneïna (1 mL/L d'una concentració de 300 mM per a ZnCl<sub>2</sub> o CdCl<sub>2</sub>, o bé 500 mM per a CuSO<sub>4</sub>).

Es deixa créixer durant 3.5 h a 37 °C en agitació.

### Purificació

Es centrifuga el cultiu durant 7 min a 7700 rpm, a 4 °C. En cas necessari, aquest pellet es pot congelar a -20 °C per continuar la purificació més endavant. La congelació del pellet cel·lular no comporta en la majoria dels casos cap modificació en els resultats obtinguts. Malgrat tot, en aquesta Tesi s'han observat canvis en certes produccions de la mateixa proteïna on la única diferència entre produccions era la congelació, o no, del pellet cel·lular.

Es resuspèn el pellet en 25 mL/L de PBS 1x. En l'exemple, s'utilitzarien 125 mL de PBS, en un vas de precipitats dins de glaç.

S'hi afegeixen 125 µL/L de β-mercaptoetanol, un agent reductor que evita l'oxidació de la proteïna.

Es sonica, sempre dins del gel, en polsos de 0.6 segons a potència 4, durant 8 minuts. Aquest pas trencarà les membranes cel·lulars alliberant així la proteïna.

Es centrifuga en tubs de Jara 45 min a 12000 rpm a 4 °C, de manera que les membranes cel·lulars quedin en un pellet al fons del recipient, i les proteïnes, entre elles la proteïna de fusió (GST+MT), en la solució.

S'incuba el sobrenedant amb la matriu Glutathione Sepharose 4B, de GE Healthcare durant 1 h, en moviment suau. La porció GST s'unirà a la glutatió, permetent l'aïllament de la proteïna de fusió de la resta del medi cel·lular.

Després de la incubació es realitzen 3 rentats consecutius de la sefarosa de glutatió amb PBS 1x bombollejat amb argó (5 mL/L), per tal d'evitar l'oxidació de la proteïna. Un cop netajada i aïllada de les restes de medi cel·lular, la matriu de GSH-sefarosa es resuspèn en PBS 1x bombollejat amb argó (500 µL/L).

La suspensió s'incuba tota la nit amb trombina (25 µL/L) a 25 °C. Aquest enzim talla la proteïna de fusió, alliberant en solució la porció MT, al ser separada de la GST (el punt de tall està indicat en la Figura 87 del present capítol).

L'endemà es recull el sobrenedant, on hi haurà la MT produïda, i es concentra la mostra per centrifugació en Centripreps (Centrifugal Filter Units de Millipore), durant 20 minuts a 2500 rpm a 4 °C, per dues tandes.

#### 6.1.3.2 FPLC: FAST PROTEIN LIQUID CHROMATOGRAPHY

Per tal de separar la MT produïda de la trombina que ha servit per trencar la unió amb la GST i acabar de purificar-la completament, s'utilitza la tècnica de FPLC (de l'anglès *Fast Protein Liquid Chromatography*).

La cromatografia líquida de proteïnes permet separar proteïnes en una fase mòbil líquida. La fase estacionària pot ser líquida o sòlida. En la FPLC, la velocitat del solvent és controlada mitjançant bombes que assegurin un flux constant a l'interior de la columna.

Hi ha diversos tipus de columnes, segons l'estratègia de separació que es vol aplicar. Es tracta de tubs de diàmetre de varis mil·límetres que contenen petites partícules esfèriques de gel, la fase estacionària. La mostra s'injecta a la columna conjuntament amb un solvent o fase mòbil líquida. Els diferents components de la mostra s'adhereixen a les partícules o bé difereixen a través del gel en funció de les seves característiques, permetent així la seva separació.

Els diferents tipus de matriu permeten separar en funció de la mida (filtració en gel), la distribució de càrregues (intercanvi iònic), l'hidrofobicitat... En aquesta Tesi s'utilitza la columna Superdex 75 5/150 GL de GE Healthcare/Amersham Biosciences, de filtració en gel.

L'equip de FPLC (*ÄKTAmicro FPLC System de GE Healthcare*) que controla el flux d'aquesta columna consta de diferents mòduls, controlats per ordinador (Figura 93):

- **Bombes:** una o dues bombes que poden utilitzar-se de forma simultània per tal d'assegurar un flux i pressió constants de la fase mòbil a l'interior de la columna. Cada tipus de columna té unes condicions específiques.

- **Monitor:** Per a la mesura i control de l'absorció els UV, pH i conductivitat en la cromatografia. Consta d'una unitat de control, una unitat òptica associada a una làmpada, cel·les de detecció de flux i conductivitat, un sensor de temperatura i un elèctrode per la detecció del pH.
- **Detector UV:** Es regularà en funció del tipus de mostra en diferents paràmetres.
- **Mixer:** Per tal d'un millor control per les bombes, tots els eluents són barrejats en una cambra o mixer.
- **Vàlvula d'injecció:** Unida a un *loop*, aquesta vàlvula té tres posicions permetent el pas de la mostra del *loop* cap a la columna, la neteja del loop o la neteja de les bombes. La injecció es fa mitjançant una xeringa.
- **Col·lector de fraccions:** Permet establir un volum fix per fracció recol·lectada o per detecció automàtica de pics.
- **Restrictor de flux:** Genera una pressió de retorn constant per prevenir la formació de bombolles d'aire abans de la columna.



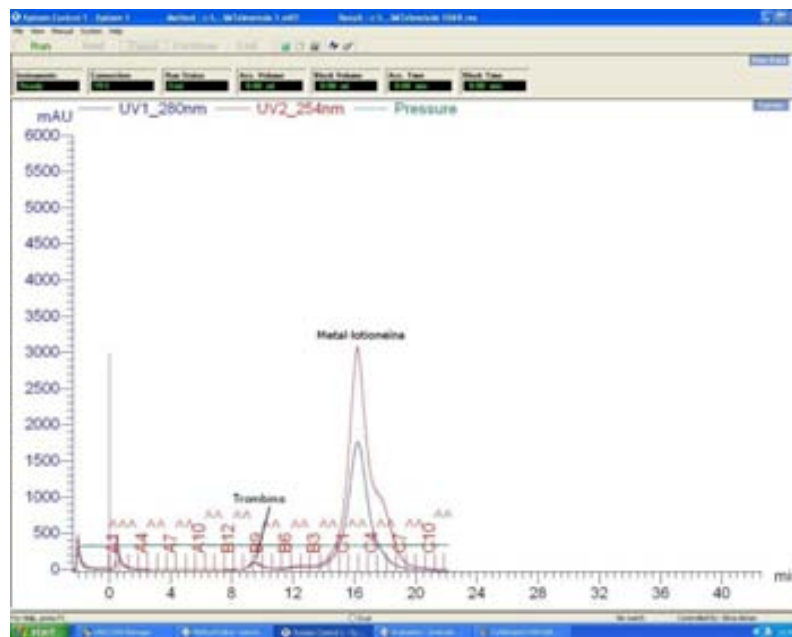
Figura 93: Equip de FPLC utilitzat per a la purificació de proteïnes.

Paràmetres utilitzats per a la purificació de proteïnes:

- **Quantitat de mostra:** En acabar de concentrar la preparació de MT, s'obtenen entre 0.4 i 0.6 mL. El *loop* d'inserció pot acollir fins un màxim d'1 mL.
- **Flux:** Constant, 0.5 mL/min
- **Pressió:** També constant, amb un màxim d'1.8 MPa.

- **pH:** determinat pel *buffer* o fase mòbil utilitzat (Tris-HCl o Tris-HClO<sub>4</sub> 50 mM) a pH 7.
- **Detecció dels UV:** Es parametren dues longituds d'ona, a 254 nm i a 280 nm, que permetran la detecció de proteïnes.

La mostra resultarà fraccionada tal com indiquen les gràfiques d'UV (Figura 94) i les fraccions que continguin MT seran ajuntades i després s'en faran alíquotes en tubs eppendorf i congelades a -80 °C fins a la seva utilització.



**Figura 94:** Captura de pantalla de la gràfica indicada per l'ordinador acoblat al FPLC.

#### 6.1.4 Solucions utilitzades

##### 6.1.4.1 PREPARACIÓ DE GELS D'AGAROSA

Dissoldre l'agarosa en TBE 1X en proporció 1% (w/V). S'ha d'escalfar per obtenir una dissolució completa, transparent.

Quan es comenci a refredar, l'agarosa anirà solidificant-se, de manera que ja es podrà posar en la cubeta d'electroforesi.

Un cop solidificat el gel, es carrega cada pouet amb la mostra de DNA i un marcador de pes molecular.

Es fa córrer el gel durant una mitja hora i es posa amb BrEt (agent intercalant que emet llum visible en incidir llum UV) per tal de poder fotografiar i comprovar la mida dels productes de la PCR.

#### 6.1.4.2 SOLUCIONS PER OBTENIR BACTERIS COMPETENTS

##### Solució TfBI

- 30 mM KOAc (agent antioxidant, s'uneix a proteïnes)
- 50 mM MnCl<sub>2</sub>
- 100 mM RbCl
- 10 mM CaCl<sub>2</sub>
- 15% (w/V) glicerol (impedeix la formació de cristalls en congelar els stocks)

s'ajusta el pH 5.8 amb HOAc 2N

##### Solució TfBI

- 10 mM MOPS (producte tampó)
- 75 mM CaCl<sub>2</sub>
- 10 mM RbCl
- 15% (w/V) glicerol

pH 7

Ambdues solucions es filtren amb MILLEX GS, 0.22 µm de MILLIPORE.

#### 6.1.4.3 SOQUES BACTERIANES UTILITZADES

*E. coli* DH5α: *fhuA2 Δ(argF-lacZ)U169 phoA glnV44 Φ80 Δ(lacZ)M15 gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17*

*E. coli* BL21: B F- *dcm ompT hsdS*(r<sub>B</sub>- m<sub>B</sub>-) gal [malB<sup>+</sup>]<sub>K-12</sub>(λ<sup>S</sup>)



#### 6.1.4.4 SOLUCIONS PER A LA PURIFICACIÓ DEL PLASMIDI (MINIPREP)

##### TENS

- 10 mM Tris-HCl (tampó)
- 1 mM EDTA (agent quelant)
- 0,5% (w/V) SDS (detergent)
- 0,1 M NaOH

##### TE

- 10 mM Tris-HCl
- 1 mM EDTA

#### 6.1.4.5 SOLUCIONS PER A L'ELECTROFORESI DE PROTEÏNES

##### PBS 1x

- 137 mM NaCl
- 2.7 mM KCl
- 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>
- 2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

ajustar amb NaOH a pH 7.4

##### Tampó de càrrega

- 60 mM Tris-HCl
- 10% (w/V) glicerol (fluidifica la solució)
- 2% (w/V) SDS (detergent que confereix una càrrega negativa a les proteïnes, proporcionalment al seu pes molecular)
- 0.1% (w/V) blau de bromofenol (marcador)

Tampó d'electroforesis

- 0.025 M Tris-HCl pH 8.3
- 0.192 M Glicina
- 0.1% SDS

Solució per destenyir el gel

- 15% Metanol
- 10% Àcid Acètic

6.1.4.6 GELS PER A L'ELECTROFORESI DE PROTEÏNES

Gel separador (12.5%)

Per a 5 mL totals:

- 2.085 mL d'acrilamida a 25 mg/mL (2-propenamida, polimeritza formant el gel)
- 1.25 mL de Tris-HCl a 1.5 M pH 8.8
- 50 µL de SDS al 10% (v/W)
- 50 µL d'APS al 10% (v/W) (persulfat amònic, agent oxidant, catalitza la polimerització de l'acrilamida juntament amb el TEMED).
- 5 µL de TEMED (tetrametiletilenediamina)
- 1.56 mL d'aigua

Gel concentrador (3.8%)

Per a 2.5 mL totals:

- 0.3 mL d'acrilamida a 25 mg/mL
- 0.62 mL de Tris-HCl a 0.5 M pH 6.8
- 25 µL de SDS al 10% (v/W)
- 25 µL d'APS al 10% (v/W)

- 2.5 µL de TEMED
- 1.46 mL d'aigua

#### 6.1.4.7 MEDI LB (LURIA-BERTANI) PER AL CULTIU BACTERIÀ

Preparar la meitat del medi LB que volem fer amb:

- 5 g/L d'extracte de llevat
- 10 g/L de bacto-triptona
- 10 g/L de NaCl

pH 7.3 ajustat amb NaOH 3M

Per exemple, per 5 L de medi LB, es preparen 2.5 L amb 25 g d'extracte de llevat, 50 g de bacto-triptona i 50 g de NaCl.

Es dilueix fins al volum final desitjat i s'autoclava 20 minuts.



