



Universitat de Girona

ESTUDI D'UNA METAL·LOTIONEÏNA D'ALZINA SURERA (QSMT)

Gisela MIR ARNAU

ISBN: 84-689-3086-5
Dipòsit legal: GI-871-2005



Universitat de Girona

Facultat de Ciències Departament de Biologia

TESI DOCTORAL

**ESTUDI D'UNA METAL·LOTIONEÏNA D'ALZINA SURERA
(QsMT)**

Gisela Mir Arnau
Girona, 2005



Universitat de Girona

Facultat de Ciències Departament de Biologia

ESTUDI D'UNA METAL·LOTIONEÏNA D'ALZINA SURERA (QsMT)

Memòria presentada per GISELA MIR ARNAU, inscrita en el programa de doctorat de Biotecnologia de l'Institut de Tecnologia Agroalimentària, Campus Agroalimentari de Girona, Institut d'Ecologia Aquàtica, Departament de Biologia i Departament EQATA, per optar al grau de doctora en biologia per la Universitat de Girona. El present treball s'ha realitzat a l'Àrea de Biologia Cel·lular del Departament de Biologia de la Universitat de Girona sota la direcció de la Dra. GEMMA HUGUET i la Dra. MARISSA MOLINAS.

Vist i plau de,

Dra. Gemma Huguet
Directora de tesi

Dra. Marissa Molinas
Directora de tesi

Gisela Mir
Autora

ABREVIATURES

ARE	Elements de resposta antioxidant (<i>Antioxidant Response Elements</i>)
BCIP	5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfat
CD	Dicroïsmo circular (<i>Circular Dichroism</i>)
CUP1	Metal·lotioneïna de llevat codificada pel gen <i>CUP1</i>
CYCT	Citocrom-c-oxidasa
DEPC	Dietil-pirocarbonat
DIG	Digoxigenina
dNTPs	Mescla dels desoxiribonucleòtids dATP, dTTP, dGTP i dCTP
ESI-MS	Espectrometria de masses amb mode de treball electrospai (<i>Electrospray Ionization-Mass Spectrometry</i>)
FPLC	Cromatografia en fase líquida (<i>Fast Performance Liquid Chromatography</i>)
GC-FPD	Cromatografia de gasos amb detecció fotomètrica de flama (<i>Gas Chromatography interfaced to Flame Photometric Detection</i>)
GPD	Gliceraldehid-3-fosfat deshidrogenasa
GSH	Glutatió reduït
GSSG	Glutatió oxidat
GST	Glutatió-s-transferasa
HMW-complex	Complexe d'elevat pes molecular (<i>High Molecular Weight Complex</i>)
ICP-OES	Espectroscòpia d'emissió òptica de plasma acoblat inductivament (<i>Inductively Coupled Plasma-Optical Emission Spectrometry</i>)
IPTG	Isopropil- β -D-tiogalactopiranosid
LB	Medi Luria i Bertini
LMW-complex	Complexe de baix pes molecular (<i>Low Molecular Weight Complex</i>)
MCS	Zona de clonatge múltiple (<i>Multiple Cloning Site</i>)
MS	Medi de cultiu Murashige i Skoog
MT	Metal·lotioneïna
NBT	4-Nitroblue tetrazolium chloride
PC	Fitoquelatina
PCR	Reacció en cadena de la polimerasa (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PCS	Fitoquelatina sintasa
QsMT	Metal·lotioneïna de <i>Quercus suber</i>
RMN	Ressonància magnètica nuclear
ROS	Espècies reactives d'oxigen (<i>Reactive Oxygen Species</i>)
SC	Medi de cultiu sintètic complet
SH	Medi de cultiu Schenck i Hildebrandt
SOD	Enzim Superòxid dismutasa
UTR	Regió de l'RNA no traduïda (<i>Untranslated Region</i>)
UV-vis	Absoció electrònica en l'ultraviolat-visible (<i>Ultraviolet-Visible Electronic Absorption</i>)

PRESENTACIÓ

En aquest treball s'estudia una metal·lotioneïna (MT) aïllada de fel·lema d'alzina surera utilitzant diferents aproximacions. Per una banda s'estudia l'expressió del gen, i per altra les propietats de coordinació metàl·lica de la proteïna.

L'expressió del gen s'estudia mitjançant la hibridació *in situ*, una tècnica que permet la localització diferencial de l'expressió en determinats tipus cel·lulars i teixits. S'ha estudiat l'expressió del gen en planta jove i en embrions somàtics d'alzina surera. El sistema d'embriogènesi somàtica ha permès estudiar l'expressió del gen en resposta a diferents tipus d'estrès de forma molt més ràpida i repetitiva. Les propietats de coordinació metàl·lica de la proteïna s'han estudiat per tècniques espectromètriques i espectroscòpiques. També s'han analitzat per aquestes tècniques pèptids mutants derivats de la MT d'alzina surera, amb un enfoc destinat a entendre la interacció entre les diferents parts de la proteïna per a la formació de l'agregat metàl·lic. Aquests estudis s'han realitzat en col·laboració amb el grup de la Dra. Sílvia Atrián del Departament de Genètica, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona i de la Dra. Mercè Capdevila del Departament de Química, Facultat de Ciències, Universitat Autònoma de Barcelona. Les dades han estat processades en gran part per Jordi Domènech. Els estudis de coordinació metàl·lica s'han complementat amb assajos de funcionalitat en llevat. En general s'aporten dades rellevants desconegudes fins ara sobre l'estructura i la funció de les MTs de planta.

ÍNDEX TEMÀTIC

ÀMBIT I ANTECEDENTS DEL TREBALL	1
ORGANITZACIÓ DE LA MEMÒRIA	3
I. INTRODUCCIÓ	5
1. Les metal·lotioneïnes	
2. Metal·lotioneïnes en plantes	
3. Aspectes funcionals de les MTs	
II. OBJECTIUS	31
III. RESULTATS	
1. <i>Article 1.</i> A plant type 2 metallothionein (MT) from cork tissue responds to oxidative stress	37
2. <i>Article 2.</i> Functional insight into plant metallothionein domains : physiological metal binding and protein folding	51
3. <i>Article 3.</i> En QsMT el domini central, típic de les MTs de planta, és essencial per lligar i detoxicar Cd <i>in vivo</i>	77
IV. DISCUSSIÓ GENERAL	103
V. CONCLUSIONS	113
VI. MATERIAL I MÈTODES	117
1. Material biològic	
2. Mètodes de manipulació d'àcids nucleics	
3. Assajos de complementació funcional en llevat.	
4. Expressió, purificació i anàlisi de QsMT i els pèptids truncats	
5. Detecció de mRNA en seccions histològiques, hibridació <i>in situ</i>	
VII. BIBLIOGRAFIA	151
VIII. ANNEX	163
Agraïments	

ÀMBIT I ANTECEDENTS DEL TREBALL

El treball s'emmarca dins un projecte més ampli que es du a terme en el Laboratori del Suro, Universitat de Girona, centrat en l'estudi del fel·lema d'alzina surera (*Quercus suber* L.) a nivell molecular. Amb aquest objectiu es va construir una llibreria de cDNA de cèl·lules de fel·lema en procés de suberització i es van identificar diversos gens implicats en la resistència a l'estrès. Alguns d'aquests gens podrien tenir un paper important en la supervivència d'aquestes cèl·lules durant la síntesi i acumulació de suberina. Entre aquests gens s'hi troba *QsMT* (*Quercus suber metallothionein*), objecte d'estudi en aquesta memòria.

El fel·lema d'alzina surera

El fel·lema és la capa més externa de la peridermis, un complex de teixits que substitueix funcionalment l'epidermis durant el creixement secundari de les plantes. El fel·lema està format per diverses capes de cèl·lules que durant la diferenciació impregnen les parets de suberina i ceres. Aquestes modificacions impermeabilitzen la paret cel·lular a l'aigua i als gasos i confereixen propietats antimicrobianes, convertint al fel·lema en una barrera imprescindible que protegeix els teixits més interns davant la radiació, pèrdua d'aigua i entrada de patògens. A més el fel·lema també es forma durant la cicatrització de ferides. La suberina té un component polialifàtic i un component polifenòlic que se sintetitzen independentment i en forma de monòmers, es secreten a la paret cel·lular i polimeritzen per l'acció de lacases i peroxidases. Tant la síntesi com la polimerització dels components de la suberina estan associades a espècies reactives d'oxigen i estrès oxidatiu (Whetten i Sederoff, 1995). Per altra banda, les cèl·lules del fel·lema van quedant progressivament aïllades del medi que les envolta, sense aport d'aigua i nutrients a través de l'apoplast. Durant la diferenciació i fins a la mort cel·lular aquestes cèl·lules estan sotmeses a un fort estrès metabòlic amb un important component oxidatiu.

La capa generatriu del fel·lema és el fel·logen, un meristema secundari que es forma per desdiferenciació de cèl·lules del còrtex o del floema secundari. El fel·logen genera externament fel·lema i internament fel·loderma, en un procés asimètric amb molta més formació de fel·lema que fel·loderma. El conjunt de fel·loderma, fel·logen i fel·lema és la peridermis. Com que el fel·lema és impermeable, les cèl·lules que queden a l'exterior moren, formant el ritidoma o escorça externa. En la majoria d'espècies el fel·logen és temporal, després d'algunes divisions totes les cèl·lules es diferencien i el ritidoma es descama i cau. Llavors, algunes capes de cèl·lules més internes que formen part del còrtex o del floema secundari es desdiferencien per formar el nou fel·logen.

El fel·lema d'alzina surera, en canvi, presenta unes característiques úniques respecte la resta d'espècies llenyoses que el fan especialment interessant. Per una banda forma un anell

permanent i continu, que envolta tot el tronc o branca i no es desprèn, i per altra banda té una composició molt rica i homogènia en suberina. Aquestes característiques fan que en l'alzina surera cada any s'acumulin vora 60 capes de cèl·lules mortes amb una paret molt rica en suberina, i es converteixen en el que comercialment es coneix com a suro.

La llibreria de cDNA de fel·lema

La naturalesa senescent de les cèl·lules suberitzades i la dificultat d'aïllar teixits en suberització fan que aquest procés sigui molt desconegut a nivell molecular. El nostre grup ha desenvolupat una tècnica que permet aïllar fel·lema actiu d'alzina surera de forma fàcil i ràpida, proporcionant un model ideal per a l'estudi. A partir de fel·lema en maduració es va construir una llibreria de cDNA, on la major part dels clons aïllats codifiquen per proteïnes que s'indueixen en resposta a l'estrès (Taula 1). La nostra hipòtesi de treball és que aquestes proteïnes formen part d'una resposta de protecció que permet a les cèl·lules sobreviure i acumular suberina durant un cert temps en les condicions d'estrès endogen fort, principalment de component oxidatiu, que es donen en el fel·lema.

Taula 1. Clons de la llibreria de cDNA de fel·lema d'alzina surera registrats als bancs de dades.

número d'accés	nom	nom del gen
AJ000691	<i>Qs_hsp17</i>	small heat shock protein class I (sHSP)
AJ243825	<i>hsp17b</i>	small heat shock protein class I (sHSP)
AJ243826	<i>hsp17c</i>	small heat shock protein class I (sHSP)
AJ243827	<i>hsp17d</i>	small heat shock protein class I (sHSP)
AJ000692	<i>Qs_olp</i>	osmotin like protein (OLP)
AJ277599	<i>Qs_mt</i>	metallothionein (MT)
AJ001347	<i>Qs_rpl41</i>	ribosomal protein L 41
AJ001346	<i>Qs_rpl15</i>	ribosomal protein L 15
AJ277600	<i>Qs_rps</i>	ribosomal protein S 28

QsMT, una metal·lotioneïna de planta de tipus 2

En aquest treball s'estudia QsMT, una metal·lotioneïna aïllada de la llibreria de cDNA de fel·lema d'alzina surera. Les MTs són proteïnes molt riques en cisteïnes que lliguen metalls per enllaços metall-tiolat. Se'ls atribueix principalment les funcions d'homeòstasi i emmagatzematge de metalls essencials, i en animals s'ha demostrat que tenen una gran capacitat antioxidant. Per altra banda, les MTs s'estan convertint en diana d'estudis de bioremediació molt importants per descontaminar sòls, aigües i l'atmosfera. No obstant, les MTs de planta són molt desconegudes tant a nivell funcional com estructural.

L'estudi d'una MT aïllada en un teixit excepcional com el fel·lema d'alzina surera és interessant per la informació que pot aportar sobre els processos cel·lulars del fel·lema durant la maduració i sobre la funció i mode d'acció de les MTs de planta en general.

ORGANITZACIÓ DE LA MEMÒRIA

Aquesta memòria s'organitza en vuit apartats: Introducció, Objectius, Resultats, Discussió, Conclusions, Material i mètodes, Bibliografia i Annex.

I. INTRODUCCIÓ. S'introdueixen les metal·lotioneïnes a nivell estructural i funcional. S'ha organitzat en tres apartats que fan referència a les característiques estructurals de les MTs en general, a les característiques específiques de les MTs de planta, i a les funcions generals de les MTs.

II. OBJECTIUS. S'expliquen els objectius generals i els objectius concrets del treball, encarat a l'estudi de QsMT per aportar informació sobre alguns dels trets més desconeguts de les MTs de planta: el seu paper davant l'estrès oxidatiu i les característiques de coordinació metàl·lica.

III. RESULTATS. Es presenten en forma de tres articles que en conjunt cobreixen els objectius proposats.

Article 1. Fa referència a la localització de l'expressió del gen QsMT en teixits d'alzina surera i en resposta a l'estrès oxidatiu en embrions somàtics, i a l'anàlisi dels trets bàsics de la coordinació metàl·lica de QsMT envers Cu, Zn i Cd.

Article 2. S'estudien les característiques espectroscòpiques i espectromètriques de QsMT i de tres pèptids mutants generats a partir de la seqüència de QsMT envers els metalls fisiològics Cu i Zn per entendre la participació de les diferents regions de la proteïna en la coordinació metàl·lica i funcionalitat.

Article 3. S'analitza la complexitat de la coordinació metàl·lica a Cd de QsMT i els pèptids mutants derivats de QsMT amb implicacions sobre el plegament i funció d'aquesta proteïna envers el Cd. Aquest article correspon als darrers resultats no publicats i es presenta en la seva forma provisional en català.

IV. DISCUSSIÓ GENERAL. Es discuteixen de forma conjunta les aportacions d'aquest treball.

V. CONCLUSIONS.

VI. MATERIAL I MÈTODES. En aquest apartat es descriu de forma detallada i conjunta els protocols utilitzats en el Laboratori del Suro. En cadascun dels articles es descriu de forma més general la metodologia utilitzada.

VII. BIBLIOGRAFIA. Inclou la bibliografia citada en la Presentació, Introducció, Discussió general i Material i mètodes.

VIII. ANNEX. Es presenten dos treballs realitzats en el decurs d'aquesta tesi que han servit per posar a punt i mantenir el sistema d'embriogènesi somàtica en alzina surera. S'organitza en una petita introducció i dos articles publicats.

Article 4. S'estudia l'origen unicel·lular o multicel·lular dels embrions somàtics d'alzina surera mitjançant tècniques de microscòpia electrònica.

Article 5. S'estudia el patró d'acumulació d'una proteïna d'estrès aïllada de la llibreria de cDNA de fel·lema en els embrions somàtics d'alzina surera.

I. INTRODUCCIÓ

I. INTRODUCCIÓ

1. LES METAL·LOTIONEÏNES (MTs)	9
1.1. Estructura general de les MTs	
1.1.1. <i>Preferència metàl·lica</i>	
1.2. Caràcter multigènic i especialització funcional	
1.3. Classificació de les MTs	
2. METAL·LOTIONEÏNES EN PLANTA	15
2.1. Estructura de les MTs de planta	
2.1.1. <i>Preferència metàl·lica</i>	
2.2. Caràcter multigènic, classificació de les MTs de planta	
2.3. Especialització funcional	
2.4. Fitoquelatines	
3. ASPECTES FUNCIONALS DE LES MTs	21
3.1. Regulació de metalls pesants i protecció contra la toxicitat	
3.1.1. <i>Homeòstasi de metalls essencials, les Zn-MTs i les Cu-MTs</i>	
3.1.2. <i>Destoxicació de metalls pesants, les Cd-MTs</i>	
3.1.3. <i>MTs i metalls pesants en plantes</i>	
3.2. Balanç redox i estrès oxidatiu	
3.2.1. <i>Estrès oxidatiu i MTs en plantes</i>	

1. LES METAL·LOTIONEÏNES

Les metal·lotioneïnes (MTs) són proteïnes de baix pes molecular (6-9 KDa) molt riques en cisteïnes i amb capacitat de lligar metalls per enllaços metall-tiolat. El nombre de cisteïnes pot representar una tercera part del total d'aminoàcids i el contingut en sofre i metalls fins el 20% del seu pes. Les MTs van ser aïllades i identificades al 1957 en còrtex renal equí com a proteïnes d'unió a cadmi (Margoshes i Vallee, 1957), essent el primer lligand biològic de Cd que es coneixia. Des d'aleshores s'han descrit en una gran varietat d'organismes eucariotes i procariotes com a lligands de diferents ions metàl·lics, principalment coure i zenc.

Les MTs més estudiades són les de mamífer, de les que se n'ha caracteritzat l'estructura, el tipus d'unió a metall i alguns aspectes de la regulació gènica. Malgrat el relatiu desconeixement funcional, per la seva excepcional capacitat de lligar i intercanviar metalls es considera que les MTs participen principalment en l'homeòstasi dels elements traça Zn i Cu i en la protecció contra la toxicitat de metalls pesants, majoritàriament Cd (Kagi, 1991). A més, com que els residus cisteïnics són sensibles a l'oxidació per espècies d'oxigen reactives, s'atribueix a les MTs un possible paper en la regulació i/o protecció de l'estrès oxidatiu (Coyle *et al.*, 2002). Per la seva capacitat quelant de metalls i pels processos en els que intervenen, les MTs estan rebent especial atenció en medicina i bioremediació.

Les MTs de planta són més desconegudes, formen un grup molt més heterogeni que les de mamífer i presenten diferències estructurals importants respecte d'aquestes. Es coneix que el gen s'indueix per diversos metalls, especialment Cu i Zn, però no s'ha pogut demostrar la capacitat antioxidant de la proteïna *in vivo* i es dubta de la seva participació en la destoxicació del Cd. En planta, la funció destoxicant de Cd la fan majoritàriament les **fitoquelatines** (PCs), petits pèptids molt rics en cisteïnes de sintetitzats enzimàticament (Cobbett, 2000; Clemens *et al.*, 2002).

1.1. Estructura general de les MTs

Les MTs més ben conegudes són les de mamífer, codificades per una família multigènica estructuralment molt homogènia. Són proteïnes monomèriques de 60-68 aminoàcids, 20 dels quals són cisteïnes formant agrupacions del tipus CXC, CXXC i CC (on C representa una cisteïna i X un aminoàcid diferent a C) (Figura 1). Totes les cisteïnes de la proteïna es troben en forma reduïda i els grups tiol coordinats a ions metàl·lics per enllaços metall-tiolat (Kagi, 1991). Cada molècula pot lligar fins a 7 equivalents de metall bivalent (Figura 1). Les MTs no contenen histidina, aminoàcids aromàtics, ni elements d'estructura secundària, i només adopten l'estructura funcional quan estan associades a metalls (Kagi, 1991).

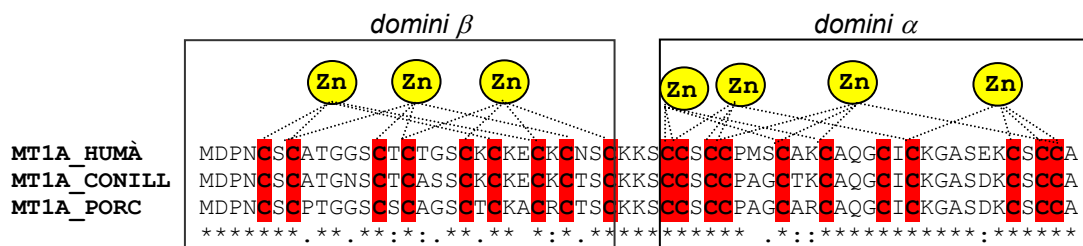


Figura 1. Alineament ClustalW de tres seqüències aminoacídiques de MTs de mamífer. En vermell es senyalen les cisteïnes. S'indiquen els dos dominis rics en cisteïnes (domini β i domini α) i les posicions de coordinació metàl·lica per a metalls bivalents (Zn).

La particularitat dels enllaços entre els grups tiol de les cisteïnes i els metalls confereix a aquestes proteïnes unes característiques espectroscòpiques úniques pròpies dels complexos metall-tiolat. Utilitzant tècniques d'anàlisi espectroscòpiques Otvos i col·laboradors resolen que les MTs de mamífer es pleguen formant dues estructures discretes o agregats metàl·lics (Otvos i Armitage, 1980), i uns anys més tard es determina per primera vegada l'estructura d'una MT per cristal·lografia, la MT2 de fetge de rata (Furey *et al.*, 1986, revisada per Robbins *et al.*, 1991). Es resol que les MTs es pleguen formant agregats metàl·lics que segueixen un model de coordinació tetraèdrica en unió a metall bivalent, on cada ió metàl·lic coordina amb quatre àtoms de sofre provinents de les cisteïnes. Els grups tiol de les cisteïnes poden participar en la coordinació d'un sol metall (tiols terminals) o bé en la d'ions metàl·lics adjacents (tiols pont). Les MTs de mamífer formen dos agregats metàl·lics independents, formats pel domini beta (β) en posició amino terminal i pel domini alfa (α) en posició carboxil terminal (Figura 2):

- domini β , aminoàcids 1-30 en MT2, té 9 cisteïnes en agrupacions del tipus CXC i CXXC, pot unir fins a 3 equivalents d'ions bivalents.
- domini α , aminoàcids 32-61 en MT2, té 11 cisteïnes en agrupacions del tipus CXC, CXXC i CC, pot unir fins a 4 equivalents d'ions bivalents.