## 6.2 QUÍMICA DE COORDINACIÓ

En la caracterització dels complexos metall-MT s'utilitzen, diferents tècniques que permeten determinar la integritat, concentració i estequiometria del complex o complexos metall-MT que conté la preparació bioproduïda. L'espectrometria de masses amb ionització per electroesprai o ESI-MS (*ElectroSpray Ionization – Mass Spectrometry*) permet comprovar la identitat de la MT i determinar la integritat de la cadena peptídica, l'existència de diferents espècies i la seva composició estequiomètrica exacta metall-MT. L'espectrometria d'emissió atòmica o òptica amb plasma acoblat per inducció o ICP-A(O)ES (*Inductively Coupled Plasma – Atomical(Optical) Emission Spectrometry*) permet determinar el contingut en sofre i en metall (cadmi, zinc, coure) de la mostra al mateix temps que es determina la concentració de la MT obtinguda per extrapolació de la quantitat mesurada de S.

Altres metodologies permeten estudis espectroscòpics del plegament de la proteïna per dicromisme circular o DC (*Circular Dichroism*) i dels cromòfors metall-proteïna presents en la mostra, mitjançant l'anàlisi de les seves absorcions en la franja de llum ultraviolada visible o UV-Vis.

L'anàlisi per ICP-OES s'ha realitzat en els Serveis Científico-Tècnics de la UB i la resta d'estudis s'han realitzat en el Servei d'Anàlisi Química del Departament de Química de la UAB. A continuació s'explicaran més detalladament els procediments seguits.

### 6.2.1 Mètodes espectromètrics

#### 6.2.1.1 ICP-OES (*INDUCTIVELY COUPLED PLASMA – OPTICAL EMISSION SPECTROMETRY*)

L'espectrometria d'absorció òptica amb plasma acoblat per inducció (ICP-OES), també anomenada ICP-AES (espectrometria d'absorció atòmica) és una tècnica que permet determinar la concentració d'un element concret en una mostra en solució. Dóna, per tant, informació qualitativa i quantitativa de la composició de la mostra.

L'aparell utilitzat en aquesta Tesi Doctoral és l'ICP model Polyscan 61E Thermo de Jarrel Ash.

Tots els components de la mostra es transformen en àtoms o ions mitjançant l'atomitzador (ICP o "flama"). En la Figura 95 es pot veure un esquema de l'atomitzador de plasma d'argó: la mostra s'injecta mitjançant un nebulitzador, a través del tub central de quars, on hi ha un flux d'argó de 0.3 a 1.5 L/min. La temperatura d'atomització és de 4000-6000 °C. A causa d'aquestes altes temperatures, es fa passar un corrent tangencial d'argó que fa un aïllament tèrmic.



**Figura 95:** Esquema de la flama d'argó de l'atomitzador.

Els ions interaccionen amb el camp magnètic oscil·lant de la bobina i es mouen en trajectòries circulars, formant el plasma de nucli no transparent, blanc brillant i intens. Aquest plasma té una emissió contínua on es superposa l'espectre de l'argó.

Quan els àtoms arriben al punt d'observació (uns 15-20 mm pel damunt del nucli de la flama), no queda aigua i hauran estat uns 2 min a altes temperatures. Els ions s'hauran atomitzat en un medi inert que permet augmentar el temps de vida i evitar la formació d'òxids. En aquest punt, els àtoms han guanyat energia i emeten llum d'una longitud d'ona característica. Per aquest motiu, aquesta tècnica també és coneguda com ICP-OES (per *Optic Emission*).

Els àtoms, en estat plasmàtic, són excitats emetent a una longitud d'ona que es pot detectar per a cadascun d'ells i que permet determinar d'aquesta manera els diferents components en una mateixa mostra. Els límit de detecció i les longituds d'ona

varien en funció de les característiques de l'aparell utilitzat, en el nostre cas han estat els que es mostren en la Taula 19.

Element	Longitud d'ona (nm)	Límit de detecció (ppm)
Sofre	182.040	0.2
Coure	213.856	0.05
Cadmi	228.802	0.05
Zinc	324.754	0.1

**Taula 19:** Límits de detecció i longitud d'ona del ICP-OES per als elements analitzats en aquest treball.

El contingut en S que es mesura en les mostres de MT inclou el S present en la proteïna (Cys i Met) així com el possible S inorgànic existent en forma de sulfur i que actua com a lligand no proteic en els agregats metall-MT. La mesura d'ICP pel mètode "convencional" permet calcular la concentració total de la MT a partir del coneixement de la seqüència de la proteïna sempre que els clústers metall-MT no incorporin lligands sulfur. En els casos en que aquests contenen sulfur àcid-làbil, aquesta mesura "convencional" es confronta amb l'obtinguda mitjançant l'ICP-OES "àcid", en el qual la mostra és prèviament incubada a 80 °C amb HClO<sub>4</sub> durant 30minuts per tal d'alliberar aquests ions sulfur en forma d'àcid sulfhídric gasós. La determinació del "millor àcid" per dur a terme aquesta incubació s'explica en l'Annex.

Per a cada mostra es realitzen, com a mínim, dues anàlisis d'ICP-OES duplicades, una de "convencional" i l'altra "àcida". Els tubs es tareu, i es pesa entre 100 i 250 µL de solució de cada proteïna. A continuació s'igualen els volums fins a 250 µL per tots els tubs amb el mateix *buffer* d'elució de FPLC (Tris-HCl o bé Tris-HClO<sub>4</sub> 50 mM). En aquest moment, en les mostres per a l'ICP "àcid" s'afegeixen 250 µL de HClO<sub>4</sub> pur i s'incuben com ja s'ha indicat anteriorment. Finalment, tots els tubs s'enrasen a 3 mL finals amb HNO<sub>3</sub> al 2% i es pesen per tal de calcular posteriorment la concentració de proteïna total.

Es preparen dues rectes de calibratge per tal d'extrapolar els valors obtinguts de cadascun dels metalls. Ambdues es realitzen mitjançant la preparació de patrons de diferent concentració a partir de patrons estandarditzats de 1000 ppm i afegint 250 µL del *buffer* corresponent de l'elució de la proteïna. En els patrons per a l'ICP "àcid" s'hi afegeix 250 µL del mateix HClO<sub>4</sub> concentrat utilitzat per a la incubació de les mostres.

Per a les rectes patró es necessita un matràs aforat de 20 mL per a la solució intermèdia (I) i 5 matrassos aforats de 10 mL per a cadascuna de les rectes, de 5 punts de patró (P0, P1, P2, P3 i P4 per als patrons d'ICP convencional i Pa0, Pa1, Pa2, Pa3 i Pa4 per als patrons d'ICP àcid).

La solució intermèdia es prepara amb els patrons de 1000 ppm que hi ha als Serveis Científico-Tècnics de la UB, amb 300  $\mu\text{L}$  de S, de Zn i de Cd, i 150  $\mu\text{L}$  de Cu. S'enrasa amb  $\text{HNO}_3$  el 2% i després es preparen els patrons com s'indica a la Taula 20. Un cop afegits els volums indicats de cada solució, s'enrasa amb  $\text{HNO}_3$  al 2%.

	TRIS ( $\mu\text{L}$ )	$\text{HClO}_4$ ( $\mu\text{L}$ )	I (mL)	Zn, Cd, S (ppm)	Cu (ppm)
P0	250	0	0	0	0
P1	250	0	0.2	0.3	0.15
P2	250	0	0.5	0.75	0.375
P3	250	0	1	1.5	0.75
P4	250	0	2	3	1.5
Pa0	250	250	0	0	0
Pa1	250	250	0.2	0.3	0.15
Pa2	250	250	0.5	0.75	0.375
Pa3	250	250	1	1.5	0.75
Pa4	250	250	2	3	1.5

**Taula 20:** Volums de Tris, àcid i solució intermèdia necessaris per preparar les rectes patró normal i àcida. Les quantitats en ppm dels metalls són a títol indicatiu en haver-hi afegit el volum corresponent de la solució intermèdia (I).

Els tubs utilitzats per a les anàlisis d'ICP són de plàstic per a les mesures d'ICP convencional, i de vidre per a les mesures d'ICP àcid. Totes les solucions d'àcid utilitzades es troben als Serveis Científico-Tècnics de la UB.

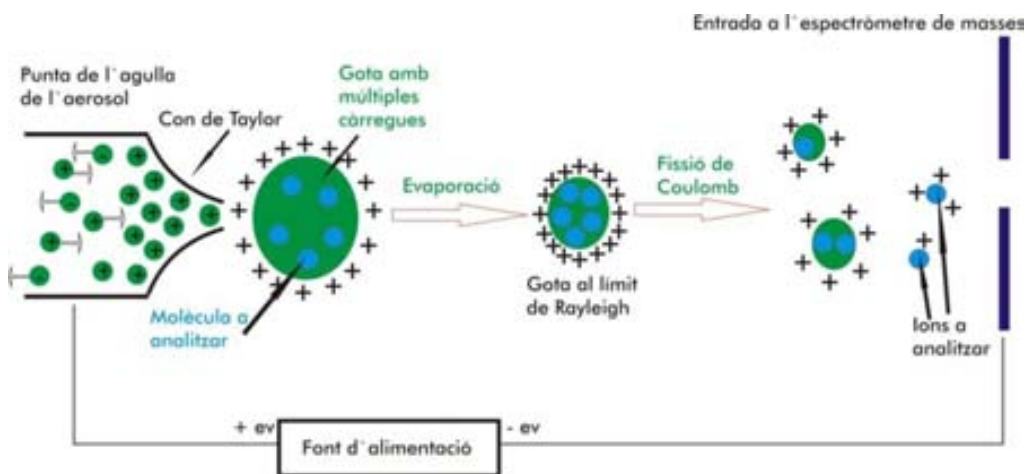
#### 6.2.1.2 ESI-MS-TOF (*ELECTROSPRY IONIZATION – MASS SPECTROMETRY – TIME OF FLY*)

L'espectrometria de masses amb ionització per electroesprai amb detecció per temps de vol (ESI-MS-TOF) permet determinar el pes molecular dels pèptids MT emprats en aquest treball, així com l'estequiometria de cadascuna de les espècies metall-MT presents en les mostres biosintetitzades o obtingudes *in vitro*. L'aparell que s'ha utilitzat en la realització d'aquesta Tesi Doctoral és Micro Tof-Q de Bruker. Els vials per a les mesures són proporcionats pel Servei d'Anàlisi Química del Departament de Química de la UAB.



La ionització de la mostra és molt suau, sense que es produeixi pèrdua dels ions metàl·lics dels complexos metall-proteïna. A més, aquesta tècnica garanteix que les molècules seran ionitzades sense fragmentar-les i amb una càrrega proporcional a la seva grandària. El primer pas és la ionització per electroesprai (ESI) de la mostra, que passa en flux constant amb un gas inert (com per exemple el nitrogen) a través d'un capil·lar i es crea un aerosol de microgotes en presència d'un fort camp elèctric, d'entre 1-5Kv (Figura 96). Per facilitar l'evaporació del solvent, s'augmenta la temperatura en aquesta "zona d'assecament". A mesura que el solvent s'evapora, la gota es deforma fins arribar al anomenat límit de Rayleigh, moment en el qual es produeix la fissió de Coulomb, que trenca la microgota en gotes encara més petites pràcticament monomoleculares i amb multiplicitat de càrregues.

Les molècules ionitzades passen a l'espectròmetre de masses, que analitza amb gran precisió la composició de les diferents molècules separant-les en funció de la seva relació massa/càrrega ( $m/z$ ) i temps-de-vol (TOF). L'analitzador de massa és la peça més flexible de l'espectròmetre, mitjançant un camp elèctric o magnètic afectarà la trajectòria o la velocitat de les molècules carregades, dirigint-les en funció de la seva massa i càrrega i "filtrant-les". El quadrupol es compon de 4 barres allargades en formació quadrada, connectades elèctricament entre elles en parells oposats o pols. Les molècules carregades, en passar entremig, si estan sintonitzades segons la freqüència aplicada, continuaran el seu camí cap el detector. En cas contrari, seran desviades.



**Figura 96:** Esquema de la ionització per electroesprai (ESI).

El detector registra la càrrega quan la molècula colpeja la superfície en el seu rang de lectura i produeix un espectre de massa en  $m/z$ . A partir de l'espectre, amb un càlcul simple es pot determinar el pes molecular i el nombre de metalls units en la proteïna.

En l'estudi de les metal·lotioneïnes, es treballa a dos valors de pH:

- pH 7: les espècies metall-MT es mantenen inalterades. S'utilitza com a fase mòbil en les proteïnes enllaçades a metalls divalents ( $Zn^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$ ) una mescla 95:5 d'acetat amònic/amoníac 15 mM : acetonitril a pH 7. Per a les Cu-MT, la fase mòbil és una mescla 90 : 10 d'acetat amònic/amoníac 15 mM : acetonitril a pH 7.
- pH 2.5: el Zn(II) i el Cd(II) ja no es mantenen units a la MT, observant-se únicament les espècies apo-MT (provinents de les formes Zn-/Cd-MT) i les espècies Cu-MT (provinents de les formes Zn,Cu-MT/Cu-MT). La fase mòbil és una mescla 95 : 5 d'àcid fòrmic : acetonitril a pH 2.4

Les condicions experimentals per analitzar les MT que contenen metalls divalents (Zn i Cd) són 20  $\mu$ L de proteïna injectada, flux de 30 - 50  $\mu$ L/min, voltatge del capil·lar de 3500 - 5000 V, temperatura de la zona d'assecamment de 90-110 °C, flux del gas d'assecamment de 6 L/min, rang de la finestra de detecció de 800 - 2000  $m/z$ .

Per a les Cu-MT, s'injecten entre 20 – 40  $\mu$ L de proteïna, amb un flux de 30 - 40  $\mu$ L/min, voltatge del capil·lar de 4000 - 4500 V, la temperatura de la zona d'assecamment no sobrepassa els 80 °C, el flux del gas d'assecamment és de 6 L/min i el rang de  $m/z$  de 800 – 2000.

Totes les mostres s'analitzen, com a mínim, dues vegades, per assegurar-ne la reproductibilitat.

## 6.2.2 Mètodes espectroscòpics

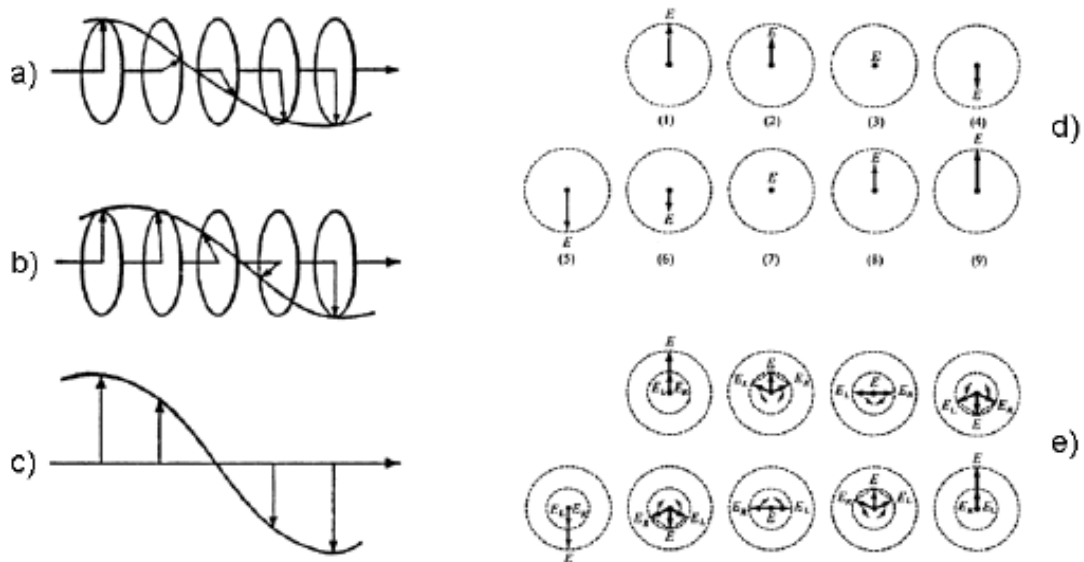
### 6.2.2.1 DC (CIRCULAR DICHROISM)

La tècnica del Dicroisme Circular (DC) es basa en l'estudi de l'absorció diferencial de la llum polaritzada per part de molècules òpticament actives. Els espectres de DC d'aquesta Tesi Doctoral s'han obtingut en l'espectropolarímetre Jasco-715 i han estat tractats amb el programa GRAMS/32.

La llum polaritzada en un pla pot ser definida com la superposició de dos feixos de llum polaritzada circularment en sentits oposats, un cap a la dreta ( $E_R$ ) i l'altre cap a l'esquerra ( $E_L$ ) d'igual amplitud i en fase (Figura 97). Quan aquesta llum plana polaritzada travessa una solució, es produiran varis efectes:

- Reflexió: es minimitza amb els aparells òptics adequats, i per tant no es té en compte.
- Refracció: disminució de la velocitat de la llum al passar per la solució. Si la solució no és absorbent ni quiral, en sortir, la llum reprendrà la seva velocitat i característiques de direcció i amplitud de propagació, o sigui, que no s'observarà activitat òptica.
- Absorció: disminució de l'amplitud del vector  $E$ , és determinada per el coeficient d'extinció molar,  $\epsilon$ .
- Rotació del pla de llum polaritzada o birefringència circular: aquest efecte es produeix únicament quan la solució presenta activitat òptica. Una molècula presentarà activitat òptica únicament si és quiral (dissimètrica). Una molècula és quiral quan no es pot superposar amb la seva imatge especular.

Quan la absorció per part d'una espècie òpticament activa és important, la solució presenta, a més, Dicroisme Circular i la llum surt de la solució polaritzada el·lípticament. Això és degut a la diferència d'absorció del feix polaritzat circularment cap a la dreta respecte el polaritzat cap a l'esquerra. La variació de la diferència entre ambdós coeficients d'extinció molar, dret ( $d$ ) i esquerre ( $e$ ),  $\Delta\epsilon = |\epsilon_d - \epsilon_e|$ , en funció de la longitud d'ona incident, constitueix la base dels espectres de DC.



**Figura 97:** Generació de la llum polaritzada en un pla (c) degut a la interacció d'un feix de llum circularment polaritzat cap a la dreta (a) i un altre cap a l'esquerra (b). Les fletxes horitzontals indiquen la direcció del vector de propagació i les perpendiculars a aquest vector representen la direcció espacial instantània del vector elèctric de cada feix. Els diagrames (d) i (e) mostren les combinacions dels vectors elèctrics. Com que els dos feixos de llum tenen la mateixa amplitud, el resultat de la seva superposició és un feix de llum polaritzada en un pla, ja que el vector  $E$  només oscil·la en el pla vertical.

L'activitat òptica que mostren les proteïnes és deguda a la presència de carbonis asimètrics i a l'asimetria pròpia de la cadena polipeptídica. La regió 170-300 nm es veu dominada per les contribucions de l'enllaç peptídic i ens dóna informació de l'estructura secundària de la proteïna. De fet, s'han estandarditzat espectres de DC que permeten determinar estructures secundàries característiques com hèlix  $\alpha$ , fulls  $\beta$  i girs. En la regió 220-500 nm s'observen les contribucions dels metalls de transició, essent molt útil per a l'estudi de les MTs. En el cas dels ions  $d^{10}$  com són  $Cd^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$  i  $Cu^+$ , les absorcions de DC entre 220 i 400 nm són degudes a Bandes de Transferència de Càrrega del lligand cap el metall (BTCLM). Així, el DC dóna informació directa de l'entorn de coordinació del metall, sent la intensitat de les bandes una indicació del grau d'estructuració o plegament de la proteïna al voltant dels centres metàl·lics.

### 6.2.2.2 UV-VIS (ULTRAVIOLET-VISIBLE)

L'espectroscòpia electrònica d'absorció en el rang de l'ultraviolat visible (UV-Vis) es basa en l'excitació electrònica d'una molècula en incidir-hi la radiació fotònica, provocant transicions electròniques que poden ser quantificades. Els espectres d'absorció d'aquesta Tesi Doctoral s'han obtingut en l'espectrofotòmetre HP8452A de Diode Array i han estat analitzats amb el programa GRAMS/32.

En els complexos de metalls de transició que tenen la capa "d" incompleta, aquesta tècnica és utilitzada per determinar l'estereoquímica de coordinació, els àtoms donadors i la geometria de coordinació al voltant d'un metall. Malauradament, com ja s'ha dit amb anterioritat, els ions metàl·lics emprats en aquest treball són tots ions  $d^{10}$  i per tant no donen lloc a absorcions d-d podent-se només observar bé les absorcions de la cadena polipeptídica, bé les bandes de transferència BTCLM abans esmentades. Els cromòfors més útils per a l'estudi de proteïnes són els residus aminoacídics aromàtics, que absorbeixen al voltant dels 280 nm, però la gran majoria de les MT no en contenen. A més, les MTs només presenten estructura tridimensional quan es troben unides a metall, per això la seva forma demetal·lada és totalment incolora i transparent a longituds d'ona superiors als 220 nm (que és la longitud d'ona d'absorció de l'enllaç peptídic). Quan la MT es coordina a centres metàl·lics, ho fa a través de les Cys, concretament dels seus grups tiolat. El Zn(II) i el Cd(II), en els seus complexos amb tiols, presenten habitualment geometries de coordinació tetraèdriques, mentre que el Cu(I) pot donar lloc a entorns de coordinació més diversos. A més, s'ha de tenir en compte que sovint es dona la coexistència de diverses espècies metall-MT en solució, amb diferents estequiometries, dificultant així la seva anàlisi espectroscòpica.

Per tots els motius esmentats, en l'anàlisi d'espectroscòpia UV-Vis de les mostres d'aquest treball s'ha considerat tant sols l'evolució del conjunt d'espectres que s'obtenen al llarg d'una valoració en la qual es van substituint progressivament els metalls inicialment enllaçats en la proteïna. Després es generen els espectres de diferència d'addicions de metall consecutives, que informen de la formació o desaparició de determinats cromòfors degut únicament a l'addició d'aquest darrer equivalent.

### 6.2.3 Utilització del DC i del UV-Vis en l'estudi de les MTs

L'estudi de la capacitat coordinant de les MTs implica no només l'anàlisi i caracterització dels complexos metall-MT biosintetitzats en el sistema d'expressió de *E. coli*, sinó que és necessari avaluar els processos d'intercanvi metàl·lic de les formes Zn-MT respecte al Cd(II) i al Cu(I). Un altre tipus d'estudi habitual és l'acidificació de les formes Cd-MT i la seva posterior reneutralització per observar els canvis estructurals produïts en la proteïna així com el fet que la proteïna aconseguixi de nou el mateix replegament inicial o no. Finalment, en les proteïnes que contenen Cd<sup>2+</sup> i lligands sulfur s'ha estudiat la variació dels espectres de DC de les preparacions bioproduïdes al llarg del temps.

Aquests estudis es monitoritzen per DC i UV-Vis. Les dues tècniques en conjunt, a més d'estudis d'ESI-MS en diferents punts dels mateixos, permeten estudiar i descriure la participació dels metalls en la formació dels agregats metall-MT i el seu grau d'estructuració ja que l'UV-Vis (i els espectres de diferència) dóna informació sobre l'entrada i sortida dels metalls d'aquests agregats, i el DC avalua els efectes sobre l'estructuració de la proteïna.

#### 6.2.3.1 VALORACIONS DE LES FORMES Zn-MT AMB Cd(II) I Cu(I)

Es duen a terme a pH 7.0 a 25 °C, sota atmosfera d'argó en una cel·la de quars d'1 cm de pas de llum, amb tap. La proteïna es troba en una concentració d'entre 10 i 20 µM, a la qual s'hi afegeixen, d'un en un, diversos equivalents de metall. Tant la solució proteica com l'agent valorant han estat desgasats amb argó abans i després d'agregar cada equivalent, per tal d'evitar la presència d'oxigen. El blanc es realitza amb el mateix Tris en que s'ha realitzat la purificació de la proteïna (Tris-HCl o Tris-HClO<sub>4</sub>).

En cada cas, es mesuren els espectres de DC cada 10 minuts, a 200 nm/min i a 0.5 nm de resolució fins que aquests no varien més amb el temps. El temps d'estabilització és variable en funció del metall utilitzat, així, el Cd(II) s'estabilitza en uns 30 min mentre que el Cu(I) pot trigar varies hores. L'espectre definitiu de DC es

mesura a 50 nm/min amb una resolució de 0.5 nm. Tot seguit es mesura l'espectre de UV-Vis amb 15 segons de temps d'integració.

L'agent valorant de Cd(II) s'ha preparat per dilució en aigua mili-Q d'una solució estàndard de 1000 ppm de CdCl<sub>2</sub>. La concentració de la solució final ha estat determinada mitjançant l'espectrofotòmetre d'absorció atòmica de flama *Perkin Elmer 2100* del Servei d'Anàlisi Química del Departament de Química de la UAB.

L'agent valorant de Cu(I) ha estat una solució aquosa del complex [Cu(CH<sub>3</sub>CN)<sub>4</sub>]ClO<sub>4</sub> amb un 30% de CH<sub>3</sub>CN. La concentració de coure de la solució es determina en l'espectròmetre d'absorció atòmica de flama *Perkin Elmer 2100*, del Servei d'Anàlisi Química del Departament de Química de la UAB. Abans de poder emprar aquest agent valorant, cal verificar l'absència d'ions Cu(II) en solució mitjançant mesures d'EPR que es duen a terme en l'espectròmetre de ressonància paramagnètica electrònica *Brucker ESP 300 E* amb sistema criogènic de nitrogen líquid de l'ICMAB-CSIC al campus de la UAB.