Enllaçant els dos dominis queda una petita zona central formada per 2-3 aminoàcids no cisteïnics, de manera que la proteïna adopta forma d'halterí (Figura 2).

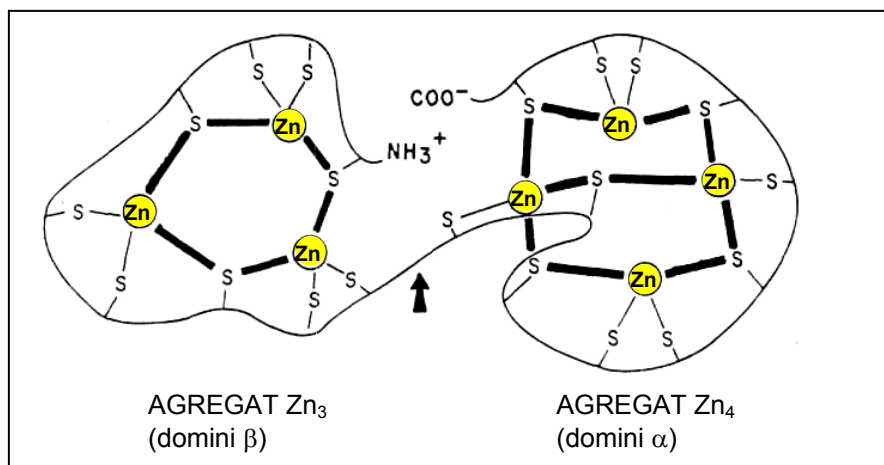


Figura 2. Esquema del plegament en agregats metàl·lics de les MTs. Quatre ions bivalents (Zn) estan coordinats en el domini β i tres en el domini α de la proteïna. Es senyala la zona central d'unió entre els dos agregats metàl·lics (fletxa). Adaptat de Fischer *et al.*, 1998.

L'estabilitat de la proteïna ve determinada majoritàriament pels enllaços intramoleculars entre cisteïnes i metalls i per ponts d'hidrogen. Els dos agregats metàl·lics mostren certa independència estructural i funcional, ja que expressats separatament els dominis conserven la capacitat de coordinació metàl·lica (Capdevila *et al.*, 1997).

En els darrers anys s'estan descrivint i caracteritzant estructuralment noves MTs que difereixen en alguns aspectes del model mamífer, el que ha portat a ampliar-ne la definició. En general es consideren MTs totes aquelles proteïnes de baix pes molecular (<9000 Da) i elevat contingut en sofre i metalls (15-20% del total del seu pes) amb homologia estructural amb les MTs de mamífer.

Una de les MTs més estudiades és la codificada pel gen *CUP1* de *Saccharomyces cerevisiae*. Aquesta MT consta de 53 aminoàcids, 12 dels quals són cisteïnes, i lliga 7 ions de Cu formant un sol agregat metàl·lic. Al plegar-se, els enllaços Cu-cisteïna queden amagats en un nucli hidrofòbic que impedeix la interacció del Cu amb l'aigua i per tant la desestabilització i pèrdua

del Cu (Bertini *et al.*, 2000) i dona resistència a la digestió per proteases (Peterson *et al.*, 1996). En el fong *Magnaporthe grisea* s'ha descrit una MT de 22 aminoàcids i 6 cisteïnes capaç d'unir dos àtoms de Zn formant un sol agregat metàl·lic (Tucker *et al.*, 2004) possiblement amb la participació d'una histidina en l'enllaç metàl·lic. En el cianobacteri *Synechocystis* la MT SmtA té 56 aminoàcids, 9 dels quals són cisteïnes, i uneix 4 ions de Zn en un sol agregat en el qual tres histidines participen en l'enllaç metàl·lic (Daniels *et al.*, 1998, Blindauer *et al.*, 2001). També en en l'equinoderm *Strongylocentrotus purpuratus* (eriçó de mar) s'ha resolt per RMN l'estructura d'una MT de 64 aminoàcids amb 20 cisteïnes que es plega formant dos agregats metàl·lics independents, en aquest cas de forma similar a les MTs de mamífer (Riek *et al.*, 1999).

1.1.1. Preferència metàl·lica

Les MTs tenen una estructura dinàmica que els permet coordinar tant metalls monovalents (Cu) com divalents (Zn, Cd, Hg, Ag,...), de manera que el seu contingut metàl·lic és variable en funció de la composició en metalls del medi. No obstant, es considera que les MTs tenen preferència metàl·lica per un metall o per una composició metàl·lica determinada, amb els que la proteïna adopta l'estructura més estable. La preferència metàl·lica s'ha considerat com un dels paràmetres més importants per deduir-ne la funció, i se sol determinar (i) *in vivo*, ja sigui estudiant els metalls que n'indueixen la síntesi o per extracció i caracterització de la proteïna directament de teixit, o (ii) *in vitro*, produint la proteïna heteròlogament en presència d'un o diversos metalls i comparant l'estequiometria i estabilitat de les diferents formes (Palacios, 2003).

Les MTs de mamífer s'han trobat majoritàriament associades a Zn, tot i que pot ser desplaçat per Cu o per Cd. La capacitat d'intercanvi de metalls depèn dels grups tiol i de les espècies metàl·liques, però en general és més ràpida en el domini β , més reactiu (genera 18 enllaços cisteïna-metall-cisteïna), que en el domini α , més estable (genera 24 enllaços cisteïna-metall-cisteïna) (Otvos i Armitage, 1980; Zangger *et al.*, 2001). A més les MTs poden lligar metalls diferents (formes heterometàl·liques), i s'ha observat que els metalls bivalents tenen tendència a unir-se al domini α , mentre que el domini β uneix preferentment metalls monovalents (Nielson i Winge, 1984). Les MTs de seqüència similar que difereixen en la preferència metàl·lica s'anomenen isoformes metàl·liques, i es desconeix quins paràmetres de la seqüència ho determinen.

En MTs d'altres animals no mamífers la variabilitat augmenta molt i se n'han trobat amb preferència pel Zn, pel Cu i pel Cd (Dallinger *et al.*, 1997).

1.2. Caràcter multigènic i especialització funcional

Les MTs formen una família multigènica. En ratolí s'han descrit 4 gens que codifiquen per MTs, tots dins d'una regió de 50 kb en el cromosoma 8, mentre que en humà s'han descrit 17 gens agrupats en el cromosoma 16 (Palmiter, 1998). Les MTs de mamífers s'han agrupat en quatre subfamílies (MT1, MT2, MT3 i MT4), de composició i propietats químiques molt similars (Figura 3) però diferent patró d'expressió.

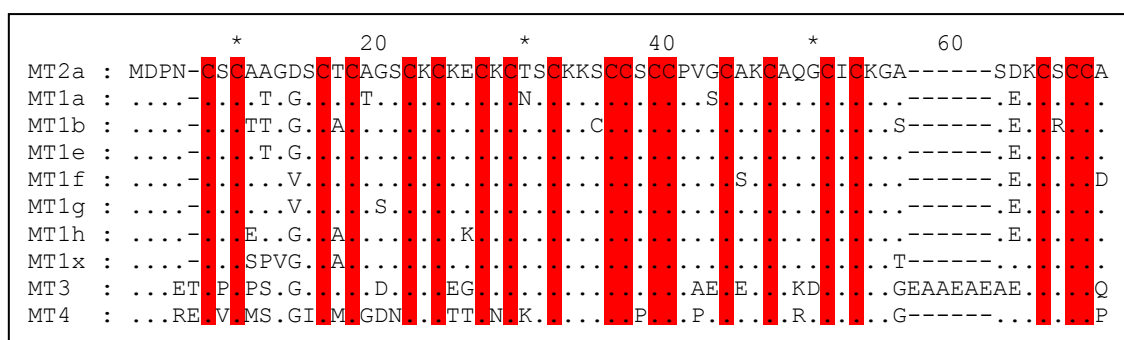


Figura 3. Alineament de les seqüències aminoacídiques de les MTs funcionals d'humà conegudes. S'indiquen els aminoàcids que difereixen de MT2a. Les cisteïnes es senyalen en vermell. Adaptat de Coyle, 2002.

En mamífer, les MTs d'expressió més ubíqua són les de les subfamílies MT1 i MT2, presents en pràcticament tots els òrgans incloent fetge, ronyó, intestí, pàncrees, timus, i cervell, i són induïbles per diversos factors com glucocorticoides, citoquines, espècies reactives d'oxigen i ions metàl·lics, especialment Zn i Cd (Vasak i Hasler 2000). La subfamília MT3 és específica de cervell i la seva expressió no és induïble per la majoria d'estímuls que indueixen les MT1 i MT2. Finalment, la subfamília MT4 s'ha trobat únicament durant la diferenciació de teixits epitelials estratificats del sistema digestiu (Quaife *et al.*, 1994).

1.3. Classificació de les MTs

La classificació inicial de les MTs va ser proposada per Fowler i Kojima (Fowler *et al.*, 1987, Kojima, 1991) en relació al nombre i distribució de les cisteïnes. Segons aquesta classificació les MTs s'agrupen en tres classes. La **classe I** engloba totes les MTs de mamífer i aquelles que no essent de mamífer tenen una seqüència i distribució de cisteïnes similar. La **classe II** engloba la resta de MTs amb una seqüència i distribució de les cisteïnes diferent a les de mamífer, on s'hi inclouen les MTs d'invertebrats, fongs, procarïotes i MTs de planta codificades

genèticament. La **classe III** correspon a les fitoquelatines (PCs), polipèptids rics en cisteïnes sintetitzats enzimàticament molt diferents en estructura i composició a la resta de MTs.

Recentment el nombre de MTs descrites ha augmentat molt i ha calgut una classificació més àmplia i acurada. Actualment es tendeix a utilitzar una classificació que agrupa les MTs en 15 famílies, incloent-hi subfamílies i subgrups, que engloba la primera classificació i a més té en compte aspectes fil-logenètics (Kojima *et al.*, 1999). La família 1 correspon a les MTs de vertebrats; les famílies 2, 3, 4, 5, 6 i 7 corresponen respectivament a mol·luscs, crustacis, equinoderms, dípters, nemàtodes i ciliats; les famílies 8, 9, 10, 11, 12 i 13 corresponen a diferents MTs de fongs; la família 14 és la de procariotes i les MTs de plantes formen la família 15. La classificació inclou una setzena família per agrupar les fitoquelatines i altres pèptids de síntesi enzimàtica semblants a les MTs (informació més detallada: www.unizh.ch/~mtpage/MT.html i <http://www.expasy.org/cgi-bin/lists?metallo.txt>).

2. METAL·LOTIONEÏNES EN PLANTES

Amb l'objectiu de trobar MTs vegetals es va intentar aïllar proteïnes associades a Cd amb elevat contingut en cisteïnes en teixits de planta. No obstant, el que s'aïllava eren petits pèptids rics en cisteïnes de seqüència molt repetitiva i sintetitzats enzimàticament. Sense cap evidència de MTs vegetals es va assumir que aquests pèptids eren l'equivalent funcional de les MTs animals en planta, i se'ls va anomenar fitoquelatines (PCs) (Cobbett i Goldsbrough 2002).

La primera indicació d'una MT de planta es dona a l'any 1987, quan Lane i col·laboradors van aïllar i seqüenciar parcialment una proteïna de la llavor de blat que contenia grans quantitats de Zn similar a les MTs animals, la van anomenar *Ec protein* (Early cysteine-labelled protein) (Lane *et al.*, 1987). Al 1990 dos grups descriuen gairebé simultàniament dos gens que codifiquen per MTs en planta: Miranda i col·laboradors el descriuen en una orquídea (*Mimulus guttatus*) en el cribatge d'una llibreria de cDNA per detectar gens relacionats amb la tolerància al Cu (Miranda *et al.*, 1990), mentre que Evans i col·laboradors el descriuen en pèsol (*Pisum sativum*), aïllat com a clo expressat de forma molt abundant en l'arrel (Evans *et al.*, 1990). Des d'aleshores s'han descrit un gran nombre de gens en diferents espècies, i s'han fet estudis d'expressió que els relaciona principalment amb l'homeòstasi del Cu, especialment en processos de senescència d'òrgans i teixits. En general, però, tant funcionalment com estructural són proteïnes bàsicament desconegudes.

2.1. Estructura de les MTs de planta

Són proteïnes petites (45-85 aminoàcids), amb elevat contingut en cisteïnes (10-17) i amb capacitat de lligar metalls. Les cisteïnes formen agrupacions del tipus CXC, CXXC i/o CC i generalment estan distribuïdes en dues regions als extrems amino i carboxil terminal (excepcionalment en tres regions). La zona central d'enllaç entre les dues regions riques en cisteïnes té aproximadament 40 aminoàcids (excepcionalment 10-15 aminoàcids) i no té cisteïnes. La llargada de la zona d'enllaç contrasta amb la de les MTs de mamífer, de 2-3 aminoàcids, i presenta altres particularitats com la presència d'alguns residus aromàtics i/o alguna histidina.

L'estudi del plegament i de les característiques de coordinació metàl·lica de les MTs de planta s'ha vist molt limitat fins ara per la dificultat d'aïllar la proteïna intacta de teixit vegetal, principalment degut a la proteòlisi que es dona en la zona central d'enllaç (Cobbett i Goldsbrough, 2002). De fet, tot i que la seqüència parcial aïllada per Lane al 1987 va poder ser identificada com a MT, se sospita que molts dels complexos pèptid-metall aïllats anteriorment i que es van identificar com a PCs eren en realitat petits fragments de MTs (Cobbett i Goldsbrough, 2002).

Les primeres dades sobre l'estructura de les MTs de planta provenen dels treballs de Kille i col·laboradors. Els autors van clonar una MT de pèsol (PsMT_A) en *E. coli*, la van sobreexpressar en presència de Cd (Kille *et al.*, 1991) i després de diversos passos de purificació van recuperar la fracció proteica rica en Cd. Quan la van analitzar per seqüenciació aminoacídica, esperant identificar PsMT_A, van comprovar que no es tractava de la proteïna sencera sinó de les dues regions riques en cisteïnes sense la zona central d'enllaç. Amb aquests resultats Kille i col·laboradors van proposar que les MTs planta es deuen plegar en un sol agregat metàl·lic format per la interacció de les dues regions riques en cisteïnes, i en el que la regió central no participa en la unió a metall (Figura 4). Des de llavors aquest és el model de plegament que s'ha establert com a vàlid, sense cap més evidència experimental que el corrobori o el contradigui.

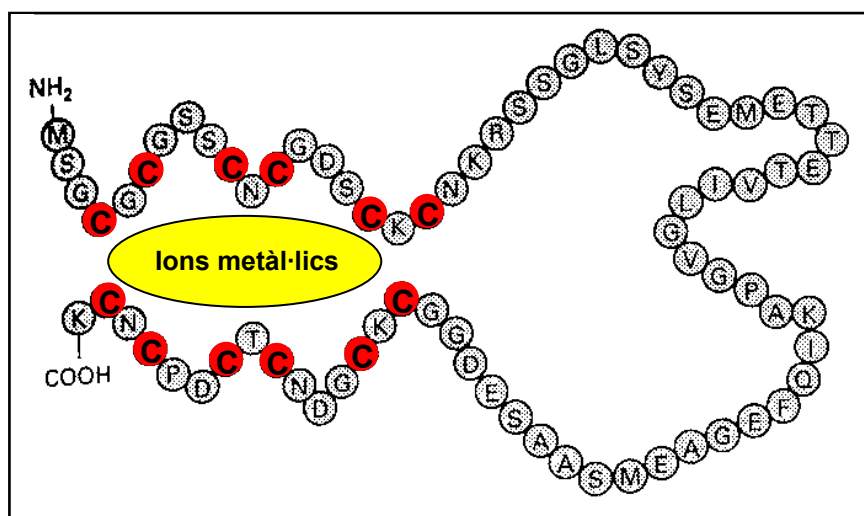


Figura 4. Model de plegament de les MTs de planta proposat per Kille i col·laboradors (Kille, 1991). En vermell es senyalen les cisteïnes. No es coneix les posicions de coordinació a ions metàl·lics.

Recentment s'han fet dues aproximacions teòriques al plegament de MTs de planta. En un cas s'estudia una MT de kiwi de 63 aminoàcids, 10 dels quals són cisteïnes situades en les regions amino terminal (4 cisteïnes) i carboxil terminal (6 cisteïnes), i una zona central d'enllaç de 32 aminoàcids. Per a l'estudi del plegament s'utilitzen programes bioinformàtics amb algorismes per calcular les distàncies geomètriques entre els àtoms (Zhu *et al.*, 2000). Contràriament al

model proposat per Kille, els autors conclouen que aquesta proteïna podria formar dos agregats metàl·lics independents sense intervenció de la zona central, que funcionaria d'enllaç de manera anàloga a les MTs d'animal (Figura 2). En la segona aproximació teòrica publicada, s'ha comparat la seqüència de dues MTs de tipus 3 de Brassicàcies (*Arabidopsis thaliana* i *Thlaspi carulescends*) amb les seqüències i els motius estructurals presents als bancs de dades utilitzant el servidor 3D-PSSM (Roosens *et al.*, 2004). Els autors mostren una similitud significativa entre la regió carboxil terminal de les MTs de planta i el domini β de les MTs d'animal, però no troben similituds per la regió amino terminal. A partir de similituds amb estructures conegudes obtenen un model d'agregat metàl·lic independent per a la zona carboxil terminal. Els autors remarquen, però, que el menor nombre de cisteïnes (6 i 7 enlloc de les 9 de mamífer) i la diferent composició aminoacídica, fan que aquest model sigui encara especulatiu.

2.1.1. Preferència metàl·lica

Es coneix que les MTs de planta poden lligar Cu, Zn i Cd quan s'expressen heteròlogament en *E. coli* (Foley *et al.*, 1997). L'expressió de MTs d'*Arabidopsis* en diferents soques mutants de *S. cerevisiae* incrementa la tolerància d'aquestes al Cu i al Cd (Zhou i Goldsbrough, 1994; Lee *et al.*, 2004), i en soques mutants de *Synechococcus* augmenten la tolerància al Zn (Robinson *et al.*, 1996). Però així com en animals s'han fet molts estudis que permeten comparar l'estructura i afinitat de les MTs envers diversos metalls, les úniques dades sobre preferència metàl·lica en MTs de plantes són en relació a la resposta del gen a l'excés de metalls. En aquest sentit, en general és acceptat que es dona una forta expressió del gen per excés de Cu, però en canvi els resultats són variables respecte el Zn i el Cd (Guo *et al.*, 2003; Brkljacic *et al.*, 2004). Segurament la complexitat de MTs vegetals fa impossible generalitzar un sol comportament.

2.2. Caràcter multigènic, classificació de les MTs de planta

Les MTs de planta formen una família més heterogènia que les MTs d'animal. S'han agrupat en quatre tipus principals (MT1, MT2, MT3 i MT4) en funció del nombre i distribució de les cisteïnes (Figura 5) (Cobbett i Goldsbrough, 2002).

- tipus 1: tenen 6 motius CXC distribuïts de forma igual en les dues regions riques en cisteïnes dels extrems amino i carboxil terminal, la zona central d'enllaç és d'aproximadament 40 aminoàcids. Excepcionalment s'han descrit variants com les de la família de les Brassicàcies, que inclou la planta model *Arabidopsis thaliana*, amb un residu cisteïna extra i la zona central molt més curta (6-10 aminoàcids).
- tipus 2: són estructuralment molt semblants a les anteriors però amb agrupacions de cisteïnes del tipus CXC, CC i CGGC en la regió amino terminal.

- tipus 3: tenen la regió carboxil terminal molt similar a les anteriors, i l'amino terminal conté quatre cisteïnes, tres amb una seqüència molt conservada (CGNDCD) i la quarta més allunyada.
- tipus 4: tenen tres zones riques en cisteïnes amb 5-6 cisteïnes cadascuna, majoritàriament en agrupacions del tipus CXC, i separades per seqüències de 10-15 aminoàcids no cisteínics. La primera MT de planta que es va identificar (*Ec protein*) era una MT del tipus 4 (Lane *et al.*, 1987).

La seqüenciació del genoma d'*Arabidopsis* (*Arabidopsis Genome Initiative*, 2000) ha revelat que en aquesta espècie hi ha 7 gens que codifiquen per MTs funcionals, amb representants dels quatre tipus, i un pseudogen que no es transcriu. Els gens *MT1a* i *MT1c* es troben propers en el cromosoma 1; *MT2a* i *MT3* es troben en el cromosoma 3; *MT4a* i *MT4b* en el cromosoma 2 i *MT2b* en el 5. *MT1b* és un pseudogen i també es troba en el cromosoma 5. La distribució en diversos cromosomes també ha estat observada en arròs i tomata, en canvi en cotó s'han descrit 3 gens que codifiquen per MTs agrupats en un fragment de menys de 10 kb dins el mateix cromosoma (Hudspeth *et al.*, 1996). Donat que s'han trobat gens que codifiquen pels quatre tipus de MTs en espècies tan distants com l'arròs (monocotiledònia) i *Arabidopsis* (dicotiledònia), es considera que tots els vegetals deuen contenir un o més gens de cadascun dels quatre tipus de MT.