En els punts més destacats de les valoracions s'han extret alíquotes que han estat analitzades per ESI-MS.

#### 6.2.3.2 ACIDIFICACIÓ I RENEUTRALITZACIÓ DE LES FORMES Cd-MT

S'han acidificat a 25 °C de temperatura, en una atmosfera d'argó dins una cel·la de quars d'1 cm de pas de llum, amb tap, les formes Cd-MT des de pH 7 fins a pH 1 amb solucions aquoses d'àcid clorhídric de concentració variable, d'entre 1 – 10<sup>-3</sup> M. Un cop a pH 1, la solució és desgasada amb argó durant 30 minuts i es reneutralitza fins al pH 7 inicial mitjançant solucions aquoses de NaOH de concentració variable, d'entre 1 – 10<sup>-3</sup> M. Quan es coneix la presència de lligands sulfur en els complexos Cd-MT, al final de la reneutralització s'addicionen diversos equivalents d'una solució estàndard de Na<sub>2</sub>S.

En cada disminució d'aproximadament una unitat de pH es mesura l'espectre de DC i de UV-Vis en les mateixes condicions explicades anteriorment. En la reneutralització, la mesura es fa cada increment de mitja unitat de pH.

### 6.2.3.3 EVOLUCIÓ AMB EL TEMPS

Es prepara la solució de la proteïna recombinant a una concentració d'entre 10 i 20  $\mu\text{M}$  i es mesura l'espectre de DC i UV-Vis. Es manté la proteïna a 25 °C de temperatura, tapant la cel·la de quars d'1 cm de pas de llum amb el tap i parafilm per evitar-ne l'evaporació i es deixa durant diversos dies, mesurant-ne cada cert temps els espectres de DC i UV-Vis (al menys un cada 24 h). Aquest estudi continua fins que s'atura l'evolució dels espectres de DC de la proteïna o bé aquesta perd tota la seva estructuració.



## **7. BIBLIOGRAFIA**



## 7. BIBLIOGRAFIA

- [1] M. Margoshes, B. L. Vallee, *Journal of the American Chemical Society* **1957**, 79, 4813-4814.
- [2] J. H. R. Kägi, B. L. Vallee, *Journal of Biological Chemistry* **1960**, 235, 3460-3465.
- [3] Y. Kojima, C. Berger, B. L. Vallee, J. H. Kagi, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1976**, 73, 3413-3417.
- [4] Y. Uchida, Y. Ihara, M. Tomonaga, *Biochemical and Biophysical Research Communications* **1988**, 150, 1263-1267.
- [5] Y. Uchida, K. Takio, K. Titani, Y. Ihara, M. Tomonaga, *Neuron* **1991**, 7, 337-347.
- [6] S. Tsuji, H. Kobayashi, Y. Uchida, Y. Ihara, T. Miyatake, *The EMBO Journal* **1992**, 11, 4843-4850.
- [7] C. J. Quaife, S. D. Findley, J. C. Erickson, G. J. Froelick, E. J. Kelly, B. P. Zambrowicz, R. D. Palmiter, *Biochemistry* **1994**, 33, 7250-7259.
- [8] C. A. Blindauer, O. I. Leszczyszyn, *Natural Product Reports* **2010**, 27, 720-741.
- [9] B. Gold, H. Deng, R. Bryk, D. Vargas, D. Eliezer, J. Roberts, X. Jiang, C. Nathan, *Nature Chemical Biology* **2008**, 4, 609-616.
- [10] E. Peroza, E. Freisinger, *Journal of Biological Inorganic Chemistry* **2007**, 12, 377-391.
- [11] <http://www.uniprot.org/uniprot/?query=metallothionein&sort=score>, **01/10/2010**.
- [12] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein?term=metallothionein>, **01/10/2010**.
- [13] J. H. R. Kägi, F. R. a. B. L. V. James, in *Methods in Enzymology*, Vol. 205, Academic Press, **1991**, pp. 613-626.
- [14] P. González-Duarte, in *Comprehensive Coordination Chemistry II*, Vol. 8 (Eds.: J. A. McCleverty, T. J. Meyer), Elsevier-Pergamon, Amsterdam, **2003**, pp. 213-228.
- [15] G. Henkel, B. Krebs, *Chemical Reviews* **2004**, 104, 801-824.
- [16] J. F. Riordan, B. L. Vallee, F. R. a. B. L. V. James, in *Methods in Enzymology*, Vol. 205, Academic Press, **1991**, pp. xv-xvi.
- [17] F. J. Kull, M. F. Reed, T. E. Elgren, T. L. Ciardelli, D. E. Wilcox, *Journal of the American Chemical Society* **1990**, 112, 2291-2298.
- [18] Y. Nishiyama, S. Nakayama, Y. Okada, K. S. Min, S. Onosaka, K. Tanaka, *Chemical Pharmaceutical Bulletin (Tokyo)* **1990**, 38, 2112-2117.
- [19] A. Muñoz, D. H. Petering, C. F. Shaw, *Inorganic Chemistry* **2000**, 39, 6114-6123.
- [20] S. Matsumoto, S. Nakayama, Y. Nishiyama, Y. Okada, K. S. Min, S. Onosaka, K. Tanaka, *Chemical Pharmaceutical Bulletin (Tokyo)* **1992**, 40, 2694-2700.
- [21] S. Matsumoto, Y. Nishiyama, Y. Okada, K. S. Min, S. Onosaka, K. Tanaka, *Chemical Pharmaceutical Bulletin (Tokyo)* **1992**, 40, 2701-2706.
- [22] N. Ohta, Y. Okada, K. Tanaka, *Chemical Pharmaceutical Bulletin (Tokyo)* **1983**, 31, 1885-1895.
- [23] Y. Okada, N. Ohta, S. Iguchi, Y. Tsuda, H. Sasaki, T. Kitagawa, M. Yagyu, K. S. Min, S. Onosaka, K. Tanaka, *Chemical Pharmaceutical Bulletin (Tokyo)* **1986**, 34, 986-998.
- [24] H. J. Hartmann, Y. J. Li, U. Weser, *Biometals* **1992**, 5, 187-191.
- [25] M. Capdevila, N. Cols, N. Romero-Isart, R. González-Duarte, S. Atrian, P. González-Duarte, *Cellular and Molecular Life Sciences* **1997**, 53, 681-688.

- [26] M. Valls, R. Bofill, R. González-Duarte, P. González-Duarte, M. Capdevila, S. Atrian, *Journal of Biological Chemistry* **2001**, 276, 32835-32843.
- [27] N. Romero-Isart, M. Vasák, *Journal of Inorganic Biochemistry* **2002**, 88, 388-396.
- [28] C. A. Blindauer, P. J. Sadler, *Accounts of Chemical Research* **2005**, 38, 62-69.
- [29] M. J. Stillman, *Coordination Chemistry Reviews* **1995**, 144, 461-511.
- [30] V. Calderone, B. Dolderer, H.-J. Hartmann, H. Echner, C. Luchinat, C. Del Bianco, S. Mangani, U. Weser, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2005**, 102, 51-56.
- [31] W. Braun, M. Vasák, A. H. Robbins, C. D. Stout, G. Wagner, J. H. Kägi, K. Wüthrich, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1992**, 89, 10124-10128.
- [32] W. Braun, G. Wagner, E. Wörgötter, M. Vasák, J. H. R. Kägi, K. Wüthrich, *Journal of Molecular Biology* **1986**, 187, 125-129.
- [33] K. Zangger, G. Shen, G. Oz, J. D. Otvos, I. M. Armitage, *Biochemical Journal* **2001**, 359, 353-360.
- [34] G. Oz, K. Zangger, I. M. Armitage, *Biochemistry* **2001**, 40, 11433-11441.
- [35] A. Arseniev, P. Schultze, E. Wörgötter, W. Braun, G. Wagner, M. Vasák, J. H. R. Kägi, K. Wüthrich, *Journal of Molecular Biology* **1988**, 201, 637-657.
- [36] B. A. Messerle, A. Schäffer, M. Vasák, J. H. R. Kägi, K. Wüthrich, *Journal of Molecular Biology* **1992**, 225, 433-443.
- [37] H. Wang, Q. Zhang, B. Cai, H. Li, K.-H. Sze, Z.-X. Huang, H.-M. Wu, H. Sun, *FEBS Letters* **2006**, 580, 795-800.
- [38] C. Capasso, V. Carginale, O. Crescenzi, D. Di Maro, E. Parisi, R. Spadaccini, P. A. Temussi, *Structure* **2003**, 11, 435-443.
- [39] R. Riek, B. Prêcheur, Y. Wang, E. A. Mackay, G. Wider, P. Güntert, A. Liu, J. H. R. Kägi, K. Wüthrich, *Journal of Molecular Biology* **1999**, 291, 417-428.
- [40] S. S. Narula, M. Brouwer, Y. Hua, I. M. Armitage, *Biochemistry* **1995**, 34, 620-631.
- [41] A. Muñoz, H. F. Försterling, F. C. Shaw, D. H. Petering, *Journal of Biological Inorganic Chemistry* **2002**, 7, 713-724.
- [42] E. A. Peroza, R. Schmucki, P. Güntert, E. Freisinger, O. Zerbe, *Journal of Molecular Biology* **2009**, 387, 207-218.
- [43] C. W. Peterson, S. S. Narula, I. M. Armitage, *FEBS Letters* **1996**, 379, 85-93.
- [44] I. Bertini, H.-J. Hartmann, T. Klein, G. Liu, C. Luchinat, U. Weser, *European Journal of Biochemistry* **2000**, 267, 1008-1018.
- [45] P. A. Cobine, R. T. McKay, K. Zangger, C. T. Dameron, I. M. Armitage, *European Journal of Biochemistry* **2004**, 271, 4213-4221.
- [46] C. A. Blindauer, M. D. Harrison, J. A. Parkinson, A. K. Robinson, J. S. Cavet, N. J. Robinson, P. J. Sadler, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2001**, 98, 9593-9598.
- [47] R. Orihuela, Universitat Autònoma de Barcelona (Barcelona), **2009**.
- [48] <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>, **2010**.
- [49] D. R. Winge, C. T. Dameron, R. K. Mehra, in *Metallothioneins* (Eds.: M. J. Stillman, C. F. Shaw, S. KT), VCH, New York, **1992**, pp. 257-270.
- [50] M. Valls, R. Bofill, N. Romero-Isart, R. González-Duarte, J. Abián, M. Carrascal, P. González-Duarte, M. Capdevila, S. Atrian, *FEBS Letters* **2000**, 467, 189-194.
- [51] J. Domènech, R. Orihuela, G. Mir, M. Molinas, S. Atrian, M. Capdevila, *Journal of Biological Inorganic Chemistry* **2007**, 12, 867-882.

- [52] J. Domènech, R. Bofill, A. Tinti, A. Torreggiani, S. Atrian, M. Capdevila, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins & Proteomics* **2008**, 1784, 693-704.
- [53] A. Pagani, L. Villarreal, M. Capdevila, S. Atrian, *Molecular Microbiology* **2007**, 63, 256-269.
- [54] R. Orihuela, F. Monteiro, A. Pagani, M. Capdevila, S. Atrian, *Chemistry – A European Journal* **2010**, n/a-n/a.
- [55] R. Orihuela, J. Domènech, R. Bofill, C. You, E. Mackay, J. Kägi, M. Capdevila, S. Atrian, *Journal of Biological Inorganic Chemistry* **2008**, 13, 801-812.
- [56] J. Domènech, Universitat de Barcelona (Barcelona), **2007**.
- [57] R. Bofill, R. Orihuela, M. Romagosa, J. Domènech, S. Atrian, M. Capdevila, *FEBS Journal* **2009**, 276, 7040-7056.
- [58] L. Villarreal, L. Tío, M. Capdevila, S. Atrian, *FEBS Journal* **2006**, 273, 523-535.
- [59] R. Bofill, M. Capdevila, S. Atrian, *Metallomics* **2009**, 1, 229-234.
- [60] M. Capdevila, J. Domènech, A. Pagani, L. Tío, L. Villarreal, S. Atrian, *Angewandte Chemie International Edition* **2005**, 44, 4618-4622.
- [61] B. A. Fowler, C. E. Hildebrand, Y. Kojima, M. Webb, in *Metallothionein II, Vol. 52* (Ed.: V. Birkhäuser), Kägi, J.H.; Kojima, Y., Basel, **1987**, pp. 19-22.
- [62] P. A. Binz, J. H. Kägi, in *Metallothionein IV* (Ed.: V. Birkhäuser), **1999**, pp. 7-13.
- [63] <http://www.bioc.unizh.ch/mtpage/MT.html>.
- [64] A. Pagani, Universitat de Barcelona (Barcelona), **2008**.
- [65] J. Domènech, G. Mir, G. Huguet, M. Capdevila, M. Molinas, S. Atrian, *Biochimie* **2006**, 88, 583-593.
- [66] S. R. Davis, R. J. Cousins, *Journal of Nutrition* **2000**, 130, 1085-1088.
- [67] W. Maret, *Journal of Chromatography B* **2009**, 877, 3378-3383.
- [68] F. Haq, M. Mahoney, J. Koropatnick, *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **2003**, 533, 211-226.
- [69] K. J. Waldron, N. J. Robinson, *Nature Reviews Microbiology* **2009**, 7, 25-35.
- [70] L. Wang, D. Chen, H. Wang, Z. Liu, *Biological Trace Element Research* **2009**, 129, 190-199.
- [71] J. C. Amiard, C. Amiard-Triquet, S. Barka, J. Pellerin, P. S. Rainbow, *Aquatic Toxicology* **2006**, 76, 160-202.
- [72] M. Vasák, *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* **2005**, 19, 13-17.
- [73] D. R. Winge, L. T. Jensen, C. Srinivasan, *Current Opinion in Chemical Biology* **1998**, 2, 216-221.
- [74] A. Krezel, W. Maret, *Journal of the American Chemical Society* **2007**, 129, 10911-10921.
- [75] W. Maret, *Biochemistry* **2004**, 43, 3301-3309.
- [76] W. Maret, *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* **2005**, 19, 7-12.
- [77] E. H. Fischer, E. W. Davie, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1998**, 95, 3333-3334.
- [78] P. V. E. van den Berghe, L. W. J. Klomp, *Nutrition Reviews* **2009**, 67, 658-672.
- [79] V. Lalioti, G. Muruais, Y. Tsuchiya, D. Pulido, I. V. Sandoval, *Frontiers in Bioscience* **2009**, 14, 4878-4903.
- [80] H. Shen, H. Qin, J. Guo, *Nutrition Research* **2008**, 28, 406-413.
- [81] W. Maret, *Journal of Nutrition* **2003**, 133, 1460S-1462.
- [82] W. Maret, G. Heffron, H. A. O. Hill, D. Djuricic, L.-J. Jiang, B. L. Vallee, *Biochemistry* **2002**, 41, 1689-1694.

- [83] W. Feng, J. Cai, W. M. Pierce, R. B. Franklin, W. Maret, F. W. Benz, Y. J. Kang, *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2005**, 332, 853-858.
- [84] S. G. Bell, B. L. Vallee, *ChemBioChem* **2009**, 10, 55-62.
- [85] M. P. Richards, R. J. Cousins, *Biochemical and Biophysical Research Communications* **1975**, 64, 1215-1223.
- [86] D.-H. Nam, E.-Y. Kim, H. Iwata, S. Tanabe, *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* **2007**, 145, 295-305.
- [87] K. Iguchi, N. Morihara, S. Usui, M. Hayama, Y. Sugimura, K. Hirano, *Journal of Andrology* **2010**, 32, 144-150.
- [88] M. Aschner, *The FASEB Journal* **1996**, 10, 1129-1136.
- [89] M. Ebadi, P. L. Iversen, R. Hao, D. R. Cerutis, P. Rojas, H. K. Happe, L. C. Murrin, R. F. Pfeiffer, *Neurochemistry International* **1995**, 27, 1-22.
- [90] E. H. Kim, T. S. Kim, W. Sun, D. S. Kim, H.-S. Chung, D. K. Kim, S.-H. Park, H. Kim, *Molecules and Cells* **2004**, 18, 326-331.
- [91] M. Valko, C. J. Rhodes, J. Moncol, M. Izakovic, M. Mazur, *Chemico-Biological Interactions* **2006**, 160, 1-40.
- [92] R. Nath, D. Kumar, T. Li, P. K. Singal, *Toxicology* **2000**, 155, 17-26.
- [93] A. Formigari, P. Irato, A. Santon, *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* **2007**, 146, 443-459.
- [94] N. Chiaverini, M. De Ley, *Free Radical Research* **2010**, 44, 605-613.
- [95] B. Wang, I. S. Wood, P. Trayhurn, *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2008**, 368, 88-93.
- [96] M. Cabré, J. Folch, A. Giménez, C. Matas, A. Parés, J. Caballería, J. L. Paternain, J. Rodés, J. Joven, J. Camps, *International journal for vitamin and nutrition research. Internationale Zeitschrift für Vitamin- und Ernährungsforschung. Journal international de vitaminologie et de nutrition* **1995**, 65, 45-50.
- [97] W. Xue, Q. Liu, L. Cai, Z. Wang, W. Feng, *Toxicology Letters* **2009**, 188, 70-76.
- [98] Y. Chen, Y. Irie, W. M. Keung, W. Maret, *Biochemistry* **2002**, 41, 8360-8367.
- [99] W. Maret, *Antioxidants & Redox Signaling* **2006**, 8, 1419-1441.
- [100] P. P. Kulkarni, Y. M. She, S. D. Smith, E. A. Roberts, B. Sarkar, *Chemistry - A European Journal* **2006**, 12, 2410-2422.
- [101] Y. J. Kang, *Experimental Biology and Medicine* **2006**, 231, 1459-1467.
- [102] J. R. Prohaska, A. A. Gybina, *Journal of Nutrition* **2004**, 134, 1003-1006.
- [103] K. Said Ali, Á. Ferencz, J. Nemcsók, E. Hermes, *Acta Biologica Hungarica* **2010**, 61, 10-23.
- [104] Y. Kondo, J. M. Rusnak, D. G. Hoyt, C. E. Settineri, B. R. Pitt, J. S. Lazo, *Molecular Pharmacology* **1997**, 52, 195-201.
- [105] M. Ø. Pedersen, R. Jensen, D. S. Pedersen, A. D. Skjolding, C. Hempel, L. Maretty, M. Penkowa, *BioFactors* **2009**, 35, 315-325.
- [106] Y. Irie, W. M. Keung, *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2001**, 282, 416-420.
- [107] G. Meloni, V. Sonois, T. Delaine, L. Guilloreau, A. Gillet, J. Teissie, P. Faller, M. Vasak, *Nature Chemical Biology* **2008**, 4, 366-372.
- [108] J. Hidalgo, M. Aschner, P. Zatta, M. Vasák, *Brain Research Bulletin* **2001**, 55, 133-145.
- [109] M. Penkowa, L. Tio, M. Giralt, A. Quintana, A. Molinero, S. Atrian, M. Vascaronák, J. Hidalgo, *Journal of Neuroscience Research* **2006**, 83, 974-984.

- [110] <http://www.bioc.uzh.ch/mtpage/poster/posterevol.html>.
- [111] F. Trinchella, M. Riggio, S. Filosa, E. Parisi, R. Scudiero, *Gene* **2008**, *423*, 48-56.
- [112] K. Balamurugan, W. Schaffner, in *Metal Ions in Life Sciences, Vol. 5* (Eds.: A. Sigel, H. Sigel, R. K. O. Sigel), Royal Society of Chemistry, **2009**, pp. 31-49.
- [113] L. Liang, K. Fu, D. K. Lee, R. J. Sobieski, T. Dalton, G. K. Andrews, *Molecular Reproduction and Development* **1996**, *43*, 25-37.
- [114] P. F. Searle, B. L. Davison, G. W. Stuart, T. M. Wilkie, G. Norstedt, R. D. Palmiter, *Molecular and Cellular Biology* **1984**, *4*, 1221-1230.
- [115] M. K. Yagle, R. D. Palmiter, *Molecular and Cellular Biology* **1985**, *5*, 291-294.
- [116] M. Karin, R. I. Richards, *Environmental Health Perspectives* **1984**, *54*, 111-115.
- [117] R. I. Richards, A. Heguy, M. Karin, **1984**, *37*, 263-272.
- [118] N. Jahroudi, R. Foster, J. Price-Haughey, G. Beitel, L. Gedamu, *Journal of Biological Chemistry* **1990**, *265*, 6506-6511.
- [119] R. D. Palmiter, S. D. Findley, T. E. Whitmore, D. M. Durnam, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1992**, *89*, 6333-6337.
- [120] R. Faraonio, P. Moffatt, O. LaRoche, H. M. Schipper, R. S. Arnaud, C. Séguin, *European Journal of Biochemistry* **2000**, *267*, 1743-1753.
- [121] M. Imagawa, Y. Ishikawa, H. Shimano, S. Osada, T. Nishihara, *Journal of Biological Chemistry* **1995**, *270*, 20898-20900.
- [122] Y. Irie, F. Mori, W. M. Keung, Y. Mizushima, K. Wakabayashi, *Physiological research* **2004**, *53*, 719-723.
- [123] S. H. Garrett, M. A. Sens, J. H. Todd, S. Somji, D. A. Sens, *Toxicology Letters* **1999**, *105*, 207-214.
- [124] M. A. Sens, S. Somji, D. L. Lamm, S. H. Garrett, F. Slovisky, J. H. Todd, D. A. Sens, *Environmental Health Perspectives* **2000**, *108*, 413-418.
- [125] D. Kim, S. H. Garrett, M. A. Sens, S. Somji, D. A. Sens, *Kidney International* **2002**, *61*, 464-472.
- [126] I. Hozumi, J. S. Suzuki, H. Kanazawa, A. Hara, M. Saio, T. Inuzuka, S. Miyairi, A. Naganuma, C. Tohyama, *Neuroscience Letters* **2008**, *438*, 54-58.
- [127] N. Cols, N. Romero-Isart, R. Bofill, M. Capdevila, P. Gonzalez-Duarte, R. Gonzalez-Duarte, S. Atrian, *Protein Engineering* **1999**, *12*, 265-269.
- [128] N. Cols, N. Romero-Isart, M. Capdevila, B. Oliva, P. González-Duarte, R. González-Duarte, S. Atrian, *Journal of Inorganic Biochemistry* **1997**, *68*, 157-166.
- [129] N. Romero-Isart, Universitat Autònoma de Barcelona (Barcelona), **1998**.
- [130] D. E. K. Sutherland, M. J. Willans, M. J. Stillman, *Biochemistry* **2010**, *49*, 3593-3601.
- [131] R. Bofill, M. Capdevila, N. Cols, S. Atrian, P. González-Duarte, *Journal of Biological Inorganic Chemistry* **2001**, *6*, 405-417.
- [132] L. Villarreal, Universitat de Barcelona (Barcelona), **2005**.
- [133] L. Tío, L. Villarreal, S. Atrian, M. Capdevila, *Journal of Biological Chemistry* **2004**, *279*, 24403-24413.
- [134] L. Tío, L. Villarreal, S. Atrian, M. Capdevila, *Experimental Biology and Medicine* **2006**, *231*, 1522-1527.
- [135] G. Meloni, K. Zovo, J. Kazantseva, P. Palumaa, M. Vašák, *Journal of Biological Chemistry* **2006**, *281*, 14588-14595.
- [136] S. Koizumi, K. Suzuki, Y. Ogra, H. Yamada, F. Otsuka, *European Journal of Biochemistry* **1999**, *259*, 635-642.