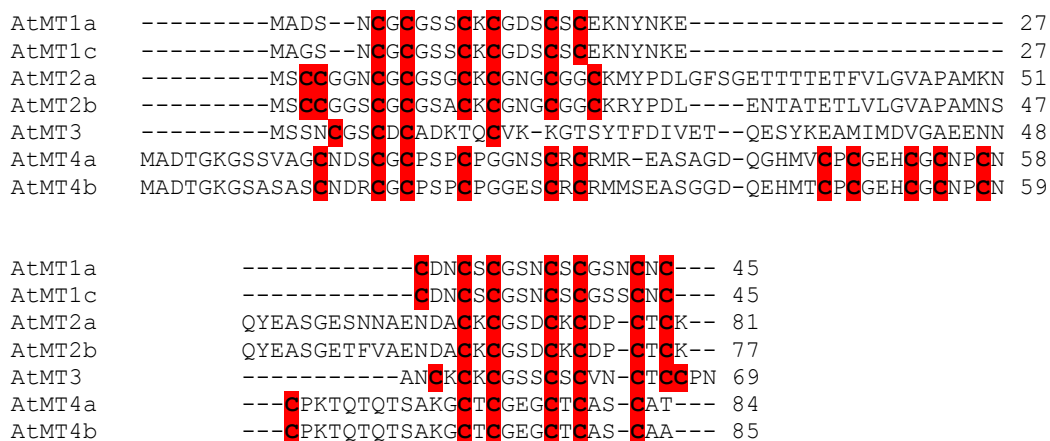


Figura 5. Alineament ClustalW de les MTs funcionals d'*Arabidopsis thaliana*. Les cisteïnes estan marcades en vermell.

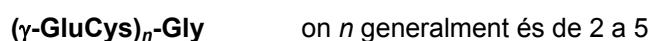
2.3. Especialització funcional

Diversos estudis han intentat determinar un patró d'expressió diferencial entre els membres de la família de les MTs. Els resultats, però, són molt variables en funció de l'espècie vegetal, el teixit i la intensitat de l'estrès. Per exemple, pel que fa al tractament amb coure disminueix l'expressió de les MTs de tipus 2 en *Mimulus guttatus* (Miranda *et al.*, 1990) i soja (Kawashima *et al.*, 1991), l'augmenta en *Arabidopsis* (Zhou i Goldsbrough, 1994; Murphy i Taiz, 1995), pèsol (Evans *et al.*, 1992) i arròs (Hsieh *et al.*, 1995), i no es veu afectada en *Nicotiana glutinosa* (Choi *et al.*, 1996).

En general les MTs de planta d'expressió més ubíqua són les dels tipus 1 i 2. Entre els factors que n'estimulen l'expressió s'hi troben metalls pesants, l'àcid abscíic, l'estrès salí, la senescència, ferides i atac per patògens (Hsieh *et al.*, 1995; Choi *et al.*, 1996; Buchanan-Wollaston, 1994). Diversos autors han observat que les MTs del tipus 1 són més presents en l'arrel que en òrgans aeris, mentre que les de tipus 2 seguirien justament el patró contrari (Cobbett i Goldsbrough, 2002). Les MTs del tipus 3 s'han trobat majoritàriament en fruits madurs (Ledger i Gardner, 1994; Clendennen i May, 1997), mentre que les de tipus 4 s'han trobat de forma molt abundant en la llavor (Kawashima *et al.*, 1992; Liu *et al.*, 1995).

2.4. Fitoquelatines

Les fitoquelatines (PCs) són petits pèptids sintetitzats enzimàticament molt rics en cisteïnes i amb capacitat de lligar metalls pesants. Estan formats per diferents repeticions del dipèptid γ -GluCys, seguit d'una Gly terminal:



El precursor de les PCs és el glutatió reduït (GSH: γ -GluCysGly), i l'enzim que en catalitza la biosíntesi és la fitoquelatina sintasa (PCS), descrit per primera vegada per Grill i col·laboradors al 1989 (Grill *et al.*, 1989). Tot i que inicialment es va creure que les PCs eren exclusives de planta i anàlogues funcionalment a les MTs de mamífer, actualment s'ha identificat l'enzim PC sintasa en llevats (Clemens *et al.*, 1999), en el nemàtode *Caenorhabditis elegans* (Clemens *et al.*, 2001; Vatamaniuk *et al.*, 2001) i en procarotes (Tsuji *et al.*, 2004).

Es considera que el paper principal de les PCs és la destoxicació de Cd. En cultius de cèl·lules vegetals, la síntesi de PCs es dona pocs minuts després de l'exposició a Cd i plantes deficientes en l'enzim PCS són més sensibles al Cd (Clemens, 2001). En menor mesura la síntesi de PCs es veu induïda per altres metalls (Ag, Bi, Pb, Zn, Cu, Hg i Au). Tot i que s'ha demostrat que té

capacitat de lligar els metalls fisiològics Zn i Cu, no hi ha evidències que les PCs puguin tenir un paper rellevant en l'homeòstasi i metabolisme d'aquests metalls (Cobbett, 2000).

– *Formació de complexos metàl·lics*

Les PCs formen complexos multimèrics en unió a metalls. Els primers complexos que es formen en associació al Cd són de baix pes molecular (LMW), es transporten activament a la vacuola i es formen complexos d'elevat pes molecular (HMW) (Figura 6). S'ha vist que en els complexos LMW, i especialment en els HMW, s'incorpora l'ió sulfur (S^{2-}) com a element estructural en un nucli intern de Cd-S (en anglès *crystallite*) envoltat per les PCs. Aparentment la incorporació del ió S^{2-} augmenta la capacitat quelant de metalls i l'estabilitat de l'agregat (Cobbett, 2000). En soques mutants de *S. pombe* la incapacitat de generar S^{2-} a partir de molècules amb contingut en sofre impedeix la formació dels complexos HMW i provoca una major susceptibilitat de la cèl·lula al Cd (Juang *et al.*, 1993).

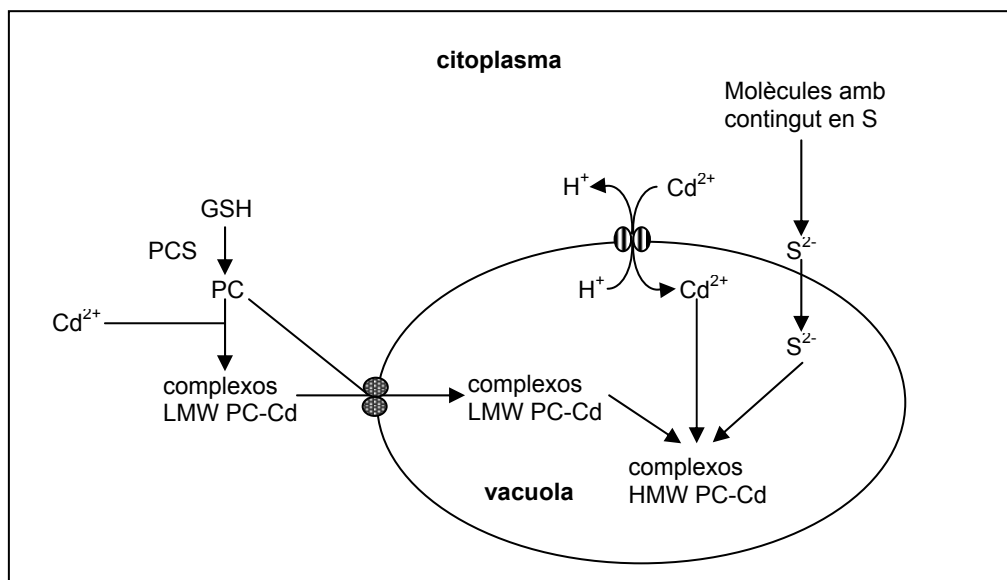


Figura 6. Gens i funcions que contribueixen en la detoxicació del Cd en plantes i llevats per part de les PCs. La figura és una composició de dades provinents de diferents organismes. Els detalls del metabolisme del sofre no són ben coneguts. PCS, enzim fitoquelatina sintasa. Adaptat de Cobbett, 2000.

3. ASPECTES FUNCIONALS DE LES MTs

La conservació dels dominis rics en cisteïnes i de l'estructura en agregats metàl·lics de les MTs en diferents organismes, la presència en pràcticament tots els teixits i òrgans estudiats i els factors que les indueixen, han fet pensar que aquestes proteïnes tenen funcions biològiques essencials per la vida.

En mamífers se les ha relacionat amb un gran nombre d'activitats cel·lulars. S'ha vist, per exemple, que les MTs s'incrementen en processos de proliferació cel·lular i càncer (Woo i Lazo, 1997), i que poden tenir efectes antiapoptòtics (Vasak i Hasler, 2000). També s'ha vist que són induïdes en la resposta inflamatòria, associant la seva expressió a la presència d'estrès oxidatiu i degeneració cel·lular (Penkowa *et al.*, 2001), i les MTs de tipus 3 s'han descrit com a factor inhibidor del creixement neuronal en cervell, present en pacients normals i absent en malalts d'Alzheimer (Uchida *et al.*, 1991).

Amb l'obtenció d'organismes i línees cel·lulars transgèniques que sobreexpressen o són deficientes en MTs es va pensar que es podria resoldre en gran part la funció d'aquestes proteïnes. Els organismes transgènics més utilitzats han estat ratolins que tenen anul·lats els gens de la MT1 i la MT2, les dues formes més abundants de MTs en mamífers, i ratolins que tenen anul·lat el gen per la MT3, més abundant en cervell. Sorprenentment, els resultats mostren que aquests organismes no presenten anomalies importants durant el creixement i desenvolupament en condicions normals (Coyle *et al.*, 2002, Palmiter, 1998).

Per tant, tot i la rellevància dels processos en els que s'expressen les MTs, encara es coneix poc el seu paper fisiològic. Per la composició i propietats de coordinació metàl·lica, les línees d'estudi se centren en possibles funcions com (i) la regulació de l'homeòstasi d'elements traça, principalment el Zn i el Cu, (ii) la destoxicació de metalls pesants, especialment el Cd i (iii) la protecció contra l'estrès oxidatiu.

3.1. Regulació de metalls pesants i protecció contra la toxicitat

Per al metabolisme de les cèl·lules alguns ions metàl·lics són essencials o beneficiosos, però els mateixos metalls a concentracions inapropiadament altes o baixes, o la sola presència d'altres elements, pot ser tòxica i s'han de desenvolupar sistemes de regulació molt estrictes. Els metalls pesants tenen afinitat pels grups metall-sensitius d'enzims i proteïnes estructurals, pels lípids de membrana i pels àcids nucleics, i poden provocar l'alteració i/o inhibició de determinats processos cel·lulars, la permeabilitat de cèl·lules i orgànuls, i mutacions en els àcids nucleics modificant l'expressió gènica (Clemens, 2001; Rea *et al.*, 2004). La toxicitat dels metalls també ve donada perquè poden desplaçar el Ca^{2+} , afectant la funció reguladora de gran diversitat de processos metabòlics i de l'adhesió cel·lular (Waisberg *et al.*, 2003).

Per al control de la concentració de metalls pesants dins els estrets marges fisiològics cal una funció molt coordinada dels mecanismes de captació, quelació, translocació i emmagatzematge en diferents compartiments cel·lulars i teixits. A més, com que el control sovint és imperfecte, la cèl·lula es pot veure exposada a metalls pels quals no existeixen mecanismes específics, com el Cd (Clemens *et al.*, 2002). Un aspecte bàsic en el control dels efectes dels metalls pesants és que pràcticament mai es troben en forma d'ions lliures hidratats en la cèl·lula, sinó que estan units a lligands i qualsevol moviment implica intercanvi entre aquests lligands. La concentració de Cu i Zn lliure en les cèl·lules de mamífer s'ha estimat en menys d'un àtom per cèl·lula (Rae *et al.*, 1999).

Els principals donadors d'electrons cel·lulars pels metalls són els grups carboxil, els grups amino i els grups tiol. Els ions de Cu, Cd, Hg, Pb i Zn tenen afinitat pels centres sulfur que proporcionen les MTs i les PCs, formant complexos que resulten menys tòxics pel metabolisme de la cèl·lula (Rea *et al.*, 2004). Es postula que les MTs actuen com a lligands i reservori d'aquests metalls, intercanviant-los amb les metal·loproteïnes i enzims segons els requeriments de la cèl·lula en cada moment, o senzillament retenint-los en forma no reactiva per evitar la toxicitat.

3.1.1. Homeòstasi de metalls essencials, les Zn-MTs i les Cu-MTs

– Les Zn-MTs

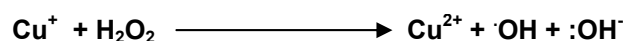
El zenc és el segon metall més comú en les cèl·lules de mamífer després del ferro (Suhy *et al.*, 1999). El Zn és essencial per la funció i estabilitat d'un gran nombre d'enzims i metal·loproteïnes, dels que forma part com a cofactor o com a element estructural. Participa en aspectes del metabolisme intermediari, regulació de l'expressió de gens, emmagatzematge, síntesi i acció d'hormones peptídiques i en el manteniment estructural de la cromatina i biomembranes (Suhy *et al.*, 1999; Vasak i Hasler, 2000; Tapiero i Tew, 2003). En els últims anys s'han identificat i estudiat proteïnes transportadores que regulen l'entrada de Zn en les

cèl·lules de mamífers (Kambe *et al.*, 2004), però en canvi es coneix poc la regulació a nivell intracel·lular. Les MTs de mamífer majoritàriament contenen Zn i en són els principals lligands intracel·lulars (Suhly *et al.*, 1999). Es postula que actuen de reservori capaç de lligar aquest metall en determinades condicions i d'alliberar-lo de forma estrictament regulada, possiblement per variacions del potencial redox (Andrews, 2000). Oxidants dèbils molt comuns en les cèl·lules com el glutatió oxidat (GSSG), poden oxidar les cisteïnes de les MTs, cedint el Zn a metal·loproteïnes que sovint tenen menys afinitat per aquest metall que les pròpies MTs (Jacob *et al.*, 1998; Jiang *et al.*, 1998). En condicions fisiològiques normals la taxa entre el glutatió reduït i l'oxidat (GSH/GSSG) en la cèl·lula impedeix la transferència de Zn de les MTs a les metal·loproteïnes, però en alteracions de l'estat redox, o en compartiments cel·lulars determinats, s'afavoreix l'intercanvi (Andrews, 2000; Giles *et al.*, 2002).

Les funcions específiques de les MTs en l'homeòstasi del Zn en la cèl·lula i l'organisme són encara molt desconegudes. Ratolins transgènics deficientes en MT1 i MT2 no presenten anomalies en condicions normals de creixement, però en canvi són més sensibles que els ratolins control quan són tractats amb dietes tant pobres com amb un excés de Zn, suggerint que les MT1 i MT2 protegeixen contra la deficiència i la toxicitat d'aquest metall (Dalton *et al.*, 1996; Kelly *et al.*, 1996). Per tant, sense ser essencials, sembla que les MTs donarien alguna mena d'avantatge evolutiu en moments d'estrès per dèficit o excés de metalls fisiològics o de canvis en l'estat redox de la cèl·lula, i proporcionarien un reservori de metalls (Coyle *et al.*, 2002; Kelly *et al.*, 1996).

– Les Cu-MTs

El coure és un element traça essencial per la funció de molts enzims cel·lulars. Els ions de Cu poden adoptar diferents estats redox: l'oxidat Cu(II) o Cu^{2+} , i el reduït Cu(I) o Cu^+ , permetent-li jugar un paper pivotal en la fisiologia de la cèl·lula com a cofactor catalític en la química redox d'enzims, respiració mitocondrial, absorció de ferro, eliminació de radicals lliures i entrecruament de l'elastina entre altres (Tapiero *et al.*, 2003). Però aquesta bivalència també li dóna la capacitat de catalitzar la producció de radicals hidroxil ($\cdot\text{OH}$), la més perillosa de les espècies reactives d'oxigen, a partir de H_2O_2 mitjançant la reacció de Fenton o Haber-Weiss:



L'activitat redox no controlada del Cu per dèficit, excés o coordinació aberrant poden ser letals per la cèl·lula, de manera que hi ha una xarxa molt important de proteïnes controlant estrictament la incorporació, l'eflux i la concentració de Cu. Dins la cèl·lula, el Cu està coordinat per diverses proteïnes entre elles el glutatió, les metal·lotioneïnes, ATPases tipus P transportadores de Cu, i altres transportadors i xaperones que assegurin l'alliberament específic en determinats compartiments cel·lulars i proteïnes.

Les MTs de mamífer, encara que majoritàriament tenen preferència pel Zn, també poden lligar Cu *in vivo*, i s'ha demostrat que cèl·lules que sobreexpressen MTs són més resistents a la toxicitat per Cu (Klaassen *et al.*, 1999). En aquest sentit la malaltia de Wilson, que afecta a humans, està provocada per una deficiència en l'eflux del Cu. La manca d'eflux fa que el Cu s'acumuli en concentracions tòxiques en el fetge. S'ha observat que el principal quelant de Cu en el fetge d'aquests pacients són les MTs, de manera que s'està utilitzant l'administració de Zn en la dieta per induir l'expressió de MTs i afavorir la destoxicació del Cu (Brewer, 2000).

Per altra banda, algunes MTs d'organismes no mamífers coordinen majoritàriament Cu. En el cas dels artròpodes, la concentració disponible de Cu és especialment important per la síntesi de l'hemocianina, el transportador d'oxigen dependent de Cu. En *Drosophila* s'han caracteritzat dues MTs (MTO i MTN) i les dues han resultat isoformes preferents de Cu (Domenech *et al.*, 2003).

En el llevat *Saccharomyces cerevisiae* la MT endògena *CUP1* és essencial per al metabolisme del Cu i la principal responsable de destoxicar la cèl·lula a concentracions elevades de Cu. El gen *CUP1* es troba en diverses còpies en soques salvatges (*CUP1'*), però s'han generat soques mutants amb una sola còpia (*CUP1^s*) o cap còpia funcional del gen (*cup1^A*). S'ha demostrat que anul·lar o limitar l'expressió de *CUP1* augmenta la sensibilitat al Cu (Karin *et al.*, 1984), mentre que la sobreexpressió del gen n'incrementa la resistència. Les soques mutants deficientes en *CUP1* han estat molt utilitzades en estudis de complementació funcional en llevat per demostrar *in vivo* la capacitat quelant de Cu de metal·lotioneïnes i altres proteïnes de diferents organismes (Zhou i Goldsbrough 1994).

3.1.2. Destoxicació de metalls pesants, les Cd-MTs

Tant el Zn com el Cu de les MTs de mamífer poden ser ràpidament desplaçats pel cadmi quan hi ha intoxicació per aquest metall. Ratolins transgènics i línees cel·lulars de mamífer deficientes en MTs són més sensibles a la toxicitat per Cd (Masters *et al.*, 1994; Palmiter, 1998) i la sobreexpressió n'incrementa la resistència (Liu *et al.*, 1995; Klaassen *et al.*, 1999). De fet, a partir de dades sobre Cd en sang i la seva toxicitat en diferents teixits se n'ha proposat un model de cinètica en l'organisme, en el qual les MTs hi tenen un paper cabdal (Nordberg i Nordberg, 1987). Tot i això, sembla poc probable que les MTs s'hagin conservat evolutivament com a mecanisme de protecció contra el Cd, un metall rar i eminentment producte de l'activitat humana. Es pensa que la manca de mètodes d'eflux específics pel Cd en la cèl·lula situaria les MTs en la primera línia de defensa contra la toxicitat, però s'assumeix que no és aquest el seu paper principal sinó una propietat inherent a la seva capacitat quelant de metalls (Palmiter, 1998).

També en altres organismes s'han aïllat MTs amb capacitat quelant i destoxicant de Cd. El cas més conegut és el de la serp terrestre *Helix pomatia*, capaç de tolerar concentracions molt

elevades de Cd per l'efecte quelant d'una MT específica per aquest metall (Dallinger *et al.*, 1997).

3.1.3. MTs i metalls pesants en plantes

Les plantes, com a organismes sèssils estan en contacte molt directe amb el medi que les envolta. A través de les arrels absorbeixen l'aigua i els nutrients, que transportaran via xilema i floema a parts en creixement (noves gemmes, flors i fruits) i a les fulles. Per altra banda les fulles obren els seus estomes al CO₂ per sintetitzar matèria orgànica aprofitant l'energia del Sol, amb pèrdues d'aigua per evaporació. Per tant les plantes són molt sensibles als canvis en el medi i contínuament s'han d'afrontar a diversos estressos de tipus físic, químic i biòtic.

Amb la industrialització, cada vegada més els sòls i l'atmosfera tenen traces d'elements tòxics i elevades càrregues de metalls pesants. La principal entrada de metalls en la planta és a través de l'arrel, que disminueix el creixement quan les concentracions de metalls arriben a nivells tòxics. Precisament la taxa de creixement de l'arrel en presència de metalls pesants s'utilitza molt en plàntules de l'organisme model *Arabidopsis thaliana* per identificar individus especialment tolerants o sensibles a metalls, d'interès en aplicacions biotecnològiques i de fitoremediació. En un següent pas els metalls arriben a les fulles i afecten principalment mitocondris i cloroplasts, generalment estimulant la producció d'espècies d'oxigen reactives (ROS). Fisiològicament la planta presenta clorosi, disminució del creixement, estímul de la senescència i finalment la mort (Clemens, 2001; Hall, 2002).