- [137] S. Nakamura, T. Kawata, A. Nakayama, K. Kubo, T. Minami, H. Sakurai, *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2004**, 320, 1193-1198.
- [138] S. Kobayashi, J. Sayato-Suzuki, *Biochemical Journal* **1988**, 249, 69-75.
- [139] A. V. Karotki, M. Vašák, *Biochemistry* **2008**, 47, 10961-10969.
- [140] C. Capasso, V. Carginale, O. Crescenzi, D. Di Maro, R. Spadaccini, P. A. Temussi, E. Parisi, *Biochemical Journal* **2005**, 391, 95-103.
- [141] C. Capasso, V. Carginale, R. Scudiero, O. Crescenzi, R. Spadaccini, P. A. Temussi, E. Parisi, *Journal of Molecular Evolution* **2003**, 57, S250-S257.
- [142] S. D'Auria, V. Carginale, R. Scudiero, O. Crescenzi, D. Di Maro, P. A. Temussi, E. Parisi, C. Capasso, *Biochemical Journal* **2001**, 354, 291-299.
- [143] C. W. Cody, P. C. Huang, *Biochemical and Biophysical Research Communications* **1994**, 202, 954-959.
- [144] P. K. Pan, F. Y. Hou, C. W. Cody, P. C. Huang, *Biochemical and Biophysical Research Communications* **1994**, 202, 621-628.
- [145] L.-J. Jiang, W. Maret, B. L. Vallee, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1998**, 95, 9146-9149.
- [146] K. Zangger, G. I. Āz, I. M. Armitage, *Journal of Biological Chemistry* **2000**, 275, 7534-7538.
- [147] J. H. Beattie, A. M. Wood, G. J. Duncan, *ELECTROPHORESIS* **1999**, 20, 1613-1618.
- [148] F. Mitsumori, C. Tohyama, *Journal of Biochemistry* **1984**, 96, 533-543.
- [149] D. Neuhaus, G. Wagner, M. Vašák, J. H. R. Kägi, K. Wüthrich, *European Journal of Biochemistry* **1985**, 151, 257-273.
- [150] M. H. Frey, G. Wagner, M. Vasak, O. W. Soerensen, D. Neuhaus, E. Woergoetter, J. H. R. Kaegi, R. R. Ernst, K. Wuethrich, *Journal of the American Chemical Society* **1985**, 107, 6847-6851.
- [151] G. Wagner, D. Neuhaus, E. WÖRgÖTter, M. VašAk, J. H. R. KÄGi, K. WÜThrich, *European Journal of Biochemistry* **1986**, 157, 275-289.
- [152] G. Wagner, M. H. Frey, D. Neuhaus, E. Wörgötter, W. Braun, M. Vasak, J. H. Kägi, K. Wüthrich, *Experientia Supplementum* **1987**, 52, 149-157.
- [153] E. Wörgötter, G. Wagner, M. VašAk, J. H. R. KÄGi, K. WÜThrich, *European Journal of Biochemistry* **1987**, 167, 457-466.
- [154] P. Schultze, E. Wörgötter, W. Braun, G. Wagner, M. Vasák, J. H. R. Kägi, K. Wüthrich, *Journal of Molecular Biology* **1988**, 203, 251-268.
- [155] B. A. Messerle, A. Schäffer, M. Vasák, J. H. R. Kägi, K. Wüthrich, *Journal of Molecular Biology* **1990**, 214, 765-779.
- [156] A. H. Robbins, D. E. McRee, M. Williamson, S. A. Collett, N. H. Xuong, W. F. Furey, B. C. Wang, C. D. Stout, *Journal of Molecular Biology* **1991**, 221, 1269-1293.
- [157] J. Hidalgo, R. Chung, M. Penkowa, M. Vasák, in *Metal Ions in Life Sciences*, Vol. 5 (Eds.: A. Sigel, H. Sigel, R. K. O. Sigel), Royal Society of Chemistry, **2009**, pp. 279-317.
- [158] P. M. Gehrig, C. You, J. H. R. Kägi, P. E. Hunziker, R. Dallinger, C. Gruber, M. Brouwer, *Protein Science* **2000**, 9, 395-402.
- [159] L.-J. Jiang, M. Vasák, B. L. Vallee, W. Maret, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2000**, 97, 2503-2508.
- [160] M. Kurasaki, R. Yamaguchi, A. R. Linde Arias, M. Okabe, Y. Kojima, *Protein Engineering* **1997**, 10, 413-416.
- [161] M. Kurasaki, T. Emoto, A. R. L. Arias, M. Okabe, F. Yamasaki, S. Oikawa, Y. Kojima, *Protein Engineering* **1996**, 9, 1173-1180.



- [162] D. T. Jiang, S. M. Heald, T. K. Sham, M. J. Stillman, *Journal of the American Chemical Society* **1994**, *116*, 11004-11013.
- [163] W. Cai, M. J. Stillman, *Journal of the American Chemical Society* **1988**, *110*, 7872-7873.
- [164] A. J. Zelazowski, Z. Gasyna, M. J. Stillman, *Journal of Biological Chemistry* **1989**, *264*, 17091-17099.
- [165] A. Presta, M. J. Stillman, *Chirality* **1994**, *6*, 521-530.
- [166] A. R. Green, M. J. Stillman, *Inorganic Chemistry* **1996**, *35*, 2799-2807.
- [167] M. Vaher, N. Romero-Isart, M. Vasák, P. Palumaa, *Journal of Inorganic Biochemistry* **2001**, *83*, 1-6.
- [168] K. Zangger, I. M. Armitage, *Journal of Inorganic Biochemistry* **2002**, *88*, 135-143.
- [169] J. D. Otvos, H. R. Engeseth, S. Wehrli, *Biochemistry* **1985**, *24*, 6735-6740.
- [170] Y. Hathout, K. J. Reynolds, Z. Szilagy, C. Fenselau, *Journal of Inorganic Biochemistry* **2002**, *88*, 119-122.
- [171] K. T. Suzuki, R. Ohnuki, K. Yaguchi, *Toxicology Letters* **1983**, *16*, 77-84.
- [172] K. T. Suzuki, M. Yamamura, *Biochemical Pharmacology* **1980**, *29*, 689-692.
- [173] C. Afonso, Y. Hathout, C. Fenselau, *International Journal of Mass Spectrometry* **2004**, *231*, 207-211.
- [174] J. W. Ejniak, A. Muñoz, E. DeRose, C. F. Shaw, D. H. Petering, *Biochemistry* **2003**, *42*, 8403-8410.
- [175] P. Palumaa, E. A. Mackay, M. Vasak, *Biochemistry* **1992**, *31*, 2181-2186.
- [176] P. Palumaa, M. Vaher, *Annals of Clinical and Laboratory Science* **1996**, *26*, 264-268.
- [177] T. Hou, X. Xu, Y. An, B. Ru, R. Bi, *Protein Science* **2000**, *9*, 2302-2312.
- [178] J. C. Erickson, A. K. Sewell, L. T. Jensen, D. R. Winge, R. D. Palmiter, *Brain Research* **1994**, *649*, 297-304.
- [179] P. Palumaa, I. Tammiste, K. Kruusel, L. Kangur, H. Jörnvall, R. Sillard, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins & Proteomics* **2005**, *1747*, 205-211.
- [180] A. K. Sewell, L. T. Jensen, J. C. Erickson, R. D. Palmiter, D. R. Winge, *Biochemistry* **1995**, *34*, 4740-4747.
- [181] Y. Uchida, Y. Ihara, *Journal of Biological Chemistry* **1995**, *270*, 3365-3369.
- [182] D. W. Hasler, L. T. Jensen, O. Zerbe, D. R. Winge, M. Vasak, *Biochemistry* **2000**, *39*, 14567-14575.
- [183] Y. Manso, M. Serra, G. Comes, M. Giralt, J. Carrasco, N. Cols, M. Vašák, P. González-Duarte, J. Hidalgo, *Journal of Neuroscience Research* **2010**, *88*, 1708-1718.
- [184] Z.-C. Ding, X.-C. Teng, B. Cai, H. Wang, Q. Zheng, Y. Wang, G.-M. Zhou, M.-J. Zhang, H.-M. Wu, H.-Z. Sun, Z.-X. Huang, *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2006**, *349*, 674-682.
- [185] Z.-C. Ding, Q. Zheng, B. Cai, W.-H. Yu, X.-C. Teng, Y. Wang, G.-M. Zhou, H.-M. Wu, H.-Z. Sun, M.-J. Zhang, Z.-X. Huang, *Journal of Biological Inorganic Chemistry* **2007**, *12*, 1173-1179.
- [186] Z.-C. Ding, X.-C. Teng, Q. Zheng, F.-Y. Ni, B. Cai, Y. Wang, G.-M. Zhou, H.-Z. Sun, X.-S. Tan, Z.-X. Huang, *Biomaterials* **2009**, *22*, 817-826.
- [187] M. Vasák, D. W. Hasler, *Current Opinion in Chemical Biology* **2000**, *4*, 177-183.
- [188] J. Carrasco, J. Hernandez, B. Gonzalez, I. L. Campbell, J. Hidalgo, *Experimental Neurology* **1998**, *153*, 184-194.

- [189] J. Hidalgo, J. Carrasco, *Neurotoxicology* **1998**, *19*, 661-666.
- [190] Y. Uchida, F. Gomi, T. Masumizu, Y. Miura, *Journal of Biological Chemistry* **2002**, *277*, 32353-32359.
- [191] C. Howells, A. K. West, R. S. Chung, *FEBS Journal* **2010**, *277*, 2931-2939.
- [192] I. El Ghazi, B. L. Martin, I. M. Armitage, *Experimental Biology and Medicine* **2006**, *231*, 1500-1506.
- [193] G. Meloni, P. Faller, M. Vašák, *Journal of Biological Chemistry* **2007**, *282*, 16068-16078.
- [194] H. Ren, Q. Ji, Y. Liu, B. Ru, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* **2001**, *1568*, 129-134.
- [195] H. Wang, H. Li, B. Cai, Z.-X. Huang, H. Sun, *Journal of Biological Inorganic Chemistry* **2008**, *13*, 411-419.
- [196] B. Martin, A. Tokheim, P. McCarthy, B. Doms, A. Davis, I. Armitage, *Molecular and Cellular Biochemistry* **2006**, *283*, 129-137.
- [197] D. W. Lahti, J. D. Hoekman, A. M. Tokheim, B. L. Martin, I. M. Armitage, *Protein Science* **2005**, *14*, 1151-1157.
- [198] M. Knipp, G. Meloni, B. Roschitzki, M. Vašák, *Biochemistry* **2005**, *44*, 3159-3165.
- [199] H. J. You, D.-h. Oh, C. Y. Choi, D. G. Lee, K.-S. Hahm, A. R. Moon, H. G. Jeong, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* **2002**, *1573*, 33-38.
- [200] H. J. You, K. J. Lee, H. G. Jeong, *FEBS Letters* **2002**, *521*, 175-179.
- [201] Z.-X. Huang, *FEBS Journal* **2010**, *277*, 2911-2911.
- [202] M. Vasák, G. Meloni, in *Metal Ions in Life Sciences, Vol. 5* (Eds.: A. Sigel, H. Sigel, R. K. O. Sigel), Royal Society of Chemistry, **2009**, pp. 319-351.
- [203] M. Vasák, *Journal of Inorganic Biochemistry* **1995**, *59*, 92-92.
- [204] P. Faller, D. W. Hasler, O. Zerbe, S. Klauser, D. R. Winge, M. Vasak, *Biochemistry* **1999**, *38*, 10158-10167.
- [205] R. Bogumil, P. Faller, P. A. Binz, M. Vašák, J. M. Charnock, C. D. Garner, *European Journal of Biochemistry* **1998**, *255*, 172-177.
- [206] F. Y. Ni, B. Cai, Z. C. Ding, F. Zheng, M. J. Zhang, H. M. Wu, H. Z. Sun, Z. X. Huang, *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* **2007**, *68*, 255-266.
- [207] Z.-C. Ding, Q. Zheng, B. Cai, F.-Y. Ni, W.-H. Yu, X.-C. Teng, Y. Gao, F. Liu, D. Chen, Y. Wang, H.-M. Wu, H.-Z. Sun, M.-J. Zhang, X.-S. Tan, Z.-X. Huang, *Journal of Inorganic Biochemistry* **2008**, *102*, 1965-1972.
- [208] B. Cai, Z. C. Ding, Q. Zhang, F. Y. Ni, H. Wang, Q. Zheng, Y. Wang, G. M. Zhou, K. Q. Wang, H. Z. Sun, H. M. Wu, Z. X. Huang, *FEBS Journal* **2009**, *276*, 3547-3558.
- [209] P. Palumaa, E. Eriste, O. Njunkova, L. Pokras, H. Jörnvall, R. Sillard, *Biochemistry* **2002**, *41*, 6158-6163.
- [210] P. Palumaa, O. Njunkova, L. Pokras, E. Eriste, H. Jörnvall, R. Sillard, *FEBS Letters* **2002**, *527*, 76-80.
- [211] R. Bogumil, P. Faller, D. L. Pountney, M. Vasák, *European Journal of Biochemistry* **1996**, *238*, 698-705.
- [212] D. L. Pountney, S. M. Fundel, P. Faller, N. E. Birchler, P. Hunziker, M. Vasák, *FEBS Letters* **1994**, *345*, 193-197.
- [213] Y.-b. Shi, L. Du, W.-j. Zheng, W.-x. Tang, *Biometals* **2002**, *15*, 421-427.
- [214] C. F. Chen, S. H. Wang, L. Y. Lin, *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry & Molecular Biology* **1996**, *115*, 27-32.