Com a mecanismes adaptatius de la planta a l'exposició a metalls s'hi troben en primer lloc sistemes d'impermeabilització de les membranes, compartimentació en la cèl·lula, generalment en el vacúol o paret cel·lular, i finalment la quelació per lligands intracel·lulars (Clemens, 2001; Hall, 2002). Els principals lligands intracel·lulars de metalls en les plantes són les fitoquelatines i les metal·lotioneïnes (Mejare i Bulow, 2001).

Pel que fa a l'expressió dels gens de MTs és majoritàriament el Cu, més que el Zn o el Cd, el metall que indueix la síntesi de MTs, i en diverses espècies s'ha relacionat la tolerància al Cu amb un elevat nivell de l'expressió del gen (Garcia-Hernandez *et al.*, 1998; Cobbett i Goldsbrough, 2002). Gens codificants per MTs sovint s'han trobat fortament expressats en arrel, especialment en la punta i pèls absorbents, i es creu que és per la necessitat de quelar els metalls entrants del sòl (Rauser, 2000). També és molt elevada la seva expressió en floema, on es postula una funció de transport (Guo *et al.*, 2003). Un cas especialment interessant és l'elevat nivell d'expressió observat en tricomes de fulles d'*Arabidopsis*. Aquestes cèl·lules, molt més grans de mida que les seves companyes del parènquima o epidermis, acumulen metalls i substàncies tòxiques (Kupper *et al.*, 2000), actuant possiblement com a zones d'abocament o de reserva en la planta. Es postula que les MTs estarien complexant aquests metalls per fer-los menys tòxics (Guo *et al.*, 2003).

En teixits senescents i cèl·lules sotmeses a mort cel·lular, processos estrictament regulats que impliquen la remobilització de nutrients per a la seva reutilització, hi ha una inducció molt forta de l'expressió de MTs. En aquests teixits la sola presència del Cu i altres metalls alliberats com a producte de degradació de les proteïnes i components cel·lulars podria justificar la inducció de MTs com a agents quelants de metalls, per evitar-ne la toxicitat fins al moment de la mort cel·lular i reditribuir-los en zones en desenvolupament o d'acumulació. La retranslocació de nutrients és un procés molt important per la planta llenyosa, es donarà en molts moments del seu cicle vital especialment durant la caiguda de les fulles, escorça i fruits.

Per altra banda les MTs de tipus 3, majoritàriament presents en les cèl·lules de fruits carnosos, podrien tenir un paper en la protecció d'aquestes cèl·lules, sotmeses a condicions d'osmosi i pressió hídrica molt elevades, en l'estovament de la paret cel·lular, o en la protecció contra atacs per patògens (Davies i Robinson, 2000). Les MTs del tipus 4, molt abundants en llavor i majoritàriament unides a Zn, podrien emmagatzemar aquest metall per cedir-lo a les proteïnes i enzims que intervenen en els primers estadis de la germinació (Kawashima *et al.*, 1992).

– *Bioremediació de metalls pesants, fitoremediació*

Per la seva capacitat quelant de metalls pesants, les MTs han rebut molt d'interès per aplicacions en biotecnologia com la destoxicació de sòls i aigües. La contaminació de sòls i aigües és un greu problema pel medi ambient i la salut humana, i actualment els metalls s'han convertit en un dels agents de pol·lució més importants producte de la industrialització global. Existeixen grans àrees de terres que contenen quantitats perilloses de metalls pesants com Cd, Zn, Cu, Pb, Cr, Hg i Ni. Concretament el Cd és un dels metalls que més ha augmentat en els últims anys. Els metalls pesants poden passar per varis organismes en la cadena tròfica fins arribar a l'home, creant en cada pas greus problemes de salut.

La fitoremediació és un dels mètodes de destoxicació que s'està desenvolupant més, ja que permet, a través de la planta, extreure metalls del sòl, neutralitzar-los i transportar-los a la part aèria, de fàcil recol·lecció i processat (Mejare i Bulow, 2001). Per a la fitoremediació calen plantes amb elevada tolerància a metalls i amb capacitat d'acumular-los. Tot i que existeixen hiperacumuladors naturals, generalment tenen poca biomassa, creixen lentament o són difícils de cultivar. La millora de les propietats quelants de metalls de les plantes per enginyeria genètica requereix un bon coneixement dels processos biològics involucrats en l'absorció del metall del sòl per les arrels, el transport de l'arrel a la tija, la tolerància als metalls i l'acumulació. A més, aquests coneixements també s'estan utilitzant en altres aplicacions importants per a la salut humana, com la de generar plantes amb elevat contingut de metalls essencials per solventar deficiències provocades per dietes pobres en aquests metalls, generalment en països subdesenvolupats (Clemens *et al.*, 2002). S'han identificat diversos gens que intervenen en la tolerància i acumulació de metalls, però malauradament se'n coneixen pocs implicats en els passos d'absorció i transport, de manera que actualment l'enginyeria genètica de plantes

només pot intervenir en la tolerància i acumulació. La majoria de plantes generades fins ara per fitoremediació sobreexpressen gens implicats en la biosíntesi de quelants de metall, especialment el glutatió, la fitoquelatina sintasa i les MTs (Tong *et al.*, 2004). En aquest sentit PCs i MTs resulten molt interessants perquè acumulen els metalls de forma no tòxica (Dominguez-Solis *et al.*, 2001).

3.2. Balanç redox i estrès oxidatiu

Les espècies d'oxigen reactives (ROS, Reactive Oxygen Species) són derivats de l'O₂ parcialment reduïts o activats. Són molt reactius i poden portar a la destrucció oxidativa de la cèl·lula. La formació d'espècies d'oxigen reactives és inherent a un metabolisme energètic i a la respiració. En la cèl·lula hi ha moltes fonts potencials de generar ROS, es formen o bé en processos estrictament regulats com a missatgers per a la transducció del senyal, o bé inevitablement com a subproducte tòxic de reaccions metabòliques en condicions normals i especialment d'estrès. Petites variacions en el nivell basal de ROS intracel·lular modulen l'expressió de gens, la modificació postranscripcional de proteïnes i en general el metabolisme de la cèl·lula. L'estat redox de la cèl·lula dependrà del balanç entre les vies de producció i de neutralització de ROS, i es manté relativament constant si no es sotmet a condicions oxidants dràstiques (Giles *et al.*, 2002).

L'estrès oxidatiu es produeix quan les cèl·lules no poden neutralitzar els efectes nocius de les espècies d'oxigen reactives sobre les biomolècules. Algunes de les conseqüències són la peroxidació de lípids, que determina la pèrdua de funció de les membranes, la desnaturalització i inactivació de proteïnes, i mutacions en els àcids nucleics degudes a la desestabilització i trencament de les cadenes i a modificacions de les purines i pirimidines (Meneghini, 1997). Totes aquestes reaccions sovint aboquen en la disfunció i la mort cel·lular. L'acció dels radicals lliures es considera la causa principal de l'acumulació de mutacions lligades als processos d'envelliment cel·lular i carcinogènesi, i s'ha associat a nombroses malalties com l'Alzheimer o el Parkinson (Facheris *et al.*, 2004).

Els processos de transducció del senyal en respostes cel·lulars apropiades a través de ROS requereixen la presència de proteïnes redox-sensitives que puguin tenir una oxidació/reducció reversible i es puguin activar o desactivar depenent de l'estat redox cel·lular. El grup tiol (-SH) de les cisteïnes pot oxidar-se formant grups sulfènic (-SOH), sulfínic (-SO₂H) i sulfònic (-SO₃H), o pot formar enllaços disofre intra o intermoleculars, provocant canvis de conformació en les proteïnes que afecten la seva estructura i funció. S'ha vist que molts factors de transcripció tenen cisteïnes en llocs estratègics, de manera que l'estat redox determina la seva unió a DNA i la transcripció dels gens (Giles *et al.*, 2002). Les ROS poden oxidar les proteïnes redox-sensitives directament o indirectament a través de molècules tipus GSH o tioredoxines.

En les MTs el grup –SH de les cisteïnes és redox-sensitiu, de manera que es poden oxidar en determinades condicions, alliberant els metalls d'unió i constituint un potent neutralitzador de radicals lliures (Thornalley i Vasak, 1985). Hi ha diverses evidències que impliquen a les MTs amb la protecció contra l'estrès oxidatiu: MTs de mamífer expressades en llevats mutants deficients en l'enzim antioxidant superòxid dismutasa (SOD) el poden substituir funcionalment en la protecció contra l'estrès oxidatiu (Tamai *et al.*, 1993); agents capaços de generar radicals lliures, com per exemple el paraquat o l'H₂O₂, indueixen la síntesi de MTs en el fetge de ratolins i en cèl·lules Hepa de rata de forma dependent de dosi (Andrews, 2000; Bauman *et al.*, 1991); en el promotor de diverses MTs de mamífers s'han trobat elements de resposta antioxidant (ARE, *Antioxidant Response Elements*); cèl·lules que sobreexpressen MTs sobreviuen més a l'estrès oxidatiu, i cèl·lules que no n'expressen i ratolins transgènics amb els gens de les MT1 i MT2 anul·lats són més sensibles (Lazo *et al.*, 1995; Pitt *et al.*, 1997; Liu *et al.*, 1999); els leucòcits generen espècies d'oxigen reactives citotòxiques per als patògens durant el procés d'inflamació, i a la vegada indueixen la síntesi de MTs possiblement per protegir l'hoste (De *et al.*, 1990). No obstant, es desconeix la regulació de les MTs en la cèl·lula en relació a l'estrès oxidatiu, i la seva participació dins el complex sistema antioxidant.

L'estrès oxidatiu es pot generar tant per excés com per manca de metalls pesants. Per una banda, l'excés de metalls essencials, o la sola presència de metalls citotòxics, estimula la formació d'espècies d'oxigen reactives per intervenció directe en la cadena d'electrons i/o per la inactivació d'enzims i metal·loproteïnes (Prasad, 1999). Per altra banda, molts enzims antioxidants són metal·loenzims que necessiten metalls com a cofactors. Si aquests metalls no són presents o ho són en baixa concentració, la maquinària antioxidant serà insuficient i es produirà estrès. Les MTs podrien tenir un doble paper en la regulació del potencial redox de la cèl·lula tant a través de les propietats antioxidants dels grups tiol com a través de la capacitat de quelar i alliberar metalls pesants (Fabisiak *et al.*, 2002).

3.2.1. Estrès oxidatiu i MTs en plantes

De la mateixa manera que en animals, hi ha molts processos en el desenvolupament normal de la planta que estan associats a les espècies d'oxigen reactives i són potencials generadors d'estrès oxidatiu, com el metabolisme aeròbic que es dona en la fotosíntesi i la respiració, o especialment les vies estimulades en situacions d'estrès com la fotorespiració. En les plantes, la presència de radicals lliures pot inhibir la fotosíntesi per trencament oxidatiu de clorofil·les i carotenoides, per dany oxidatiu de proteïnes i membranes i per la substitució de cofactors en metal·loenzims i metal·loproteïnes. Generalment es manifesta en forma d'inhibició del creixement, clorosi i/o lesions necròtiques (Prasad, 1999).

Entre les fonts productores de ROS més importants en les cèl·lules vegetals s'hi troben les NADPH oxidases, amino oxidases o peroxidases de la paret cel·lular. Aquests enzims intervenen en la resposta a diferents tipus d'estrès i defensa contra patògens, i també en processos com la lignificació i suberització (Whetten i Sederoff, 1995; Vranova *et al.*, 2002), tots

ells processos regulats per ROS que en últim terme poden induir la senescència prematura i mort cel·lular per estrès oxidatiu (Buchanan-Wollaston i Ainsworth, 1997; Miller *et al.*, 1999; Quirino *et al.*, 2000; Navabpour *et al.*, 2003).

L'expressió de MTs en planta és especialment elevada en situacions de senescència, tant si es tracta d'un procés general lligat a l'envelliment (edat) (Buchanan-Wollaston, 1994; Butt *et al.*, 1998) com en determinades situacions com la maduració de fruits o la caiguda de fulles i flors (Davies i Robinson, 2000; Coupe *et al.*, 1995). Es postula que en aquestes situacions són les espècies d'oxigen reactives les que indueixen la síntesi de MTs, que podrien tenir un paper en la protecció contra l'oxidació del DNA i estructures cel·lulars, evitant-ne l'alteració i facilitant l'expressió dels gens de resposta a l'estrès (Buchanan-Wollaston, 1994; Navabpour *et al.*, 2003; Coupe *et al.*, 1995). En suport a aquestes hipòtesis recentment s'ha demostrat que algunes MTs vegetals tenen capacitat antioxidant: en meló, una MT de tipus 2 protegeix el DNA genòmic del trencament per radicals hidroxil *in vitro* (Akashi *et al.*, 2004), amb un efecte depenent de la dosi de MT, i MTs de tipus 2 i 3 d'*Arabidopsis* tenen capacitat antioxidant *in vivo* quan són sobreexpressades en fulles de favera (Lee *et al.*, 2004).

Un cas especialment interessant és el que s'ha observat en arròs durant la resposta a patògens coneguda com a "oxidative burst": l'increment sobtat de ROS en la cèl·lula vegetal infectada per provocar-ne la mort, evitant d'aquesta manera la dispersió del patogen. L'èxit de la resposta recau en la rapidesa de la mort cel·lular, i en arròs s'ha observat que l'expressió de MTs s'inhibeix durant aquest procés (Wong *et al.*, 2004). A més la sobreexpressió de MTs en plantes transgèniques alenteix la mort cel·lular per estrès oxidatiu, i fa la planta més sensible a infeccions. Els autors postulen que possiblement és degut a una activitat antioxidant de les MTs, activitat que convé inhibir quan l'objectiu és precisament la mort cel·lular per estrès oxidatiu. Curiosament, en un altre treball es descriu una MT d'un fong patogen d'arròs que s'expressa majoritàriament en la paret cel·lular del fong durant el procés d'infecció (Tucker *et al.*, 2004). Els autors ho relacionen amb la protecció tant de la cèl·lula hoste com patogen contra l'estrès oxidatiu, el que endarreriria la mort de la cèl·lula vegetal per estrès oxidatiu augmentant per tant la dispersió i patogenicitat del fong.

II. OBJECTIUS

II. OBJECTIUS

En general ens proposem aprofundir en el coneixement de les MTs de planta en alguns dels seus aspectes més rellevants i desconeguts: la resposta del gen a l'estrès oxidatiu, la interacció de la proteïna amb metalls i el plegament.

D'aquesta manera ens plantejem tres objectius concrets: **(1)** localitzar l'expressió de *QsMT* en teixits d'alzina surera i en resposta a l'estrès oxidatiu; **(2)** caracteritzar les propietats de coordinació metàl·lica de *QsMT* envers Cu, Zn i Cd; **(3)** caracteritzar les propietats de coordinació metàl·lica envers Cu, Zn i Cd de pèptids mutants derivats de *QsMT* especialment dissenyats per aportar dades sobre el plegament de les MTs de planta.

1. Localitzar l'expressió del gen *QsMT* en teixits d'alzina surera especialment en relació a l'estrès oxidatiu.

El cDNA de *QsMT* s'ha aïllat d'una llibreria de fel·lema, un teixit senescent multiestressat amb un component d'estrès oxidatiu fort. Les MTs de planta s'han relacionat principalment amb la regulació de l'homeòstasi i emmagatzematge de metalls essencials, però donat que les MTs de mamífer poden tenir un paper antioxidant i participar en la regulació de l'estat redox de la cèl·lula, i donada la naturalesa senescent del teixit on s'ha aïllat *QsMT*, ens ha semblat interessant estudiar la relació entre l'expressió del gen i l'estrès oxidatiu.

El nostre objectiu és estudiar l'expressió del gen en condicions normals i en resposta a l'estrès oxidatiu. Ens hem proposat dos objectius concrets:

1.1. Estudiar el patró general d'expressió de *QsMT* en teixits d'alzina surera.

S'utilitza la tècnica d'hibridació *in situ*. Mitjançant una sonda d'RNA complementària a *QsMT* i que conserva part de la regió no traduïda en 5' (5'UTR), s'hibriden diferents teixits de planta jove i embrió zigòtic d'alzina surera.

1.2. Estudiar l'expressió de *QsMT* en resposta a l'estrès oxidatiu. Es tracten embrions somàtics d'alzina surera amb diferents tipus d'estrès i es detecta l'expressió de *QsMT* mitjançant hibridació *in situ*.

2. Caracteritzar les propietats de coordinació metàl·lica de QsMT envers Cu, Zn i Cd.

La capacitat coordinativa de les MTs respecte diversos metalls és indicativa de la seva possible funció. L'expressió gènica de les MTs de planta s'ha relacionat principalment amb el Cu, però hi ha molt poques dades de coordinació metàl·lica a nivell proteic. El nostre objectiu és conèixer la capacitat coordinativa de QsMT respecte els metalls Cu, Zn i Cd per aproximar-nos al paper fisiològic d'aquestes proteïnes.

2.1. Estudiar la capacitat quelant de Cu *in vivo*. S'expressa QsMT en cèl·lules mutants de *S. cerevisiae* sensibles a Cu i s'analitza la supervivència.

2.2. Estudiar les propietats de coordinació metàl·lica de QsMT envers Cu, Zn i Cd. S'expressa QsMT en *E. coli* en presència dels metalls Cu, Zn i Cd, es purifica la proteïna i s'estudia mitjançant tècniques espectromètriques i espectroscòpiques.

3. Caracteritzar les propietats de coordinació metàl·lica envers Cu, Zn i Cd de pèptids mutants derivats de QsMT especialment dissenyats per aportar dades sobre el plegament de les MTs de planta.

No es coneix el plegament de les MTs de planta ni la contribució dels residus cisteïnics en les propietats finals de la proteïna. En aquest treball utilitzem un enfoc ja establert en l'estudi de les MTs animal que consisteix en expressar per separat cadascuna de les zones riques en cisteïnes i estudiar-ne les propietats de coordinació metàl·lica de forma independent, comparant-les amb les de la proteïna sencera. L'objectiu és deduir la contribució de cadascuna de les parts més significatives de la proteïna en les propietats finals i poder aproximar un model de interacció a metall i plegament.

3.1. Estudiar les propietats de coordinació metàl·lica dels dominis de QsMT envers Cu, Zn i Cd. Es generen tres seqüències mutants de QsMT corresponents a cadascun dels dos dominis rics en cisteïnes i a una quimera que substitueix el domini central per quatre glicines mitjançant tècniques de PCR. S'expressen en *E. coli* en presència dels metalls Cu, Zn i Cd, es purifiquen els pèptids i s'estudien mitjançant tècniques espectromètriques i espectroscòpiques.

3.2. Estudiar la capacitat quelant de Cu i Cd de cadascun dels pèptids mutants *in vivo*. S'expressen els pèptids derivats de QsMT en cèl·lules mutants de *S. cerevisiae* sensibles a Cu i s'analitza la supervivència en medi suplementat amb Cu i en medi suplementat amb Cd.

III. RESULTATS

Article 1

“A plant type 2 metallothionein (MT) from cork tissue responds to oxidative stress”

S'ha observat l'expressió de gens de MTs de planta durant la senescència de fulles i tiges, fruits madurs i com a resposta a ferida entre altres, i s'ha proposat que en aquestes situacions podrien actuar tant en la lligació de metalls com en la neutralització d'espècies reactives d'oxigen. En aquest treball es mostra que les MTs també estan associades a suberització, ja que s'ha identificat un gen activament transcrit en cèl·lules del suro d'alzina surera. Aquest cDNA, aïllat d'una llibreria de cDNA de fel·lema, codifica per una MT de planta del tipus 2 (*QsMT*). El cDNA *QsMT* s'ha expressat en cèl·lules d'*E. coli* crescudes en medi suplementat amb Zn, Cd o Cu, i s'han obtingut les proteïnes recombinants. La caracterització dels respectius agregats metàl·lics suggereix una paper fisiològic relacionat amb el Cu, en acord amb la capacitat de *QsMT* de restituir la tolerància al Cu a llevats deficientes en una MT de Cu endògena. A més, els resultats de hibridació *in situ* mostren una expressió de *QsMT* relacionada majoritàriament amb condicions d'estrès oxidatiu tant endogen, com es dona en el suro o en teixits amb divisió activa, com exogen, per exemple en resposta a tractaments amb H₂O₂ o paraquat. Es discuteix el possible paper de *QsMT* en l'estrès oxidatiu, tant com a neutralitzador d'espècies reactives d'oxigen a través dels grups sulfhidril de les cisteïnes com per la capacitat de quelar Cu.