- [215] S.-H. Wang, C.-Y. Chang, C.-F. Chen, M. F. Tam, Y.-H. Shih, L.-Y. Lin, *Gene* **1997**, *203*, 189-197.
- [216] M. Vašák, D. W. Hasler, P. Faller, *Journal of Inorganic Biochemistry* **2000**, *79*, 7-10.
- [217] E. Eriste, K. Kruusel, P. Palumaa, H. Jörnvall, R. Sillard, *Protein Expression and Purification* **2003**, *31*, 161-165.
- [218] P. Palumaa, E. Eriste, K. Kruusel, L. kangur, H. Jörnvall, R. Sillard, *Cellular and Molecular Biology (Noisy-le-grand)*. **2003**, *49*, 763-768.
- [219] G. Meloni, T. Polanski, O. Braun, M. Vašák, *Biochemistry* **2009**, *48*, 5700-5707.
- [220] N. Romero-Isart, L. T. Jensen, O. Zerbe, D. R. Winge, M. Vašák, *Journal of Biological Chemistry* **2002**, *277*, 37023-37028.
- [221] Q. Zheng, W. M. Yang, W. H. Yu, B. Cai, X. C. Teng, Y. Xie, H. Z. Sun, M. J. Zhang, Z. X. Huang, *Protein Engineering* **2003**, *16*, 865-870.
- [222] S. Toriumi, T. Saito, T. Hosokawa, Y. Takahashi, T. Numata, M. Kurasaki, *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology* **2005**, *96*, 295-301.
- [223] L. T. Jensen, J. M. Peltier, D. R. Winge, *Journal of Biological Inorganic Chemistry* **1998**, *3*, 627-631.
- [224] P. Faller, M. Vasak, *Biochemistry* **1997**, *36*, 13341-13348.
- [225] B. Roschitzki, M. Vašák, *Biochemistry* **2003**, *42*, 9822-9828.
- [226] B. Roschitzki, M. Vašák, *Journal of Biological Inorganic Chemistry* **2002**, *7*, 611-616.
- [227] D. W. Hasler, P. Faller, M. Vasak, *Biochemistry* **1998**, *37*, 14966-14973.
- [228] K. Polec Pawlak, Ò. Palacios, M. Capdevila, P. González-Duarte, R. Lobinski, *Talanta* **2002**, *57*, 1011-1017.
- [229] P. Palumaa, M. VaŠÁK, *European Journal of Biochemistry* **1992**, *205*, 1131-1135.
- [230] P. Palumaa, O. Zerbe, M. Vasak, *Biochemistry* **1993**, *32*, 2874-2879.
- [231] R. Bofill, Ó. Palacios, M. Capdevila, N. Cols, R. González-Duarte, S. Atrian, P. González-Duarte, *Journal of Inorganic Biochemistry* **1999**, *73*, 57-64.
- [232] P. Faller, *FEBS Journal* **2010**, *277*, 2921-2930.
- [233] Z.-C. Ding, F.-Y. Ni, Z.-X. Huang, *FEBS Journal* **2010**, *277*, 2912-2920.
- [234] Ò. Palacios, A. Pagani, S. Pérez-Rafael, M. Egg, M. Höckner, A. Brandstätter, M. Capdevila, S. Atrian, R. Dallinger, *BMC Biology* **2011**, *9*.



**ANNEX**



**ANNEX:****DETERMINACIÓ DE L'ÀCID A UTILITZAR PER A L'ESPECTROMETRIA D'ABSORCIÓ ÒPTICA AMB PLASMA ACOBLAT PER INDUCCIÓ (ICP-OES)**

En les mesures d'ICP-OES o ICP-AES (veure apartat 6.2.1.1) la concentració total present en les mostres ha d'estar entre un 2 i un 5%. Així, per a les mesures d'ICP s'utilitza  $\text{HNO}_3$  al 2% per diluir els complexos metall-proteïna biosintetitzats. La preparació de les mostres per a l'ICP "àcid" es fa mitjançant un àcid pur, de manera que la concentració total de l'àcid augmenta considerablement, això podria comportar desviacions de mesura i, per tant, errors en la quantificació de quantitat de sofre i de metall present en la mostra.

Es van assajar i comparar tres àcids diferents per veure quin era el més adequat per ser emprat per aquesta tècnica:  $\text{HNO}_3$ ,  $\text{HClO}_4$  i  $\text{HCl}$ . Tots tres són àcids forts però l'àcid nítric és també un agent oxidant fort, de manera que l'únic avantatge que aporta la seva utilització és el fet que és el que s'utilitza per a la dilució de les mostres durant la seva preparació. L'àcid perclòric també té una forta capacitat oxidant. Un dels avantatges a considerar és que limita els problemes de possibles precipitacions ja que les seves sals són sempre solubles. L'àcid clorhídric és un àcid molt corrosiu i té com avantatge la seva baixa reactivitat i la seva utilització generalitzada en química per a la digestió de mostres.

Per tal de determinar quin dels tres àcids podia ser el més adequat per les anàlisis que es volien realitzar, es va realitzar un estudi sobre la intensitat de senyal donada per l'aparell en funció de la quantitat d'element present en la mostra en presència de concentracions variables dels diferents àcids.

La solució estandarditzada intermèdia (I) contenia 0, 0.2, 0.4, 1 i 2 ppm de Cd, Zn o Cu i 0, 1, 2, 5 o 10 ppm de S (l'aparell és més sensible al S que als tres metalls indicats).

Les solucions a mesurar, per tal de calcular una recta de regressió amb 5 punts es van preparar amb 0, 0.1, 0.2, 0.5 i 1 mL de solució intermèdia en cadascuna i es van enrasar a 10 mL amb  $\text{HNO}_3$ . Aquesta correspondria a una recta de regressió per a un ICP-OES seguint el mètode "convencional" (Recta 1). Per tal d'observar la desviació

produïda per els àcids i en funció de la seva concentració es van preparar 2 sèries més de solucions per a calcular dues rectes de regressió més. En una primera (Recta 2) es van afegir 0.3 mL de l'àcid corresponent pur, de manera que quedaria a una concentració del 3%, i en una segona (Recta 3) es van afegir 0.6 mL de l'àcid corresponent pur, quedant així a una concentració del 6%. Així, per a un element determinat es van obtenir un total de 9 rectes de regressió: tres per a cada tipus d'àcid, i en cadascuna de les tres concentracions possibles (Taula 21).

	I (mL)	Recta 1 ("conv")	Recta 2 (àcid al 3%)		Recta 3 (àcid al 6%)	
		HNO <sub>3</sub> (mL)	Àcid pur (mL)	HNO <sub>3</sub> (mL)	Àcid pur (mL)	HNO <sub>3</sub> (mL)
P0	0	10	0.3	9.7	0.6	9.4
P1	0.1	9.9	0.3	9.6	0.6	9.3
P2	0.2	9.8	0.3	9.5	0.6	9.2
P3	0.5	9.5	0.3	9.2	0.6	8.9
P4	1	9	0.3	8.7	0.6	8.4

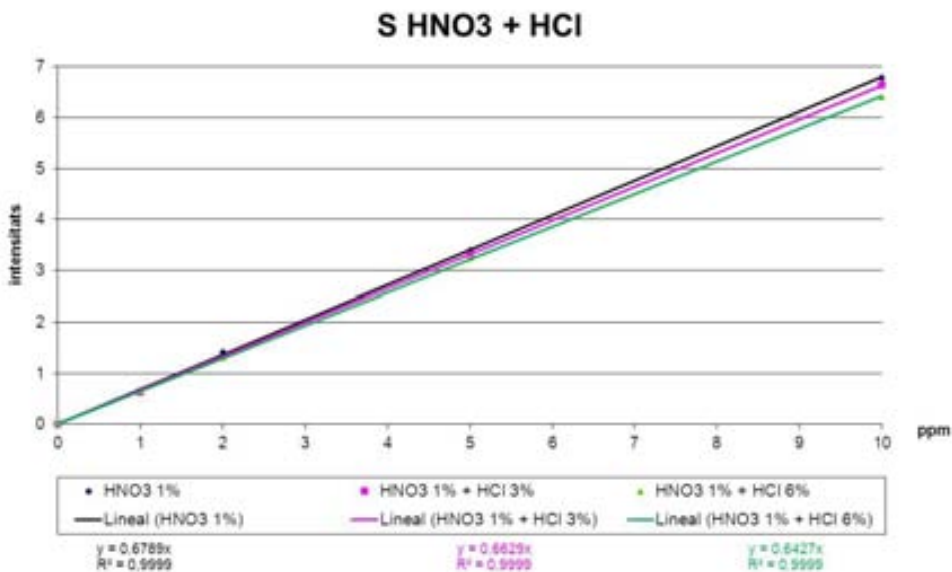
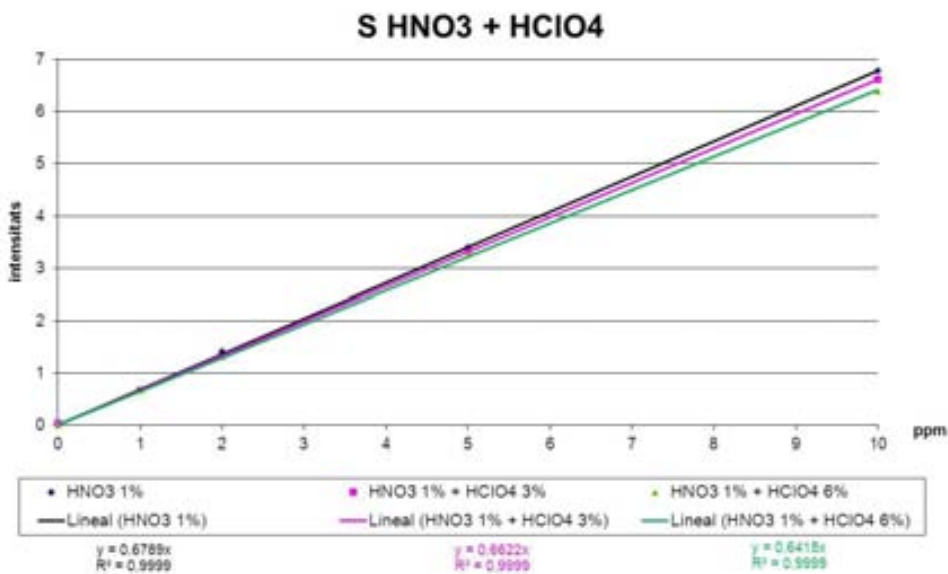
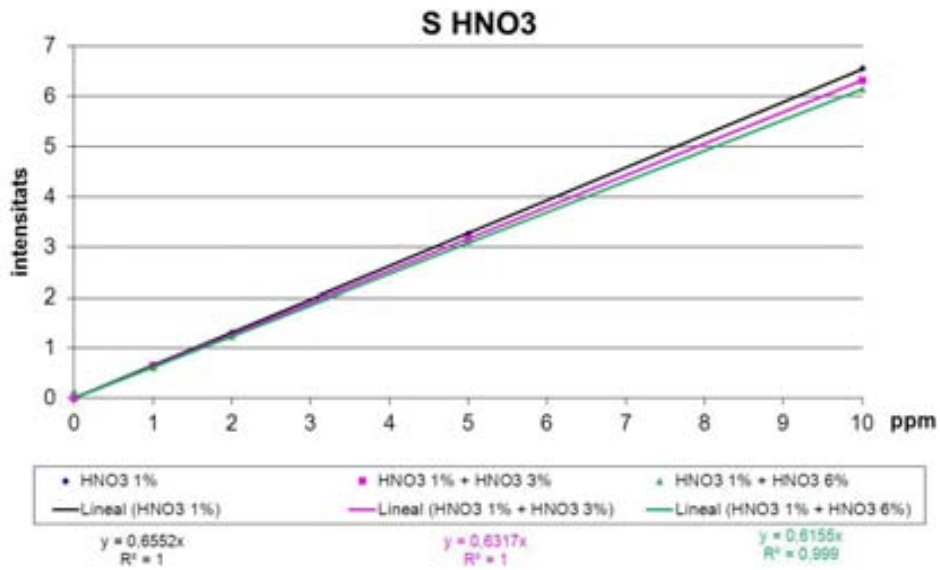
**Taula 21:** Volums de solució intermèdia (columna ombrejada) per a cadascuna de les rectes a mesurar. En la Recta 1 hi haurà una concentració final de HNO<sub>3</sub> al 1%, en la Recta 2 hi haurà HNO<sub>3</sub> al 1% i un 3% d'un dels tres àcids, i en la Recta 3 hi haurà HNO<sub>3</sub> al 1% i un 6% de l'àcid corresponent.

Es van calcular les rectes de regressió per a cada element, àcid i concentració corresponents, així com el coeficient de correlació per a cadascuna d'elles, que s'exposen en les pàgines següents.

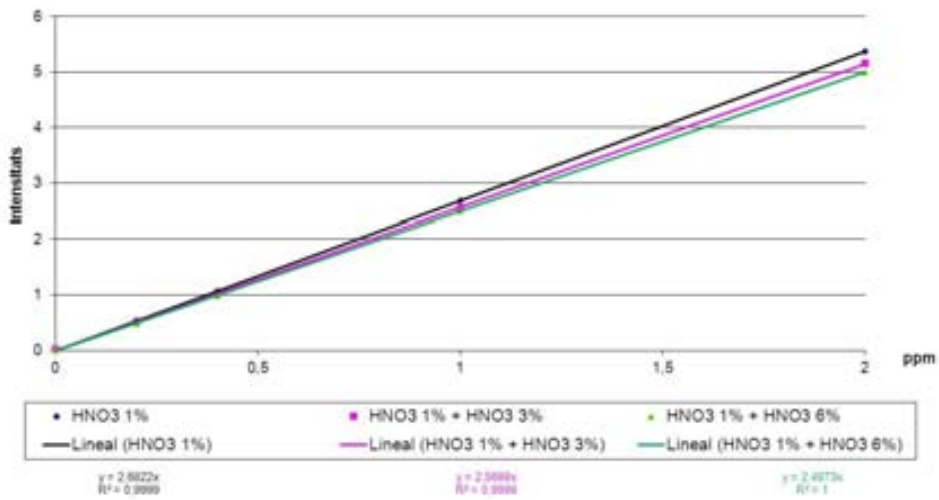
Com es pot comprovar, els coeficients de correlació de les rectes de regressió no presenten cap diferència significativa ni entre els diferents àcids utilitzats ni tampoc entre les diferents concentracions assajades per cadascun dels àcids. Així, es pot concloure que qualsevol dels tres àcids pot donar resultats vàlids en la determinació de la concentració de proteïna, quantitat de S o quantitat de cadascun dels 3 metalls presents en les mostres en la tècnica de ICP-OES.

Finalment es va decidir utilitzar HClO<sub>4</sub> per al mètode d'ICP-OES "àcid" emprat en aquesta Tesis Doctoral, així com per als altres estudis realitzats en l'equip de recerca, ja que és l'àcid que dóna menys variació entre repeticions d'una mateixa mostra (O. Palacios, comunicació personal).

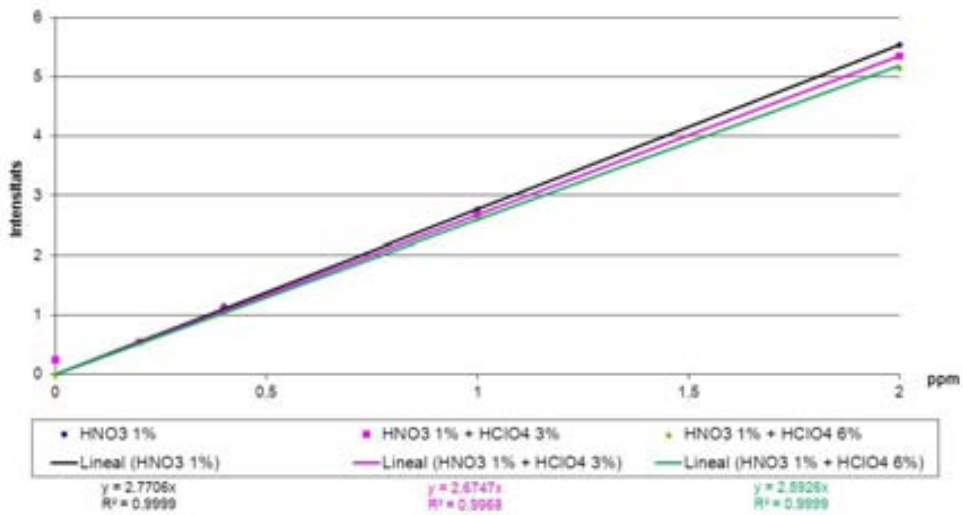




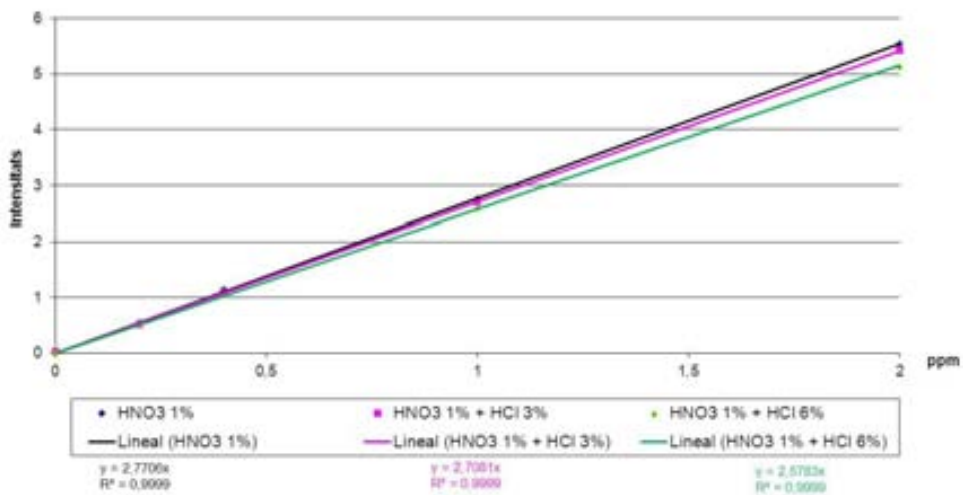
### Zn HNO3



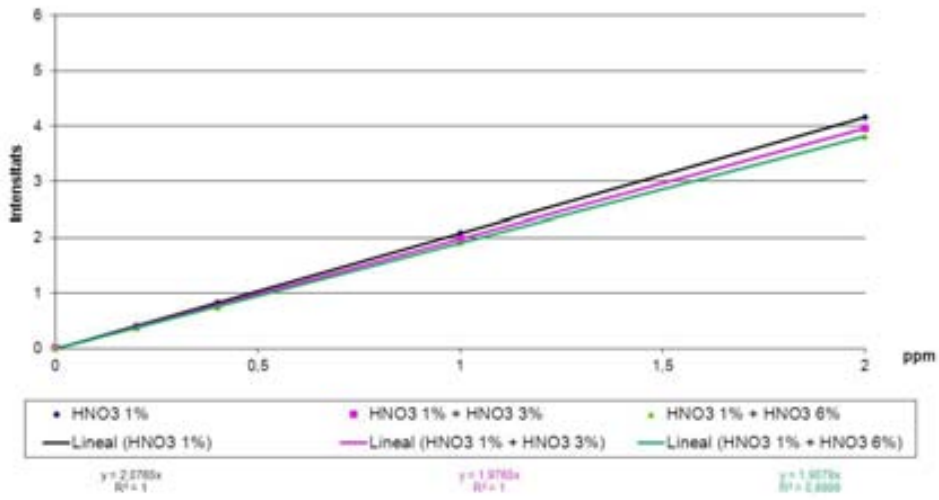
### Zn HNO3 + HClO4



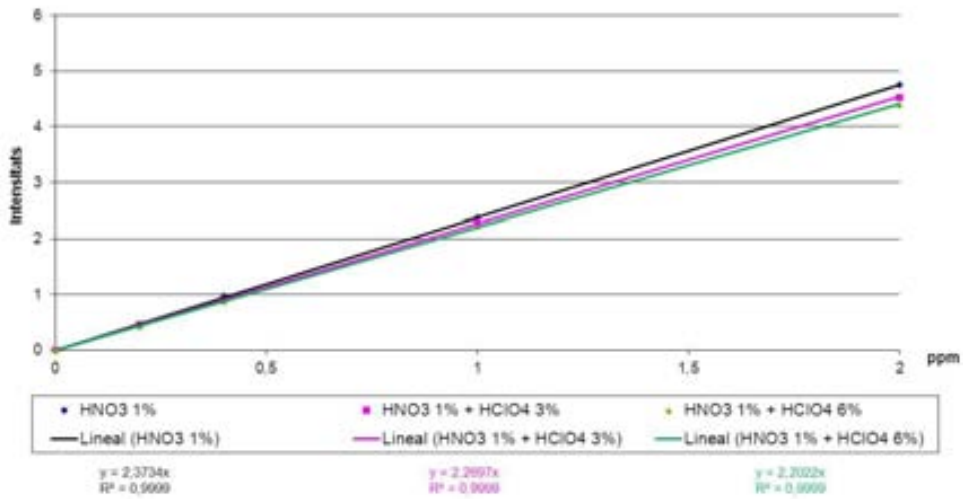
### Zn HNO3 + HCl



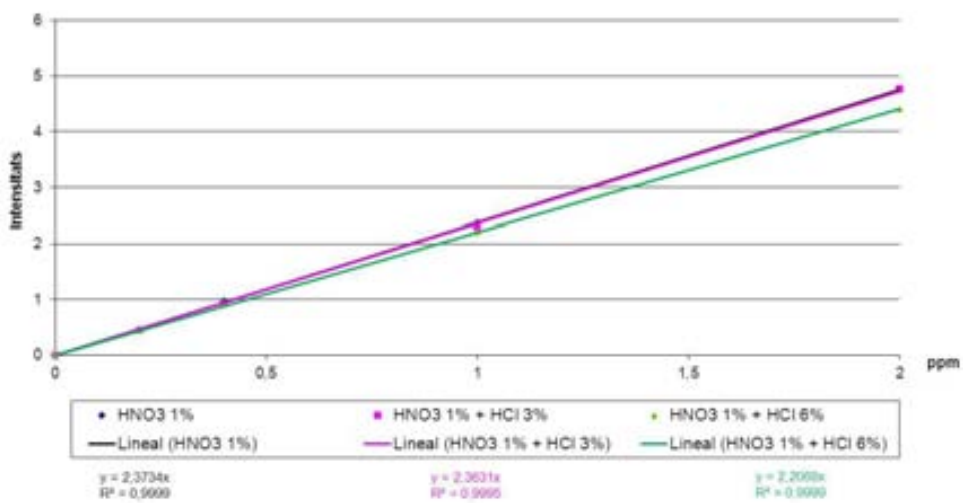
### Cd HNO3



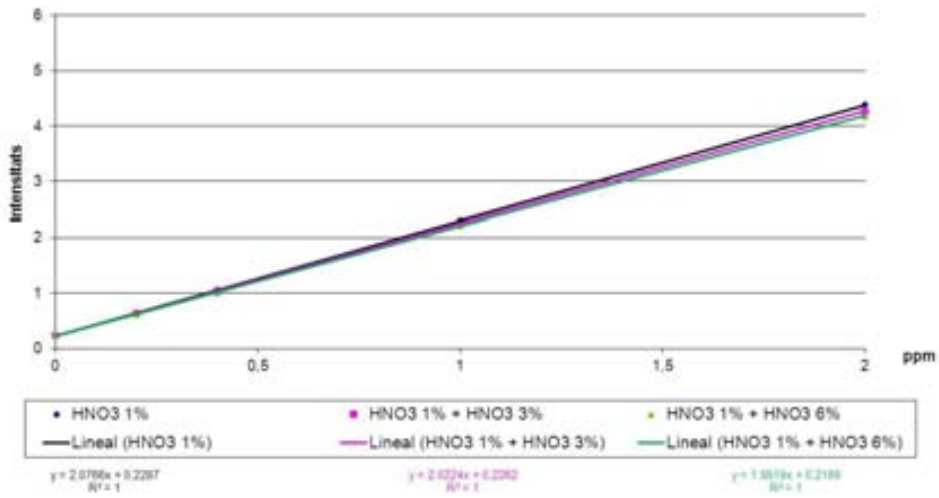
### Cd HNO3 + HClO4



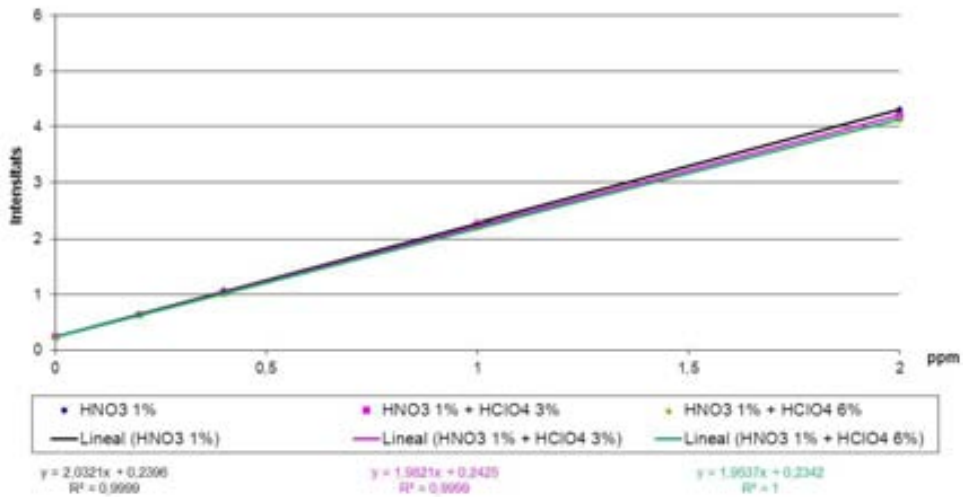
### Cd HNO3 + HCl



### Cu HNO3



### Cu HNO3 + HClO4



### Cu HNO3 + HCl