Article 2

“Plant metallothionein domains: functional insight into physiological metal binding and protein folding”

Les MTs de planta difereixen de les d'animal especialment en la peculiar organització de la seva seqüència, que consisteix en dos dominis terminals rics en cisteïnes enllaçats per una llarga regió central que no conté cisteïnes. El paper dels dominis de les MTs de planta en l'estructura i funció de la proteïna és molt desconegut. En aquest treball s'estudia la contribució dels dominis per separat d'una MT de tipus 2 de planta (QsMT) en la lligació de Cu i Zn *in vivo* i en la capacitat de recuperar la tolerància al Cu de cèl·lules de llevat mutants. Amb aquest objectiu es van generar tres pèptids recombinants que corresponen als dominis rics en cisteïnes N-terminal (N25) i C-terminal (C18) de QsMT, i una quimera en la que la zona central és substituïda per un pont de quatre glicines (N25-C18). Els agregats pèptid-metall produïts en cultius enriquits en Zn o Cu es van analitzar per ESI-MS, ICP-OES i CD i espectroscopia UV-vis, i les dades es van comparar amb les de la proteïna QsMT sencera. Els resultats concorden amb un plegament de QsMT en agregats homometàl·lics per Zn i per Cu seguint un model de plegament en *pinça* en el que les dues regions riques en cisteïnes interaccionen per formar un agregat metàl·lic únic. En aquest model la regió central no contribueix en la coordinació metàl·lica. No obstant, les dades de ZnQsMT (però no les de CuQsMT) suggereixen un paper d'embolcall per aquesta zona central. Per altra banda, els resultats de complementació funcional en cèl·lules de llevat sensibles al Cu suggereixen que en CuQsMT la regió central podria tenir un paper relacionat amb la localització subcel·lular. En general, els nostres resultats aporten les primeres evidències sobre la relació estructura/funció de les MTs de planta mitjançant l'anàlisi de les capacitats de coordinació metàl·lica dels seus dominis per separat.

Article 3

“En QsMT el domini central, típic de les MTs de planta, és essencial per lligar i destoxicar Cd in vivo”

Les MTs de planta són diferents estructuralment de les MTs de mamífer. En planta, les regions riques en cisteïnes dels extrems amino i carboxil terminal són més curtes, i enllaçant aquestes dues regions contenen un domini llarg i sense cisteïnes que no és present en les MTs de mamífer.

En un treball anterior vam descriure l'aïllament i caracterització estequiomètrica envers Cu, Zn i Cd d'una MT típica de planta, QsMT d'alzina surera. Vam determinar que és una MT amb preferència metàl·lica pel Cu i que respecte als metalls bivalents, a diferència del que es dona en MTs de mamífer, QsMT presenta una estequiometria molt diferent per Zn i per Cd, amb una inesperadament elevada capacitat quelant de Cd pel nombre de cisteïnes que té. En un altre treball vam generar i analitzar tres pèptids mutants derivats de QsMT en presència dels metalls fisiològics Cu i Zn, i ens va permetre proposar un model d'interacció entre els dominis rics en cisteïnes per formar un únic agregat metàl·lic. En el treball que presentem a continuació utilitzem la mateixa estratègia per proposar un model de plegament de QsMT amb Cd que explica l'elevada capacitat quelant per aquest metall.

En planta la funció destoxicant de Cd s'ha atribuït tradicionalment a les PCs, que formen complexos oligomèrics amb la participació de S^{2-} per immovilitzar el Cd de forma estable. Els nostres resultats per a QsMT en presència de Cd recolzen el model de plegament en pinça per a les MTs de planta i postulen una elevada capacitat destoxicant de Cd en la que participa l'ió S^{2-} incrementant la capacitat quelant i estabilitzat l'agregat metàl·lic. En aquest model la zona central no participa en l'enllaç metàl·lic però és imprescindible per mantenir la capacitat destoxicant.

IV. DISCUSSIÓ GENERAL

IV. DISCUSSIÓ GENERAL

La identificació d'una metal·lotioneïna (MT) en una llibreria d'expressió de fel·lema va despertar el nostre interès per varis motius. Les cèl·lules del fel·lema són cèl·lules que es diferencien i moren, i durant la diferenciació sintetitzen suberina, un procés que genera un fort estrès oxidatiu. Per altra banda, el fel·lema és un teixit senescent que es va recanviant i s'especula la importància de la retranslocació en els mecanismes implicats en la senescència. Les metal·lotioneïnes, per la seva capacitat d'unió a metalls, poden tenir un paper rellevant tant en la protecció de l'estrès oxidatiu com en l'homeostasi i retranslocació de metalls. El fel·lema de *Q. suber* és remarcable per la gran acumulació de suberina i per el gran nombre de capes de cèl·lules que s'acumulen. Per altra banda, si bé les MTs dels mamífers estan molt ben estudiades, les MT de planta són poc conegudes .

En el nostre treball hem afrontat l'estudi de QsMT a diferents nivells. Per una banda hem estudiat l'expressió del gen en relació a l'estrès oxidatiu en teixits de surera i en llevat. Els resultats són molt interessants doncs suggereixen que QsMT estaria implicada en la protecció contra l'estrès oxidatiu i el manteniment de l'estat redox, si bé els experiments en llevat demostren la complexitat d'aquestes reaccions.

La caracterització espectromètrica i espectroscòpica de la proteïna han permès identificar QsMT com una MT de Cu. La preferència metàl·lica de les MTs és indicatiu del metall al que s'uneix majoritàriament *in vivo*, i per tant de la seva funció. Per estudiar el plegament i per investigar el paper dels dominis de la proteïna hem utilitzat una estratègia basada en l'enginyeria de proteïnes i assajos de complementació en llevat. Els resultats són consistents amb un model de plegament en pinça (*hairpin*) en el qual el domini central no participa en la coordinació metàl·lica. A més, els assajos en llevat suggereixen que la regió central pot tenir un paper important per al transport i/o localització de la proteïna. En resum, amb el nostre treball aportem informació rellevant sobre la relació estructura/funció de les MT de planta que fins ara no havien estat objecte d'aquest tipus d'estudis.

Expressió i estrès oxidatiu

Els estudis d'hibridació *in situ* en plantes i embrions d'alzina surera mostren que existeix una relació entre el patró d'expressió de *QsMT* i l'estrès oxidatiu. Per una banda, *QsMT* s'expressa de forma endògena en cèl·lules i teixits que es troben en situacions metabòlicament associades a un increment d'espècies d'oxigen reactives, i també en cèl·lules que requereixen un control estricte de les condicions redox per a la divisió com són les cèl·lules meristemàtiques. Per altra banda, l'expressió de *QsMT* s'indueix fortament per l'aplicació externa d'agents oxidants.

En el fel·lema d'alzina surera, teixit del qual s'ha aïllat *QsMT*, les taxes de mutació als àcids nucleics són molt elevades, i el tipus de mutació es correlaciona amb el que generen les espècies d'oxigen reactives (ROS) (Jofre *et al.*, 2003). El fel·lema és un teixit multiestressat en el que la combinació dels diferents tipus d'estrès porta, en últim terme, a un estrès oxidatiu fort. Per una banda està sotmès a l'estrès oxidatiu que implica la síntesi de polifenols i substàncies aromàtiques, i per altra al dèficit hídric i nutritiu d'unes cèl·lules progressivament més aïllades per acumulació i polimerització d'aquestes substàncies en la paret cel·lular (Razem i Bernards, 2003). En teixits d'alzina surera s'ha observat que el transcrit de *QsMT* s'acumula majoritàriament en fibres, en vasos del floema i xilema, en l'endodermis i també en cèl·lules de la caliptra. La formació de fibres, endodermis i vasos conductors requereix la lignificació i/o suberificació de les parets cel·lulars, processos associats a la generació d'espècies d'oxigen reactives (Wojtaszek, 1997; Whetten i Sederoff, 1995). Les cèl·lules de la caliptra, que formen el didal protector de l'arrel, són cèl·lules senescents que moren per un procés mediat per espècies reactives d'oxigen i després s'escamen (Pennell i Lamb, 1997).

L'aplicació d'agents oxidants indueix fortament l'expressió de *QsMT*. Els embrions somàtics presenten una expressió basal de *QsMT* en els vasos de xilema i les cèl·lules més meristemàtiques dels àpexs caulinar i radicular i de la massa proliferativa. L'estrès tèrmic a les condicions utilitzades (42°C, 3 hores) augmenta lleugerament l'expressió de *QsMT* en aquestes cèl·lules, però la inducció és molt més evident amb el tractament per agents oxidants (H₂O₂ 0.5 % i paraquat 5 µM).

En cèl·lules amb estrès oxidatiu fort, les MTs podrien actuar protegint estructures cel·lulars i els àcids nucleics, afavorint la supervivència i la resposta antioxidant. S'ha demostrat que les MTs de mamífer poden tenir un efecte antioxidant a través del grup tiol de les cisteïnes, que pot oxidar-se neutralitzant les espècies reactives d'oxigen (Sevier i Kaiser, 2002; Chubatsu i Meneghini, 1993). En planta diversos autors han hipotetitzat una relació entre la forta expressió de MTs en teixits senescents i l'estrès oxidatiu (Buchanan-Wollaston, 1994; Navabpour *et al.*, 2003) i recentment s'ha demostrat que una MT de tipus 2 de meló pot protegir el DNA genòmic de l'atac per radicals hidroxil *in vitro* (Akashi *et al.*, 2004).

Un aspecte interessant és la localització de QsMT en les cèl·lules més meristemàtiques dels embrions somàtics d'alzina surera, que podria estar relacionada amb la importància del manteniment de l'estat redox. És acceptat que les espècies d'oxigen reactives, i especialment el peròxid d'hidrogen (H_2O_2), tenen un paper central en la regulació dels meristems (Vranova *et al.*, 2002; Jiang *et al.*, 2003). La formació d' H_2O_2 en les cèl·lules meristemàtiques com a resultat d'una situació d'estrès desencadena immediatament la inhibició de la divisió (Jiang *et al.*, 2003), essent aquest un procés essencial per mantenir la integritat genòmica, evitant el risc d'acumular mutacions en les següents generacions de cèl·lules. Els grups tiol de diverses proteïnes, les MTs entre elles, participen en la regulació de l'estat redox de les cèl·lules i en la transducció del senyal a través d'espècies d'oxigen reactives (Giles *et al.*, 2002; Cooper *et al.*, 2002). En aquestes cèl·lules QsMT podria estar contribuint en l'estricta regulació de l'estat redox.

Per altra banda, en els estudis de complementació funcional en llevat s'observa que l'expressió de QsMT augmenta la sensibilitat de les cèl·lules a l'estrès oxidatiu, disminuint la supervivència respecte les que no expressen cap MT. L'addició de Cu a baixes concentracions millora la supervivència en tots els casos, suggerint que en presència de MTs el Cu pot ser un factor limitant per a la resposta antioxidant. En aquest sentit, Rae i col·laboradors observen que en cèl·lules de llevat mutant que no expressen MTs l'enzim superòxid-dismutasa (SOD1), un dels enzims antioxidants més conegut i que utilitza Cu com a cofactor catalític, és funcional a una concentració de Cu fins a deu vegades inferior que en les cèl·lules salvatges (Rae *et al.*, 1999), demostrant que existeix una competència pel Cu entre aquest enzim i les MTs. De fet el Cu, tot i ser un metall essencial que forma part de quantitat d'enzims i proteïnes, és alhora molt reactiu, capaç d'estimular la formació d'espècies d'oxigen reactives a partir de l' H_2O_2 mitjançant la reacció de Fenton. Per al manteniment de l'estat redox en la cèl·lula es fa imprescindible un control precís de la concentració i disponibilitat d'aquest metall.

L'aparent contradicció que hem observat entre l'expressió del gen en teixits de surera i l'efecte de la proteïna en llevat en resposta a l'estrès oxidatiu, suggereix que QsMT té una funció estrictament regulada molt sensible a l'estat redox i a la concentració de Cu.

Caracterització metàl·lica

Els estudis espectromètrics i espectroscòpics de QsMT respecte Cu, Zn i Cd mostren QsMT és una MT amb preferència metàl·lica pel Cu. La preferència metàl·lica de les MTs es considera un indicador del metall al que estarà unida majoritàriament la proteïna *in vivo*, i per tant de la seva funció. En aquest sentit l'expressió de QsMT en una soca de llevat mutant sensible al Cu n'incrementa la tolerància, demostrant que efectivament té capacitat quelant de Cu de forma estable i funcional *in vivo*. Possiblement QsMT i altres MTs vegetals similars tenen una funció relacionada amb la regulació de la concentració del metall fisiològic Cu.

Els nostres resultats reforcen les observacions de l'expressió gènica de diverses MTs de planta que suggereixen una funció relacionada amb l'homeòstasi de Cu, com són la inducció d'alguns gens de MT per Cu (Guo *et al.*, 2003; Ma *et al.*, 2003) o la forta correlació entre l'expressió de gens de MT i la tolerància al Cu en diversos ecotips d'*Arabidopsis* i de colís (*Silene vulgaris*) (Murphy i Taiz 1995; van Hoof *et al.*, 2001).

El fet que QsMT també uneixi de forma estable Zn s'atribueix a l'afinitat que tenen els grups tiol de les cisteïnes per diversos metalls. MTs de mamífer amb preferència pel Zn poden coordinar Ag, Hg, Cd i Cu si els teixits o cèl·lules han estat exposats (Haq *et al.*, 2003). No obstant, la capacitat quelant de Zn de QsMT és menor a l'esperada pel nombre de cisteïnes en comparació al que es dona en MTs d'animal. Per altra banda, generalment la inducció de l'expressió gènica de MTs vegetals per Zn és menys freqüent que per Cu (Cobbett i Goldsbrough, 2002). Segurament QsMT pot intervenir en la regulació de la concentració de Zn en determinades situacions, però sembla poc probable una funció principal relacionada amb aquest metall.

Pel que fa al Cd, el contingut metàl·lic de QsMT és molt elevat pel nombre de cisteïnes (6 ions de Cd per 14 cisteïnes), i l'expressió en llevat mostra que és capaç de coordinar aquest metall de forma estable *in vivo* al conferir tolerància a l'estrès per Cd respecte les cèl·lules control. En aquest sentit, s'ha observat recentment que la sobreexpressió de les MTs d'*Arabidopsis* MT2a i MT3 en cèl·lules de favera n'augmenta la protecció contra els efectes nocius del Cd (Lee *et al.*, 2004). Tot i la capacitat destoxicant de Cd d'algunes MTs, en planta és acceptat que aquesta funció la fan principalment les fitoquelatines (PCs) (Cobbett, 2000; Clemens, 2001). Les PCs són petits pèptids molt rics en cisteïnes que inactiven el Cd mitjançant la formació d'agregats multimèrics d'elevat pes molecular i la seva internalització en vacuoles. Els agregats de PCs uneixen el Cd mitjançant la participació imprescindible de l'ió sulfur (S^{2-}) (Cobbett, 2000), que converteix el complex PC-Cd en una estructura molt més estable i eficient. Els nostres resultats mostren que, sorprenentment també QsMT utilitza S^{2-} per la formació de l'agregat metàl·lic, un comportament insòlit entre les MTs. En MTs d'altres organismes s'ha observat la participació d'ions inorgànics, especialment clorurs (Cl⁻), en determinades situacions (Domenech *et al.*,

2003), i s'ha associat a la inestabilitat de l'agregat metàl·lic. No obstant, és la primera vegada que s'observa la participació de S^{2-} resultant en un increment important de la capacitat quelant (6 ions del metall bivalent Cd en comparació als 4 ions del metall bivalent Zn). El Cd té un radi atòmic (151 pm) molt superior al Cu (128 pm), el que podria forçar un plegament inestable de la proteïna. Amb els ions sulfur neutralitzant càrregues positives del Cd, l'agregat metàl·lic podria resultar més estable i conferir a les MTs de planta una propietat destoxicant *in vivo*.

Estudi del plegament

L'estudi detallat de les propietats espectroscòpiques i espectromètriques dels pèptids mutants ens ha permès reforçar la hipòtesi sobre el model de plegament en pinça de les MTs de planta, en el que els dos dominis rics en cisteïnes interaccionen per formar un sol agregat metàl·lic, i on la zona central no participa en l'enllaç a metalls. El model en pinça va ser proposat per Kille l'any 1991, i va ser el primer model de plegament de MTs vegetals. Recentment, amb l'aparició i desenvolupament dels bancs de dades i models de predicció d'estructures tridimensionals, s'han fet algunes aproximacions teòriques *in silico* que postulen un model de plegament en forma d'halterí similar al de les MTs de mamífer, on cada zona rica en cisteïnes forma un agregat metàl·lic independent (Zhu *et al.*, 2000; Roosens *et al.*, 2004). Les nostres dades aporten evidències experimentals que descarten que les zones riques en cisteïnes puguin formar agregats metàl·lics independents de forma estable *in vivo* sense la participació d'altres parts de la proteïna. Per tant els nostres resultats apunten a un model de plegament en pinça per QsMT, i molt probablement per les MTs de planta que comparteixen l'estructura de dues zones riques en cisteïnes enllaçades per una zona central llarga sense cisteïnes (tipus 1, 2 i 3). Les MTs de tipus 4, amb 3 zones riques en cisteïnes, són les úniques en planta que s'han trobat majoritàriament associades al Zn *in vivo*, i fins ara les més desconegudes.

El model en pinça proposat per Kille deixa oberta la qüestió del paper de la zona central, molt més llarga que en MTs d'animal i amb alguns aminoàcids considerats atípics dins les MTs com són els aminoàcids aromàtics. En QsMT ni el patró de dicroisme circular ni l'estequiometria dels pèptids mostren que els aminoàcids de la zona central estiguin participant en l'enllaç metàl·lic. En canvi, hem obtingut dades que evidencien la importància de la zona central en la funció final de la proteïna, i curiosament són diferents segons el metall que QsMT està coordinant.

Quan la proteïna coordina **Zn** la zona central sembla tenir un paper relacionat amb l'estabilitat del pèptid, possiblement embolcallant l'agregat metàl·lic per estructurar-lo i permetre una lligació estable. El Zn és un metall divalent de major radi atòmic que el Cu i menys favorable pel plegament de QsMT. Malgrat cap dels aminoàcids de la zona central forma enllaços metàl·lics, la seva eliminació en el mutant N25-C18 resulta en una disminució de la quiralitat respecte QsMT, mostrant un pèptid molt menys estructurat i apte per a la quelació estable d'aquest metall. A més, la substitució *in vitro* del Zn pel Cu es dona de forma molt més lenta que el que

s'observa en MTs de mamífer, i només després de l'entrada del primer Cu la proteïna sembla canviar la conformació per permetre l'entrada, més ràpida, de la resta de Cu. Possiblement la zona central està embolcallant l'agregat metàl·lic (Figura 7), estabilitzant l'estructura i fent les cisteïnes poc accessibles al Cu o a altres agents amb afinitat pels grups tiol. En altres MTs la substitució del Zn pel Cu és gradual, coexistint formes heterometàl·liques estables que sovint també s'observen *in vivo* (Valls *et al.*, 2001). En QsMT, en canvi, tot i que per ICP-OES s'observa Cu i Zn quan es produeix QsMT en presència de Cu, els resultats indiquen que és poc probable la formació d'espècies heterometàl·liques. Segurament s'estan formant algunes MTs homometàl·liques de Zn a partir del Zn intracel·lular present en *E. coli*, i és aquesta petita barreja de proteïnes homometàl·liques el que provoca el lleuger desviament del patró de CD de Cu-QsMT respecte el patró típic de les MTs de Cu.

Quan QsMT coordina **Cu** la zona central podria estar relacionada amb la regulació i/o localització de la proteïna. Cu-QsMT i Cu-N25-C18 presenten patrons de CD molt similars (Figura 7), indicant que la zona central no forma cap estructura òpticament activa i que a més, en aquest cas, no deu participar en l'estructura ni en l'estabilitat de l'agregat metàl·lic. En canvi, quan es compara la funció destoxicant de Cu *in vivo*, la manca de la zona central en el pèptid N25-C18 repercuteix negativament en la supervivència dels llevats mutants en medi ric en Cu respecte als que expressen QsMT. Per tant la zona central deu ser important per a la correcta funció de la proteïna *in vivo*. El fet que aquesta zona tingui punts susceptibles de modificacions del tipus fosforilació podria indicar que s'estan donant modificacions postraduccionalment importants per la funció de destoxicació de Cu. De fet s'ha demostrat que l'activitat d'algunes MTs de mamífer pot variar per la interacció amb el glutatió (Maret, 1994) i amb l'ATP (Jiang *et al.*, 1998), provocat possiblement per un canvi conformacional en la proteïna modificant la força d'unió a metall. També s'ha observat que la presència d'espècies d'oxigen reactives en la cèl·lula pot induir el moviment de la proteïna citoplasmàtica a nucli (Takahashi *et al.*, 2005), essent la localització subcel·lular un dels reguladors de la funció. Possiblement les variacions en la conformació de QsMT depenent del metall que lliga condiciona la seva ubicació i/o funció.

És en coordinació a **Cd** on l'eliminació de la zona central té un efecte més clar en l'estructura del pèptid, que tot i que conserva una forta quiralitat, forma els agregats metàl·lics majoritàriament per dimerització. Possiblement al ser el Cd un metall més gran, la restricció imposada per el pont de 4 Gly en el pèptid N25-C18 força una estructura desplegada i per tant cal una estabilització mitjançant la formació de dímers. La capacitat quelant de Cd i el contingut en S^{2-} es mantenen proporcionalment similars als de QsMT, de manera que la zona central no deu participar ni en l'enllaç metàl·lic ni en el contingut en S^{2-} . Per altra banda, els resultats de viabilitat en llevat mostren que l'expressió de QsMT confereix molta més tolerància al Cd que l'expressió de N25-C18. També en aquest cas la zona central està actuant de forma imprescindible en la funció de QsMT, possiblement estabilitzant l'agregat metàl·lic i alhora

permetent la flexibilitat suficient del pèptid per assegurar la interacció de les dues zones riques en cisteïnes i la participació del ions S^{2-} .

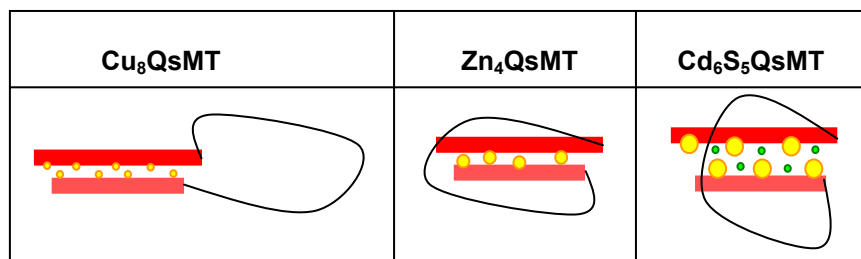


Figura 7. Representació esquemàtica de la interacció entre els diferents dominis de QsMT en coordinació a Cu, Zn i Cd. Domini N-terminal en vermell, C-terminal en rosat i zona central en negre. En groc es representen els metalls, i en verd els

V. CONCLUSIONS

V. CONCLUSIONS

1. Redox i estrès oxidatiu.

- 1.1. *QsMT* s'expressa en cèl·lules sotmeses a estrès oxidatiu endogen. El seu paper en aquestes cèl·lules podria estar relacionat amb la protecció davant les espècies d'oxigen reactives.
- 1.2. L'expressió de *QsMT* s'indueix per aplicació externa d'estrès oxidatiu (H_2O_2 i paraquat).
- 1.3. En embrions d'alzina surera *QsMT* s'expressa en les cèl·lules mare dels meristems apical i radicular i en la massa proliferativa. L'expressió en aquestes cèl·lules podria estar relacionada amb un paper en el manteniment de l'estat redox.
- 1.4. Els resultats de complementació funcional en llevat en condicions d'estrès oxidatiu mostren la complexitat de la resposta antioxidant, en la que la funció de les MTs deu estar finament regulada. L'expressió de *QsMT* en cèl·lules del llevat *S. cerevisiae* mutant per al gen *CUP1* n'augmenta la viabilitat davant el Cu, però en canvi la disminueix davant l'estrès oxidatiu (paraquat). L'addició de Cu a baixes concentracions millora la resposta a l'estrès oxidatiu, indicant que a les condicions assajades la quelació del Cu per part de *QsMT* possiblement el fa inaccessible als enzims antioxidants dependents de Cu.

2. Caracterització metàl·lica

- 2.1. El mètode d'expressió i purificació utilitzat per a *QsMT*, basat en el sistema de GST/trombina, genera mostres homogènies de la proteïna sense signes de proteolisi, amb un percentatge baix d'oxidació i una puresa i concentració final que permet fer-ne estudis espectromètrics i espectroscòpics acurats. Es constata com a un bon mètode per a l'estudi de les MTs vegetals.
- 2.2. *QsMT* presenta preferència metàl·lica pel Cu. Expressada en *E. coli* en medi ric en Cu uneix majoritàriament 8 ions de Cu, i mostra un patró de dicroïsmes circular molt quiral i

similar al d'altres MTs de Cu. La funció de QsMT molt probablement va lligada a aquest metall fisiològic.

- 2.3. Expressada en medi ric en Zn, QsMT uneix majoritàriament 4 ions de Zn, i mostra un patró de CD poc quirals. La baixa estequiometria i estructuració de l'agregat metàl·lic fa poc probable que aquesta proteïna tingui una funció important relacionada amb el Zn.
- 2.4. En l'agregat metàl·lic que forma QsMT en coordinació a Cd participen ions sulfur. En medi ric en Cd QsMT uneix majoritàriament 6 ions de Cd, per sobre de l'esperat en funció del contingut en cisteïnes, i mostra un patró de CD quirals i molt atípic. Les dades espectromètriques i espectroscòpiques confirmen la participació d'ions sulfur. Aquests ions deuen participar en la neutralització de les càrregues positives del Cd i en augmentar la capacitat quelant i l'estabilització de l'agregat metàl·lic. Aquestes dades suggereixen que QsMT podria participar en la destoxicació de Cd. Els resultats en llevat confirmen una capacitat destoxicant de Cd *in vivo*.

3. Plegament

- 3.1. Per a QsMT proposem un model de plegament en un sol agregat metàl·lic, on la interacció de les dues zones riques en cisteïnes forma un nou entorn de coordinació. Els pèptids mutants derivats de QsMT N25 i C18, corresponents a les dues zones riques en cisteïnes de QsMT, presenten poca capacitat de coordinació metàl·lica a qualsevol dels metalls assajats, per tant és poc probable que aquests dominis formin agregats metàl·lics independents. La seva expressió en cèl·lules de *S. cerevisiae* *CUP1*-deficients no augmenta significativament la viabilitat davant el Cu ni el Cd.
- 3.2. En el model de plegament que proposem el domini central entre les dues zones riques en cisteïnes no participa en l'enllaç metàl·lic. El pèptid mutant derivat de QsMT N25-C18, on s'ha substituït la zona central d'enllaç per un pont de 4 glicines, presenta la mateixa estequiometria davant els metalls Cu, Zn i Cd que la proteïna sencera.
- 3.3. El domini central de QsMT és imprescindible per a la seva funció *in vivo*. La manca del domini central en N25-C18 provoca un canvi conformacional important respecte QsMT quan coordina Zn i Cd però no quan coordina Cu. En canvi, llevats *CUP1*-deficients que expressen N25-C18 tenen una viabilitat reduïda respecte els que expressen QsMT tant en medis rics en Cu com en Cd. Per a metalls bivalents la zona central deu participar en el plegament i estabilització de la proteïna, amb implicacions importants per a la seva funció, mentre que per a metalls monovalents la importància de la zona central podria estar relacionada amb la regulació i/o ubicació de la proteïna en la cèl·lula.

VI. MATERIAL I MÈTODES

VI. MATERIAL I MÈTODES

1. Material biològic	121
1.1. Material vegetal	
1.2. Soques, plasmidis i construccions	
2. Mètodes de manipulació d'àcids nucleics	125
2.1. Extracció del DNA genòmic	
2.2. Minipreparacions de DNA plasmídic	
2.3. Reacció en cadena de la polimerasa (PCR)	
2.4. Separació de DNA per electroforesi	
2.5. Quantificació del DNA	
2.6. Subclonatge de fragments de DNA en plasmidis	
2.7. Preparació de cèl·lules competents i transformació de DNA plasmídic	
2.8. Seqüenciació de DNA	
2.9. Síntesi i clonatge de QsMT i les seqüències truncades	
3. Assajos de complementació funcional en llevat	137
4. Expressió, purificació i anàlisi de QsMT i els pèptids truncats	139
4.1. Expressió i purificació	
4.2. Anàlisi estequiomètric i espectroscòpic	
5. Detecció de mRNA en seccions histològiques, hibridació <i>in situ</i>	143
5.1. Preparació de la ribosonda marcada amb digoxigenina	
5.2. Fixació, inclusió i microtomia	
5.3. Hibridació i detecció	

1. MATERIAL BIOLÒGIC

1.1. Material vegetal

Embrions zigòtics i plàntules d'alzina surera

Tant els embrions zigòtics com les plàntules d'alzina surera s'han obtingut a partir d'aglans germinats en una barreja de terra i perlita humida, mantinguts a 25 °C i 16 h de fotoperíode. Els embrions es van fixar en l'inici de la germinació, quan l'àpex radicular tenia aproximadament de 5 a 10 mm. Les plantes joves es van mantenir en cultiu durant aproximadament un mes fins a l'estadi de 6-8 fulles.

Sistema d'embriogènesi somàtica en alzina surera

Els embrions somàtics provenen d'un sistema d'embriogènesi somàtica secundària, procés pel qual els embrions somàtics generen nous embrions de forma espontània sense necessitat d'aplicar tractaments hormonals ni reguladors de creixement (Fernandez-Guijarro *et al.*, 1995). Per a la utilització en estudis de fisiologia i biologia molecular l'embriogènesi somàtica secundària és molt indicada perquè permet tenir gran quantitat d'embrions genèticament idèntics en el mateix estadi de desenvolupament, i per tant es poden fer estudis de forma molt repetitiva. Els embrions es mantenen estèrilment en cultius *in vitro* en una cambra on les condicions de creixement estàndard són 25 °C i 16 hores de fotoperíode ($50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), i es subcultiven en medi fresc cada 30 dies. El medi de cultiu es basa en el definit per Shenk i Hildebrandt (medi SH) (Schenck i Hildebrandt, 1972) i Murashige i Skoog (medi MS) (Murashige i Skoog, 1962).

Medi de cultiu per al sistema d'embriogènesi somàtica (1 litre):

Macronutrients SHx10:	100 ml
1 litre: KNO ₃	25 g
CaCl ₂ ·2H ₂ O	2 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	4 g
NH ₄ H ₂ PO ₄	3 g
Micronutrients MSx10 (SIGMA, M0529)	100 ml
Vitamines MSx1000 (SIGMA, M7150)	1 ml
Sacarosa	30 g
Agar	6 g
Aigua destil·lada	fins a 1 L

Ajustar el pH a 5,7 i autoclavar

S'han utilitzat pots per al cultiu de teixits de planta de 100 ml de capacitat (59 mm diàmetre i 66mm alçada, SIGMA V-8630), amb 30 ml de medi en cadascun.

Aplicació d'estressos en embrions somàtics

Els embrions somàtics utilitzats per aquests experiments són embrions immadurs, de 5 a 7 mm de longitud i de cotiledons translúcids o blancs. El cos de l'embrió apareix lleugerament envoltat de massa proliferativa, que donarà lloc a la formació dels embrions secundaris. Els embrions es van aïllar estèrilment amb molta cura per evitar causar ferides, i es van mantenir durant 5 dies en medi sòlid fresc en les condicions de cultiu estàndard abans de l'aplicació dels estressos.

Els estressos assajats han estat de tipus:

Oxidatiu: H₂O₂ al 0.5% (v/v) o paraquat 5 µM

Tèrmic: 42 °C

Tots els tractaments i el control a 25 °C es van aplicar durant tres hores en medi líquid i en agitació suau per facilitar-ne la homogenització. Després dels tractaments els embrions es van submergir breument en aigua per eliminar el medi de cultiu i es van fixar immediatament.

1.2. Soques, plasmidis i construccions

Soques, plasmidis i construccions en bacteri

S'han utilitzat dues soques d'*Escherichia coli*:

- **DH5 α** : És una soca fàcil de transformar molt utilitzada per al manteniment de clons en plasmidis.
- **BL21DE3**: És una soca deficient en proteases, molt utilitzada per a experiments d'expressió de proteïnes heteròlogues.

S'han utilitzat dos vectors de clonatge:

- **Lambda Uni-ZAP® XR** (Stratagene): Aquest vector conté la seqüència del fagèmid pBluescript-SK, que mitjançant un fag *helper* es pot escindir i circularitzar generant subclons amb l'insert d'interès. Els inserts es troben flanquejats pels promotors T3 i T7, reconeixibles per l'enzim T3 o T7 RNA polimerasa que permet la síntesi de RNA a partir de DNA. És el vector que va ser utilitzat per la síntesi de la llibreria de cDNA de fel·lema de *Q. suber* (Pla *et al.*, 1998), i del que s'ha aïllat *QsMT*.
- **pGEX-4T2** (Amersham Pharmacia Biotech): És un vector d'expressió per a soques d'*E. coli*, utilitza l'ampicil·lina com a marcador de selecció i el promotor fort *tac*, induïble químicament per IPTG. La zona de MCS (Multiple Cloning Site) es troba adjacent a la seqüència codificant per la GST (Glutation-S-Transferase), de manera que l'addició de IPTG estimula la síntesi de la GST en la posició amino terminal i en l'extrem carboxil terminal la proteïna d'interès, amb una seqüència diana per la trombina entre elles. El sistema de fusió a GST a més de garantir l'estabilitat de la proteïna recombinant dins d'un sistema heteròleg, permet una purificació molt bona, fàcil i amb un elevat rendiment. La diana per a l'enzim trombina permet separar la proteïna de fusió per una posterior purificació de la proteïna d'interès sola.

pGEX-QsMT : Conté la seqüència condificant per QsMT adjacent a la GST

pGEX-N25-C18 : Conté la seqüència condificant per el pèptid N25-C18 adjacent a la GST

pGEX-N25 : Conté la seqüència condificant per el pèptid N25 adjacent a la GST

pGEX-C18 : Conté la seqüència condificant per el pèptid C18 adjacent a la GST

Soques, plasmidis i construccions en llevat

S'han utilitzat dues soques de *Saccharomyces cerevisiae*:

- **DTY3** (*MAT α* , *leu2-3*, *112his3^{A1}*, *trp1-1*, *ura3-50*, *gal1 CUP1^S*): té una sola còpia del gen CUP1, té tolerància al Cu a una concentració màxima de 300 μ M i presenta heterotrofia per els aminoàcids Leu, His, Trp i Ura.
- **DTY4** (*MAT α* , *leu2-3*, *112his3^{A1}*, *trp1-1*, *ura3-50*, *gal1*, *cup1::URA3*): no presenta cap còpia funcional del gen CUP1, té tolerància al Cu a una concentració màxima de 75 μ M i presenta heterotrofia per els aminoàcids Leu, His i Trp.

S'ha utilitzat un vector de clonatge:

- **p424-GPD** (ATCC 87357): És un *shuttle vector*, és dir un vector d'expressió per llevat però amb origen de replicació i marcadors de selecció tant per a cèl·lules bacterianes com per a cèl·lules de llevat. L'origen de replicació en llevat és el 2 μ , que li permet tenir un nombre elevat de còpies a la cèl·lula, i com a marcador de selecció conté el gen TRP1 (triptofan). La zona de clonatge (MCS) està flanquejada per el promotor fort GPD (Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase) i el finalitzador CYC1 (cytochrome-c-oxidase). Com a marcador de selecció per cèl·lules bacterianes presenta el gen per a la resistència a l'ampicil·lina (Amp^R).

p424-QsMT: Conté la seqüència condificant per QsMT

p424-N25C18: Conté la seqüència condificant per el pèptid N25-C18

p424-N25: Conté la seqüència condificant per el pèptid N25

p424-C18: Conté la seqüència condificant per el pèptid C18

2. MÈTODES DE MANIPULACIÓ D'ÀCIDS NUCLEICS

2.1. Extracció del DNA genòmic

Per obtenir DNA de bona qualitat s'ha utilitzat el kit comercial d'extracció de DNA genòmic de plantes NucleoSpin[®] Plant XL (Macherey-Nagel). Un cop homogenitzat el teixit, el kit es basa en l'extracció del DNA amb tampons de lisi amb CTAB, centrifugació per eliminar polisacàrids i restes cel·lulars, unió del DNA a una membrana de silicagel, rentats i elució del DNA amb aigua o amb un tampó de baixa concentració salina. Permet obtenir de 150 a 200 µg de DNA a partir de 2 g de teixit vegetal. La homogenització es va fer manualment en morter amb nitrogen líquid.

2.2. Minipreparacions de DNA plasmídic

Per obtenir DNA plasmídic de bona qualitat s'ha utilitzat el kit d'extracció NucleoSpin[®] Plasmid (Macherey-Nagel). Les cèl·lules amb el plasmidi d'interès es fan créixer tota la nit en medi selectiu i s'utilitzen 2-3 ml de cultiu per a l'extracció. L'extracció es basa en la lisi SDS/alcalina de les cèl·lules i adsorció del DNA plasmídic en una matriu de silicagel. Després dels rentats el DNA plasmídic s'elueix amb aigua o amb un tampó de baixa força iònica. Generalment s'obté DNA molt pur a concentració elevada, trets imprescindibles per posteriors anàlisis i manipulacions com són l'amplificació del DNA per la reacció en cadena de la polimerasa, digestions i lligacions.

2.3. Reacció en cadena de la polimerasa (PCR)

Aquesta tècnica permet una gran amplificació de fragments de DNA o RNA a partir de quantitats inicials molt petites basant-se en cicles de desnaturalització, unió dels encebadors i síntesi de DNA complementari a la cadena motlle per una polimerasa resistent a elevades temperatures.

Condicions utilitzades habitualment:

DNA	10-100 ng
Tampó de la polimerasa	1x
MgCl ₂	2.15 mM
dNTPs	150 µM cadascun
Encebadors	230 nM cadascun
DNA polimerasa	0.02 unitats/µl
H ₂ O	fins a 100 µl

Programa utilitzat habitualment:

1 cicle:	30 s, 94°C	(desnaturalització)
30 cicles:	30 s, 94°C	(desnaturalització)
	45 s, 55°C	(aparellament, dependrà de la <i>Ta</i> dels encebadors)
	1 min, 72°C	(extensió, en l'últim cicle s'allarga fins a 10 min)

Ta: Temperatura d'aparellament. Es calcula segons la fórmula:

$$T_a = [4 (G + C) + 2 (A + T)] - 5$$

On G, C, A i T representa el nombre de guanines, citosines, adenines i timines de l'encebador, respectivament.

Per evitar la formació de dímers d'encebadors i/o una amplificació inespecífica durant la reacció de PCR excepcionalment s'ha utilitzat una polimerasa *hotstart* (Bioline). Aquests tipus de polimerases tenen unit un anticòs que n'impedeix la funció i s'inactiva per temperatura (94°C 7 min). Els casos en els que s'ha utilitzat aquesta polimerasa el primer pas de la reacció de PCR (desnaturalització, 94 °C) s'allarga fins a 7 minuts.

La puresa i mida dels productes de PCR generalment es comproven per electroforesi en gel d'agarosa que conté bromur d'etidi. Per netejar el DNA amplificat producte de PCR es va utilitzar el Kit *MinElute PCR Purification kit* (QUIAGEN), que utilitza l'adsorció del DNA en una membrana de silicagel seguit d'una sèrie de rentats que eliminen l'excés d'encebadors, nucleòtids i polimerasa.

2.4. Separació de DNA per electroforesi

L'electroforesi de DNA s'utilitza tant per finalitats analítiques com preparatives, ja que permet determinar-ne la puresa i la mida.

En gel d'acrilamida

L'acrilamida té una mida de porus molt petit, generalment s'utilitza per separar fragments de DNA de mida entre 5 i 500 parells de bases, però pot permetre una resolució de fins a 1 parell de bases. La concentració mínima de DNA que es detecta amb el bromur d'etidi com a colorant intercal·lar fluorescent és de 10 ng.

En aquest treball s'han utilitzat gels d'acrilamida al 15 %, òptim per separar fragments de 25 a 150 parells de bases. El protocol i les solucions utilitzats són les descrites a Sambrock *et al.*, 1989.

En gel d'agarosa

L'agarosa és molt més porosa que l'acrilamida, és menys resolutive però permet treballar amb fragments de DNA de mida més gran. Generalment s'utilitzen solucions diluïdes d'agarosa a l'1-2 %. El protocol i les solucions utilitzades són les descrites a Sambrock *et al.*, 1989.

Extracció del DNA en gel d'agarosa i purificació

Els fragments de DNA separats tant per electroforesi en gel d'agarosa com en gel d'acrilamida es poden escindir i purificar. La utilització de kits comercials permet fer aquest pas de forma molt ràpida i senzilla, i s'obtenen graus de puresa tan elevats que es pot utilitzar el DNA per posteriors anàlisis i manipulacions.

En aquest treball s'ha utilitzat el kit comercial *MinElute Gel Extraction Kit* (QIAGEN), que permet netejar el DNA escindit de gels d'agarosa. El protocol es basa en fondre la banda d'agarosa que conté el DNA a 60°C, unir el DNA a una membrana de silicagel, rentar la membrana amb diferents solucions per eliminar impureses i eluir el DNA amb aigua o amb un tampó de baixa força iònica.

2.5. Quantificació del DNA

La determinació de la concentració de DNA o RNA d'una mostra és imprescindible com a pas previ de múltiples experiments. Es va realitzar per electroforesi en gels d'agarosa tenyits amb bromur d'etidi o per espectrofotometria. Amb els gels d'agarosa es compara la intensitat de la banda de DNA amb la d'un DNA de concentració coneguda. El mètode espectrofotomètric mesura l'absorció dels àcids nucleics a 260 nm, on les bases nitrogenades presenten un màxim. Per determinar la puresa de la mostra es mesura l'absorció de les proteïnes a 280 nm i s'utilitza i el quocient entre 260 nm i 280 nm. Si el quocient Abs_{260}/Abs_{280} està entre 1.8 i 2 la mostra és prou pura i es quantifica seguint la relació:

DNA doble cadena	1 OD ₂₆₀ = 50 µg/ml
RNA	1 OD ₂₆₀ = 40 µg/ml
Oligonucleòtids	1 OD ₂₆₀ = 33 µg/ml

2.6. Subclonatge de fragments de DNA en plasmidis

Obtenció del DNA a clonar

El DNA plasmídic s'obté per minipreparacions de DNA a partir de cultius bacterians, i els fragments de DNA per amplificació mitjançant PCR. Per facilitar i direccionar el clonatge s'han amplificat els fragments de DNA utilitzant encebadors que contenen una seqüència diana per a enzims de restricció.

Digestió de DNA per enzims de restricció

S'han utilitzat enzims de restricció de les cases comercials Roche, Fermentas i New England Biolabs, seguint en cada cas les condicions recomanades pel fabricant. Com que la digestió mai és total, es separa el DNA per electroforesi en gel d'agarosa i es purifica el fragment digerit.

Lligació de fragments de DNA

Les relacions molars entre vector i insert per a la lligació depenen de la mida de cadascun d'ells i del tipus d'extrems que presenten. En els clonatges realitzats durant aquesta tesi es van utilitzar fragments de DNA amb extrems cohesius compatibles, i relacions molars insert/vector de 3/1, 7/1 i 10/1. Les lligacions es van fer durant tota la nit a 4°C, en un volum final de 10 µl i un percentatge màxim de lligasa del 10% seguit les indicacions del fabricant. Quan la concentració de DNA a lligar és molt baixa es pot precipitar el DNA digerit i ressuspendre directament en el tampó de lligació.

2.7. Preparació de cèl·lules competents i transformació de DNA plasmídic

Cèl·lules bacterianes

Preparació de cèl·lules competents pel mètode del clorur de calci

Aquest mètode permet tenir una eficiència teòrica de transformació d'aproximadament 10^6 - 10^7 cfu/µg DNA.

1. Fer un cultiu de nit amb medi LB sense antibiòtic a partir d'una sola colònia de la soca a emprar, en aquest cas *E. coli* BL21.
2. Inocular 250 µl del cultiu de nit en 25 ml de medi LB fresc mantingut a 37°C.

3. Créixer el cultiu a 37°C i agitació fins a una $OD_{600} = 0.4$. Un creixement a $OD_{600} = 0.4$ es considera que està dins la fase exponencial de creixement, per sobre de la fase exponencial suposaria una disminució de l'eficiència de transformació.
4. Mantenir en gel durant 15 min.
5. Centrifugar 10 min a 4°C i 4000 x g per recollir les cèl·lules.
6. Descartar el sobrenadant i ressuspènere molt suaument el sediment amb 5 ml de 0.1 M $CaCl_2$ fred.
7. Mantenir en gel durant 30 min.
8. Centrifugar 5 min a 4°C i 4000 x g.
9. Descartar el sobrenadant i ressuspènere molt suaument el sediment amb 250 μ l de glicerol i 750 μ l de 0.1 M $CaCl_2$ fred.
10. Repartir les cèl·lules en alíquotes de 50-100 μ l en tubs de microcentrífuga refredats en gel.
11. Guardar a - 80°C fins al moment d'utilitzar.

Transformació de cèl·lules competents per xoc de calor

1. Descongelar en gel 50/100 μ l de cèl·lules competents de *E. coli* BL21 per cada transformació.
2. Afegir 5 μ l de lligació i barrejar suaument.
3. Mantenir 30 min en gel. En aquest pas s'enganxa el DNA a la paret cel·lular.
4. Fer un xoc de temperatura a 42°C durant 90 s. S'obren els porus de les cèl·lules competents i entra el DNA.
5. Mantenir 1-2 min en gel per permetre el tancament dels porus.
6. Afegir 400 μ l de medi LB + 0.2% maltosa + 10 mM $MgSO_4$. Aquestes solucions permeten una més fàcil recuperació de la cèl·lula i la seva membrana plasmídica.
7. Agitar suaument 45 min a 37°C per facilitar la recuperació dels bacteris. És molt important no entretenir massa aquest pas per evitar contaminacions ja que no hi ha antibiòtic en el medi.
8. Sembrar 225 μ l en placa amb medi LB i l'antibiòtic marcador de resistència.
9. Deixar créixer tota la nit a 37°C.

PCR de comprovació sobre colònies

La presència de plasmidi i insert es va comprovar per PCR directe de la colònia. Aquest sistema, tot i que només és indicatiu, és ràpid i econòmic pel que sovint resulta molt útil quan el nombre de transformants és elevat.

1. Agafar una part de cadascuna de les colònies amb l'ajuda d'una punta de pipeta estèril
2. Submergir en un tub de microcentrífuga amb 50 μ l d'aigua i agitar.
3. Escalfar el tub a 90°C 5 min i agitar fort amb vòrtex.

4. Utilitzar 1-2 μl de la solució per a una PCR de 10 μl de volum final.

Les colònies amb resultat positiu per la PCR es van analitzar per minipreparació de DNA plasmídic i seqüenciació.

Cèl·lules de llevat

*Preparació de cèl·lules competents de *S. cerevisiae* pel mètode d'acetat de liti i transformació*

1. Inocular 10 ml de medi amb les cèl·lules d'interès. El medi de cultiu dependrà de les cèl·lules utilitzades. Incubar durant 16-18 h a 30°C i 220 rpm.
2. Mesurar la densitat òptica a 600 nm i diluir en 50 ml fins a $\text{OD}_{600} = 0.2$, incubar a 20°C i 200 rpm fins a $\text{OD}_{600} = 0.7-1.5$. Densitats més elevades ja s'allunyen de la fase exponencial de creixement i disminueixen l'eficiència de transformació.
3. Centrifugar el cultiu a 3000 rpm durant 10 min a temperatura ambient.
4. Abocar el medi, afegir 10 ml d'aigua estèril en el sediment, ressuspendre i centrifugar 10 min a 3000 rpm.
5. Abocar el sobrenadant, afegir 5 ml d'una solució d'acetat de liti en TE (LiOAc/TE) al sediment, ressuspendre i centrifugar 10 min a 3000 rpm.
LiOAc en TE: 100 mM LiOAc pH7.0-7.4, 10 mM tris-HCl pH7.5, 1 mM EDTA
6. Abocar el sobrenadant, afegir 500 μl LiOAc/TE i ressuspendre suaument.
7. Repartir en alíquotes de 50 μl en tubs eppendorf estèrils. Les cèl·lules en aquest estat són molt delicades, es recomana fer la transformació immediatament.

Transformació de cèl·lules competents per xoc de calor

1. Afegir 1 μl de DNA plasmídic i barrejar suaument.
2. Afegir 300 μl de 40% PEG 4000 en LiOAc/TE, barrejar suaument i incubar 30 min a 30°C. El PEG facilita la unió del DNA a la paret cel·lular.
3. Fer xoc tèrmic a 42°C durant 15 min per facilitar l'entrada del DNA dins la cèl·lula.
4. Centrifugar 30 seg a 3000 rpm, treure el sobrenadant, afegir 1 ml d'aigua estèril i ressuspendre.
5. Centrifugar 30 s, treure sobrenadant, afegir 200 μl d'aigua estèril i ressuspendre.
6. Sembrar les cèl·lules en plaques de medi SC selectiu, de manera que només creixeran aquelles cèl·lules que hagin incorporat el plasmidi. Incubar durant 3 dies a 30°C i comprovar els transformants per PCR.

PCR de comprovació sobre colònies de llevat

1. Posar 10 µl d'aigua destil·lada en tubs de microcentrífuga i afegir part de la colònia de llevat amb l'ajuda d'una punta de pipeta.
2. Afegir 10 µl a 1u/ml de solució de lyticane i incubar a 30°C durant 30 min. En aquest pas es trenquen les parets del llevat.
3. Mantenir 10 min a -80°C per trencar membranes.
4. Afegir 30 µl d'aigua, centrifugar i utilitzar 1µl del sobrenadant per fer la PCR.
5. Comprovar per gel d'agarosa tenyit amb bromur d'etidi.

2.8. Seqüenciació de DNA

La seqüenciació del DNA consta d'un primer pas d'amplificació per reacció en cadena de la polimerasa i un segon pas propi de seqüenciació.

Reacció d'amplificació

Es van utilitzar les condicions de PCR habituals descrites en l'apartat 2.3.

Reacció de seqüenciació

S'ha utilitzat el mètode de seqüenciació amb didesoxinucleòtids descrit per Sanger al 1977. La seqüenciació s'ha fet amb l'aparell ABI PRISM 310 i el kit *ABI PRISM® dRhodamine Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit* (Applied Biosystems) que conté didesoxinucleòtids marcats amb 4 colorants fluorescents diferents i permeten obtenir una seqüència en un sol tub de reacció, l'enzim polimerasa i el seu tampó.. S'utilitzen entre 60 i 90 ng de DNA amplifcat per PCR o entre 500 i 900 ng de DNA plasmídic per cada reacció, i s'obté una mitjana de lectura d'uns 1000 parells de bases. S'han seguit les condicions recomades pel fabricant:

DNA	60-90 ng
<i>Terminator</i> (PE Biosystems) ..	2 µl
Encebador	3.2 pmol
H ₂ O	fins a 10 µl
1 cicle:	1.5 min, 96°C
25 cicles:	30 s, 96°C
	15 s, 50°C
	4 min, 60°C

Les mostres s'han de precipitar i ressuspindre en el tampó TSR (*Template Supression System*, PE Biosystems) en tubs de seqüenciació segons les instruccions del fabricant. Les seqüenciacions han estat realitzades per els ServeisTècnics de Recerca de la Universitat de Girona.

2.9. Síntesi dels mutants derivats de QsMT

Per a la síntesi i amplificació de les seqüències mutants derivades de QsMT es va utilitzar la tècnica de PCR amb algunes modificacions respecte les condicions habituals. Es van generar dos mutants truncats i una quimera de QsMT: *N25*, *C18* i *N25-C18*, respectivament (Figura 8 i Figura 9). Com a DNA motlle es va utilitzar el cDNA QsMT de la llibreria de fel·lema. En totes les construccions es van introduir les dianes de restricció per als enzims *Bam*HI i *Eco*RI en els encebadors per direccionar el clonatge.

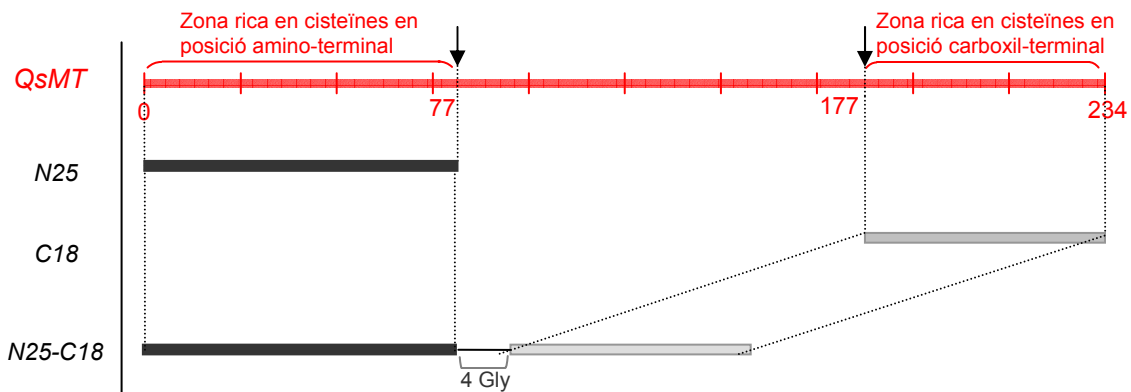


Figura 8. Representació esquemàtica de les seqüències mutants derivades de QsMT. Les seqüències *N25* i *C18* corresponen a les zones riques en cisteïnes amino i carboxil-terminal de QsMT, i la seqüència *N25-C18* és una quimera on s'ha deleccionat la zona central de QsMT i s'ha substituït per un pont de 4 glicines.

QsMT		
1	atg tct tgc tgc gga gga aac tgt ggc tgt gga act ggc tgc aag	45
1	M S C C G G N C G C G T G C K	15
46	tgc ggc agc ggc tgt gga gga tgc aag atg ttc cct gac atc agc	90
16	C G S G C G G C K M F P D I S	30
91	tca gag aag acc acc acc gag acc ctt att gtt ggt gtt gct cct	135
31	S E K T T T E T L I V G V A P	45
136	cag aag aca cac ttt gag gga tct gag atg ggc gta gga gct gag	180
46	Q K T H F E G S E M G V G A E	60
181	aat ggc tgc aag tgc gga tcc aac tgc acc tgt gac cct tgc aat	225
61	N G C K C G S N C T C D P C N	75
226	tgt aaa tga	234
76	C K *	

Figura 9. Seqüència nucleotídica i aminoacídica de QsMT on es senyala la zona rica en cisteïnes en posició amino-terminal (requadre negre) i en posició carboxil-terminal (requadre gris). En vermell es senyalen les cisteïnes.

Amplificació de N25

La seqüència *N25* codifica per la primera zona rica en cisteïnes de *QsMT*, des de l'aminoàcid 1 fins a l'aminoàcid 25 (posicions 1 a 77 de la seqüència nucleotídica).

Es van utilitzar els encebadors:

N25/Bam: 5'-CGGGATCCATGTCTTGCTGCGGA

N25/Eco: 5'-CGGAATTCTCACATCTTGCATCCTCCACA

- N25/Bam és complementari a l'extrem amino terminal de *QsMT* (posicions 1 a 15 de la seqüència nucleotídica) i conté una diana de restricció per a l'enzim *Bam*HI.
- C18/Eco és complementari a l'extrem carboxil de la primera zona rica en cisteïnes de *QsMT* (posicions 56 a 77 de la seqüència nucleotídica), introdueix un codó de finalització (TGA) al final de la zona codificant i té una diana de restricció per a l'enzim *Eco*RI.

1	<u>gga tcc</u>	atg	tct	tgc	tgc	gga	gga	aac	tgt	ggc	tgt	gga	act	ggc	45
1		M	S	C	C	G	G	N	C	G	C	G	T	G	15
46	tgc	aag	tgc	ggc	agc	ggc	tgt	gga	gga	tgc	aag	atg	tga	<u>gaa ttc</u>	90
16	C	K	C	G	S	G	C	G	G	C	K	M	*		

Seqüència nucleotídica i aminoacídica de *N25*. Es senyalen les dianes de restricció (subratllat), i el codó de finalització de la síntesi proteica (negreta).

Amplificació de C18

La seqüència *C18* codifica per la segona zona rica en cisteïnes de *QsMT*, consta dels 18 aminoàcids de l'extrem carboxil terminal de *QsMT* (posicions 177 a 234 de la seqüència nucleotídica).

Es van utilitzar els encebadors:

C18/Bam: 5'-CGGGATCC**ATGA**AATGGCTGCAAGTGCGGCTC

C18/Eco: 5'-CGGAATTCTCATTTACAATTGCAAGGGTC

- C18/Bam és complementari a l'extrem amino de la segona zona rica en cisteïnes de *QsMT* (posicions 177 a 196 de la seqüència nucleotídica), introdueix un codó d'inici (ATG) abans de la zona codificant i conté una diana per a l'enzim *Bam*HI.
- C18/Eco és complementari a la zona carboxil terminal de *QsMT* (posicions 214 a 234 de la seqüència nucleotídica), i conté una diana per a l'enzim de restricció *Eco*RI.

```

1   gga tcc atg aat ggc tgc aag tgc ggc tcc aac tgc acc tgt   42
1   M   N   G   C   K   C   G   S   N   C   T   C   14

43   gac cct tgc aat tgt aaa tga gaa ttc   69
15   D   P   C   N   C   K   *

```

Seqüència nucleotídica i aminoacídica de C18. Es senyalen les dianes de restricció (subratllat) i el codó d'inici de la traducció (negreta). En gris es senyala una base modificada per facilitar el clonatge utilitzant la diana de restricció per a *Bam*HI.

L'amplificació dels fragments està dirigida per a la seva clonació en el vector pGEX-4T2 i posterior expressió. La primera diana de restricció que té aquest vector en la zona de clonatge, i la més indicada quan s'han de fer estudis amb la proteïna expressada heteròlogament, és la que reconeix l'enzim *Bam*HI. Com que *QsMT* conté una diana interna per aquest mateix enzim en la posició 198, per a la construcció de *pGEX-QsMT* es va fer digestió parcial i clonatge del fragment més llarg. En canvi, per les construccions *pGEX-C18* i *pGEX-N25-C18*, i per evitar estratègies complexes de clonatge, es va dissenyar un encebador amb una base modificada, de forma que altera la diana per a *Bam*HI sense modificar la seqüència aminoacídica de la proteïna.

Amplificació de N25-C18

La seqüència *N25-C18* consisteix en la unió de les dues zones riques en cisteïnes (N25 i C18) mitjançant un pont de 4 glicines en substitució del llarg domini central de *QsMT*. La glicina és un aminoàcid petit que permet certa flexibilitat estructural, i s'han afegit 4 glicines per facilitar el moviment o plegament de les zones riques en cisteïnes.

El mutant *N25-C18* es va generar en dues fases, la primera (i) d'amplificació de les dues zones riques en cisteïnes *N25* i *C18* per separat, i la segona (ii) d'unió d'aquestes dues seqüències per un pont de 4 glicines mitjançant una estratègia de PCR.

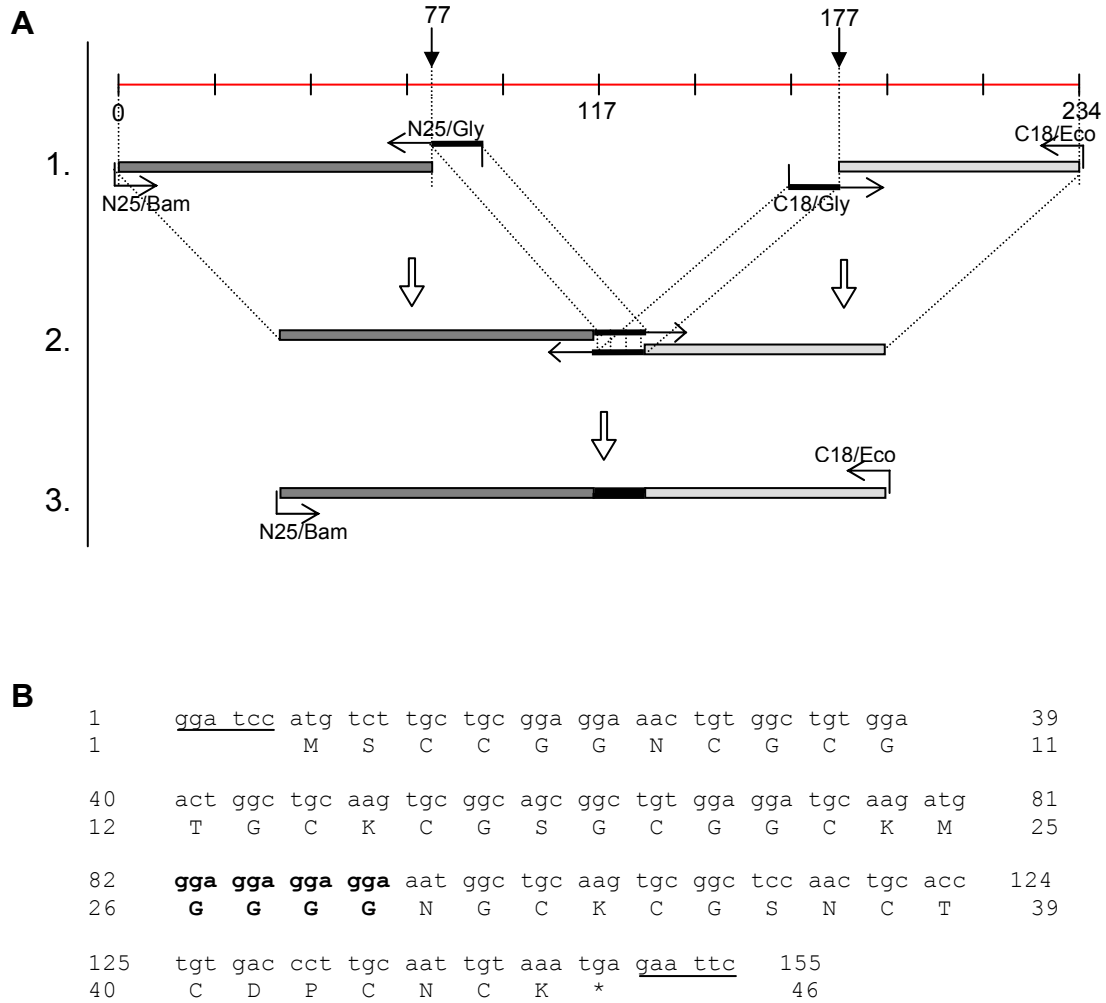


Figura 10. A) Esquema de l'estratègia utilitzada per a l'amplificació de N25-C18. B) Seqüència nucleotídica i aminoàcídica de N25-C18, es senyalen les dianes per als enzims de restricció (subratllat) i el pont de quatre glicines que substitueix el domini central de QsMT (negreta).

- N25 es va amplificar amb l'encebador *forward* N25/Bam i l'encebador *reverse* N25/Gly, complementari a la zona carboxil terminal de N25 i que incorpora la seqüència de 12 nucleòtids codificants per 4 glicines.

N25/Gly: 5'-TCCTCCTCCTCCCATCTTGCATCCTCCACA

- C18 es va amplificar amb els encebadors *forward* C18/Gly i *reverse* C18/Eco. L'encebador *forward* és complementari a l'extrem amino terminal de C18 i incorpora la seqüència de 12 nucleòtids codificants per 4 glicines complementària a la de l'encebador N25/Gly.

C18/Gly: 5'-GGAGGAGGAGGAAATGGCTGCAAGTGCGGCTC

Per a la unió de les dues seqüències pel pont de 4 glicines es va seguir el següent protocol:

- Comprovar les seqüències amplificades en el pas anterior per gel d'acrilamida al 15%.
- Netejar el producte de PCR principalment per eliminar encebadors
- Barrejar els dos productes de PCR nets a parts iguals i hibridar les zones codificants per les quatre glicines: 20 cicles de desnaturalització, hibridació a temperatura baixa (25 °C) i elongació. No s'afegeix cap encebador.
- Diluir 1/10 el producte de la hibridació i utilitzar com a DNA motlle per a una reacció de PCR amb els encebadors N25/Bam i C18/Eco: 30 cicles de desnaturalització, hibridació a temperatura alta (60°C) i elongació. Amb aquest pas de PCR s'amplifiquen exponencialment només aquelles seqüències degudament hibridades i omplertes. Els productes d'aquesta PCR es van analitzar per gel d'acrilamida al 15 % tenyit amb bromur d'etidi. Per purificar i seqüenciar les bandes d'interès es van separar en gel d'agarosa al 2 % i es van retallar.

3. ASSAJOS DE COMPLEMENTACIÓ FUNCIONAL EN LLEVAT

Els llevats han estat molt utilitzats en tècniques de biologia molecular. Són cèl·lules eucariotes que tot i tenir un genoma 3.5 vegades més gran que *E. coli* conserven molts dels avantatges de les cèl·lules procariotes utilitzats en biologia molecular: tenen un creixement ràpid, les cèl·lules creixen de forma dispersa i són molt fàcils d'aïllar i replicar i el sistema de transformació és molt versàtil, ja sigui mitjançant plasmidis que es podran replicar o bé per integració en el genoma del llevat. La integració del DNA en el genoma només es dona per recombinació homòloga, de manera que es pot interrompre qualsevol gen de seqüència coneguda. Aquest fet ha estat molt utilitzat per generar una bateria de soques mutants, i del fenotip resultant se n'han tret dades molt concluints sobre la funció del gen.

Una de les tècniques que s'estan utilitzant més en llevat és la de la complementació funcional amb gens d'altres organismes: es tracta d'utilitzar soques de llevat que tenen un determinat gen mutat, introduir un gen presumptament homòleg d'un altre organisme, i estudiar la seva influència en el fenotip de la cèl·lula de llevat.

En aquest treball s'ha utilitzat les soques DTY3 i DTY4 de *S. cerevisiae* i el vector p424GPD, descrits en l'apartat 1.2.

Assig en placa

1. Fer créixer les cèl·lules transformades amb el plasmidi buit com a control en medi selectiu, a 30°C i 200 rpm.
2. Diluir les cèl·lules fins a $OD_{600}=0.4$ (dins la fase exponencial de creixement), i després fer dilucions 1/10, 1/100 i 1/1000 amb aigua.
3. Sembrar 3 μ l de cada cultiu i cada dilució en una placa amb medi selectiu suplementat amb els diferents agents d'estrès. És important homogenitzar les dilucions abans de sembrar perquè els llevats es dipositen al fons molt ràpidament.
4. Incubar durant 3 dies a 30°C i fotografiar.

Assaig en medi líquid

1. Fer créixer les cèl·lules transformades en medi selectiu durant 16-18 h.
2. Inocular 50 ml de medi selectiu amb els cultius de nit fins a obtenir una $OD_{600}=0.01$, mantenir a 30°C i agitació a 200 rpm, mesurar l' OD_{600} cada 2-3 h fins que la corva de creixement s'estabilitzi.
3. Per mesurar l'efecte d'un agent estressant separar cada cultiu en dues alíquotes i afegir l'agent estressant en una d'elles, l'altra alíquota servirà com a control. És recomana aplicar l'estrès després d'un 5 h de creixement, quan les cèl·lules ja han fet les primeres divisions en el nou medi.

Medis utilitzats:

Generalment s'utilitza el medi sintètic definit deficient en aminoàcids (SD), i es suplementa amb una barreja comercial de tots els aminoàcids (medi sintètic complet, SC) excepte els que serveixin com a selectius en cada cas. En aquest treball s'ha utilitzat medi sense SC sense triptofan per fer créixer selectivament les cèl·lules de la soca DTY4 (SC-Trp), i medi SC sense triptofan i uracil (SC-Trp-Ura) per fer créixer les cèl·lules de la soca DTY4 transformades amb el plasmidi p424GPD. Per a la soca DTY3 s'ha utilitzat medi SC, que conté tots els aminoàcids.

Medi SC-Trp-Ura (1 litre):

Base nitrogenada de llevat	6,67 g
(Yeast Nitrogen Base, SIGMA)	
Glucosa	20 g
Suplement aminoàcids sense Trp i Ura	0,6 g
(DO Supplement, Clontech)	
Aigua destil·lada	fins a 1litre
Els aminoàcids Trp i Ura s'afegeixen a una concentració final de 0,1 g/ml	
El medi sòlid conté un 2 % d'agar (w/v)	

Ajustar el pH a 5,8 i autoclavar

Tractament amb estrès:

En aquest treball s'han aplicat dos tipus d'estrès:

Metalls pesants:	CuSO ₄ , concentració final 5 i 75 µM
	CdCl ₂ , concentració final 1.5-3.5 µM
Oxidatiu:	paraquat, concentració final 1.5 mM.
Metalls pesants i Oxidatiu:	CuSO ₄ 5 µM + paraquat 1.5 mM.

4. EXPRESSIÓ, PURIFICACIÓ I ANÀLISI DE QsMT I DELS PÈPTIDS MUTANTS

4.1. Expressió i purificació

L'expressió i purificació consisteix en (1) la inducció de la síntesi de la proteïna de fusió per IPTG, (2) la purificació de la proteïna de fusió per una reïna d'afinitat a la GST, (3) digestió amb trombina i alliberament de la proteïna d'interès sola i (4) separació de la proteïna d'interès sola per centrifugació i FPLC.

1. Inocular 3 ml de medi LB suplementat amb 50 µg/ml d'ampicil·lina amb una colònia d'*E. coli* BL21 transformada amb pGEX-QsMT, pGEX-N25, pGEX-C18 o pGEX-N25-C18, deixar créixer durant 2-3 h a 37°C i agitació.
2. Inocular 300 ml de medi LB fresc suplementat amb ampicil·lina amb els 3 ml de precultiu, deixar créixer tota la nit a 37°C i agitació.
3. Inocular 3 l de medi LB fresc suplementat amb 50 µg/ml d'ampicil·lina amb els 300 ml de cultiu de nit.
4. Deixar créixer a 37°C i agitació fins a assolir una absorvència a 600 nm d'aproximadament 0.8.
5. Afegir l'inductor IPTG a una concentració final de 0.1 M i incubar durant 30 min a 37°C i agitació. Amb l'addició de IPTG s'indueix la síntesi de proteïna de fusió.
6. Afegir la solució de metall corresponent a una concentració final de 0.3 mM i incubar durant 3 h a 37°C i agitació. Els metalls assajats han estat CuSO₄, CdCl₂ i ZnCl₂. La solució de metalls s'afegeix mitja hora més tard de la inducció de síntesi de proteïna per evitar que la toxicitat dels metalls impedeixi l'expressió del gen.
7. Centrifugar els cultius durant 7 min a 7700 rpm i 4°C per recollir les cèl·lules.
8. Eliminar molt bé el sobrenadant i ressuspèndre el sediment amb 40 ml de PBS + 0.5% β-mercapto. El PBS actua com a tampó i el β-mercapto com a agent reductor.
9. Sonicar les cèl·lules en gel amb pulsos de 0.6 s durant 8 min. En aquest pas es trenquen parets i membranes cel·lulars i s'allibera el citoplasma. Donat que les MTs són molt riques en grups -SH i molt sensibles a l'oxidació, a partir d'aquest moment es

treballà amb molt cura sota una atmosfera d'argó, un gas inert que desplaça l'oxígen. De la mateixa manera, totes les solucions utilitzades seran tractades previament amb argó.

10. Centrifugar a 20000 g (11120 rpm en Sorvall) durant 20 min a 4°C. En aquest pas es precipiten les estructures cel·lulars.
11. Recollir el sobrenadant vigilant molt bé no recollir gens de sediment.
12. Incubar amb 3 ml de la reïna Glutathione-Sepharose-4B a temperatura ambient durant 90 min i amb agitació suau. En aquest pas la proteïna de fusió GST s'uneix a les boles de reïna. Restes del sediment provinents de l'apartat anterior podrien interferir en la unió de la GST amb la reïna disminuint el rendiment final de la purificació.
13. Centrifugar 5 min a 500 g (1440 rpm Beckmann) per precipitar la reïna.
14. Abocar suaument el sobrenadant. En aquest pas s'eliminen totes les protines i restes cel·lulars que no s'han lligat a la reïna.
15. Rentar la reïna tres vegades amb 15 ml de PBSx1 tractat amb argó.
16. Afegir 1.5 ml de PBSx1 i 75 µl de trombina (1 u/µl) i incubar durant tota la nit a 22-25°C sense agitació. En aquest pas la trombina reconeix la diana de la zona de unió de QsMT i GST i la digereix.
17. Centrifugar 5 min a 500g, recollir el sobrenadant, i tornar a rentar el sediment amb 1.5 ml de PBS. En el sediment quedarà la reïna amb la proteïna GST, i en el sobrenadant QsMT lliure i la trombina.
18. Centrifugar el sobrenadant 5 min a 500 g i recollir el sobrenadant. Repetir aquest pas fins a eliminar qualsevol resta de reïna.
19. Concentrar el sobrenadant mitjançant una columna centriprep Microcon 3 (Amicon). Centrifugar a 3500 rpm i 4°C durant 15 min, eliminar el solut filtrat i repetir fins aconseguir un volum final de 500 µl.
20. Purificar i separar la mostra per FPLC en columna Superdex75 (Amersham Pharmacia) equilibrada amb TrisHCl 50 mM a pH7.

4.2. Anàlisi espectroscòpic i espectromètric

En funció del metall suplementat en el medi de cultiu d'*E. coli* (Cu, Zn o Cd), es van obtenir 3 agregats per cadascuna de les construccions. Els anàlisis espectroscòpics i espectromètrics es van realitzar per cadascuna d'aquestes mostres i es van fer per triplicat. Aquests anàlisis van ser duts a terme per Jordi Domènech del Departament de Genètica de la Universitat de Barcelona en els serveis Científico-Tècnics de la Universitat de Barcelona. En aquest apartat es comenta breument les tècniques utilitzades, la metodologia concreta s'especifica en l'apartat de material i mètodes dels articles 1, 2 i 3 d'aquesta memòria.

Espectroscòpia d'emissió òptica de plasma acoblat inductivament o ICP-OES (Inductively Coupled Plasma Optic Emission Spectroscopy).

Aquesta tècnica mesura la mostra a nivell elemental: detecta i quantifica els diferents elements d'interès utilitzant una longitud d'ona apropiada per cadascun d'ells. Requereix d'unes rectes d'estandarització molt acurades. Per cadascun dels agregats metàl·lics es va mesurar la quantitat de S, Cu, Zn i Cd. La mesura del S es va utilitzar per determinar la concentració de proteïna de la mostra, assumint que tot el sofre provenia de la seqüència proteïca (suma de cisteïnes i metionines). De la concentració de metalls en relació a la de sofre en resulta la proporció metàl·lica de la proteïna.

S'ha descrit que en alguns casos elements inorgànics poden participar en l'estructura dels agregats metàl·lics de les MTs, aparentment estabilitzant l'estructura. Per evitar possibles interaccions d'elements inorgànics amb la quantificació de la concentració de proteïna addicionalment es va mesurar el contingut en S de l'apoproteïna, la proteïna demetal·lada per acidificació amb HCl a pH 1.5.

Test d'Ellman

Les cisteïnes de les MTs són molt propenses a la oxidació i formació de ponts dissofre. L'oxidació de les cisteïnes porta a una baixa estimació de les proporcions metàl·liques per ICP-OES. Per corregir aquest error es va mesurar el grau d'oxidació de les mostres pel mètode d'Ellmann. Generalment, amb el mètode de purificació utilitzat, el percentatge d'oxidació se situa al voltant del 25%, i s'haurà de tenir en compte a l'hora de interpretar els resultats.

Anàlisi d'aminoàcids

L'anàlisi d'aminoàcids consisteix a hidrolitzar la mostra pura de proteïna i mesurar-ne la concentració a partir de la quantificació de determinats aminoàcids.

Espectrometria de masses amb mode de treball electrosprai o ESI-MS (ElectroSpray Ionization Mass Spectrometry)

L'espectrometria de masses és una de les tècniques analítiques més utilitzades actualment en l'estudi de les MTs per la seva rapidesa, elevada sensibilitat i capacitat d'identificació en base a una petita quantitat de mostra. L'espectrometria de masses ionitza de forma suau la mostra i genera un espectre de masses de les espècies metall-MT en solució. Coneixent la massa molecular teòrica de la proteïna i la dels metalls que pot estar lligant se'n dedueix l'estequiometria.

Un dels inconvenients en l'estudi de les MTs és que la tècnica no és prou sensible per discernir entre les masses moleculars del Zn i el Cu, i s'haurà de recórrer a les dades de ICP-OES per saber-ne la proporció.

Dicroïsme Circular o CD (Circular Dichroism)

Per a la determinació de l'estructura dels agregats metàl·lics una de les tècniques més utilitzades ha estat el dicroïsme circular (CD). Aquesta tècnica és molt resolutive i té pocs requisits experimentals (no són necessàries mostres d'elevada concentració ni cristal·lines). Les metal·lotioneïnes gairebé no tenen elements d'estructura secundària en la seva seqüència, i només adopten la forma plegada en unió a metalls. El CD mesura la capacitat d'una proteïna de desviar el pla de llum polaritzada i dóna informació sobre el seu grau d'estructuració, que en el cas de les MTs ve determinat per la unió metall-cisteïna i variarà en funció del tipus i nombre de metalls.

En les valoracions es mesura el canvi en el patró de CD que produeix en una mostra la substitució d'un metall per un altre metall més afí. Aquest segon metall s'afegeix paulatinament i s'ha de quantificar molt bé la concentració de la mostra i del metall en cada moment.

Cromatografia de Gasos acoplada a un Detector Fotomètric de Flama o GC-FPD (Gas Chromatography Interfaced to Flame Photometric Detection)

Aquesta tècnica mesura compostos volàtils de sofre. S'acidifiquen les mostres per generar gas sulfhídric (H_2S), i s'analitzen per cromatografia de gasos comparant les dades amb una recta patró generada a partir d'una solució de Na_2S 1000 ppm de sulfur.

5. DETECCIÓ DE mRNA EN SECCIONS HISTOLÒGIQUES, HIBRIDACIÓ *in situ*

La hibridació *in situ* permet la localització de l'expressió d'un gen mitjançant una sonda complementària a l'mRNA marcada i fàcilment detectable. El protocol seguit l'hem separat en 3 etapes principals: preparació de les ribosondes; fixació, inclusió i microtòmia; hibridació i detecció.

El sistema de marcatge i detecció utilitzat és el *DIG system* que ofereix la casa comercial Roche. El *DIG system* es basa en la digoxigenina, un esteroid que només es troba en certes plantes del gènere *Digitalis*, que s'ha unit a la base uracil i s'incorpora a l'RNA durant la transcripció del cDNA. La digoxigenina és després reconeguda per un anticòs específic que porta associat l'enzim fosfatasa alcalina. El revelat es fa amb l'addició d'un substracte incolor que per acció de la fosfatasa alcalina es transforma donant coloració blavosa. Aquest sistema de marcatge i detecció, tot i ser menys sensible que altres basats en la radiactivitat o quimioluminiscència, és més quantitatiu i no arrossega tots els inconvenients del treball amb radiactivitat.

En tots els passos s'ha de tenir especial cura en evitar el contacte amb les RNAses exògenes que podrien degradar les ribosondes o l'RNA de les mostres. Es treballa sempre amb guants, el material fungible és d'un sol ús o, en el seu defecte, és prèviament fornejat a 200°C tota la nit o autoclavat a 120°C durant 30 minuts. Les diferents solucions són preparades amb soluts lliures de RNAses i dissoltes en aigua prèviament tractada amb 0.1% dietilpirocarbonat (DEPC, Sigma).

5.1. Preparació de la ribosonda marcada amb digoxigenina

Com a DNA motlle s'utilitza el clo de la llibreria de cDNA que conté *QsMT*. Tots els clons de la llibreria estan flanquejats pels promotors T3 i T7, reconeguts pels enzims T3 i T7 RNA polimerases DNA dependents, que permeten la transcripció del DNA a RNA.

S'utilitzen dues sondes: (i) l'antisentit és complementària al mRNA que es vol detectar, s'hi hibrida formant una doble cadena d'RNA molt estable (ii) la sentit és igual al mRNA que es vol detectar, no s'hi hibrida i s'utilitza com a control negatiu.

La preparació de la ribosonda consta d'un primer pas d'amplificació del cDNA de *QsMT* per PCR amb els encebadors T3 i T7 i d'un segon pas de síntesi i marcatge de la cadena de RNA.

Amplificació del cDNA:

S'utilitzen els encebadors T3 i T7 i es fa la PCR en condicions estàndard i 60°C de temperatura d'hibridació. El producte de PCR es neteja per membrana de sílica gel en columna i es quantifica.

Síntesi de la ribosonda marcada amb digoxigenina:

Protocol:

1. Afegir en un tub de microcentrífuga els següents reactius:

Tampó de transcripció 5x (Stratagene) ...	4 µl
DIG RNA labeling mix 10x (Roche)	2 µl
RNAsina (Promega) (40 U/ml)	1 µl
RNA polimerasa T3 o T7 (Stratagene)	2 µl
Producte de PCR net	200 ng
H ₂ O lliure de RNAses	fins a 20 µl

2. Incubar a 37°C durant 2 hores

3. Fer el tractament de DNasa per degradar el DNA motlle. Afegir a la reacció anterior:

Tampó DNasa I	5 µl
40 mM Tris-HCl, pH 7.5	
6 mM MgCl ₂	
2 mM CaCl ₂	
DNasa RQ1 (lliure de RNAses) (Promega)	1 µl
RNAsina	2 µl
H ₂ O lliure de RNAses	fins a 50 µl

4. Incubar a 37°C durant 15 min.

5. Comprovar la transcripció per gel d'agarosa amb bromur d'etidi, assegurant que la mida és la correcta (pot aparèixer una mica per sobre del DNA per el tampó i el marcatge amb digoxigenina), que no hi ha degradació i que no queden restes de DNA.

6. Precipitar la sonda amb 0.1 volums d'acetat de sodi 3M pH 5.2, 0.7 volums d'isopropanol i amb 0.25 µg/µl de tRNA.

7. Deixar precipitar tota la nit a -20°C

8. Centrifugar 20 min a 12000 rpm

9. Netejar el precipitat amb etanol 70 i tornar a centrifugar

10. Ressuspèndre amb H₂O i quantificar. La concentració final de sonda que s'utilitzarà dependrà, entre d'altres factors, de l'expressió del gen a analitzar. Així per missatgers molt abundants s'utilitzen concentracions entre 100 i 500 ng/ml, i per gens menys abundants entre 600 i 1000 ng/ml. La concentració de la sonda és un paràmetre que es pot ajustar experimentalment en funció dels resultats. En aquest treball s'han utilitzat concentracions entre 300 i 400 ng/ml.

11. Guardar la sonda en alíquotes a -20°C fins al moment de la utilització.

5.2. Fixació, inclusió i microtòmia

Aquest és un procés llarg i delicat que dependrà en gran mesura del teixit a fixar, especialment de la mida i duresa. Els embrions joves requereixen temps de fixació i inclusió relativament curts respecte els necessaris per mostres més madures com la tija. La optimització del protocol s'ha de fer experimentalment per cada tipus de mostra. La preparació dels talls histològics consta de 4 passos generals: la fixació, la deshidratació, la inclusió i la microtòmia.

Fixació

La fixació de les mostres evita la degradació del teixit per inactivació enzimàtica, evita l'aparició d'artefactes per difusió de pèptids i proteïnes entre cèl·lules i endureix el teixit de cares a tractaments posteriors.

Protocol:

1. Preparar la solució fixadora:
 - Afegir 10 g de paraformaldehid en 250 ml tampó fosfat sòdic (PBS) 0.1 M
 - Ajustar el pH a 7.5
 - Escalfar a 60°C en agitació fins a la completa dissolució. El paraformaldehid és molt tòxic i totes les manipulacions s'hauran de fer sota campana extractora de gasos i/o amb mascareta.
2. Deixar refredar a temperatura ambient i després a 4°C. És important mantenir-lo ben fred fins al moment de la fixació per evitar la oxidació o degradació del teixit mentre el fixador no penetra la mostra.
3. Submergir la mostra solució fixadora (vial amb aproximadament 15 ml) durant 1 hora a 4°C i fer el buit per facilitar-ne la penetració. Mantenir la mostra en solució fixadora al buit durant 2-3 dies, renovant la solució fixadora 2-3 vegades al dia.

Deshidratació

La solució fixadora és aquosa i en aquest pas es substitueix l'aigua de les cèl·lules per etanol, de manera que és molt important fer els passos molt gradualment per eliminar tota l'aigua sense malmetre l'estructura cel·lular.

Es segueix una sèrie alcohòlica amb etanol i amb etanol-TBA (tert-Butanol 2-Methyl-2-propanol, Sigma), fent els canvis en el mateix vial i a 4°C.

Sèrie alcohòlica:

1. etanol 70%, mínim durant 48 h, dos canvis per dia. En aquest punt les mostres es poden mantenir molt de temps, vigilant que no s'assequin.
2. etanol 80%, 1h.
3. etanol 90%, 1h.
4. etanol 100%, dos canvis de 1 h cadascun.
5. $\frac{3}{4}$ parts d'etanol 100% i $\frac{1}{4}$ part de TBA, 1h
6. $\frac{1}{2}$ part d' etanol 100% i $\frac{1}{2}$ part de TBA, 1h
7. TBA 100% 1h.

Inclusió amb parafina

1. Es fa un primer pas per afavorir l'intercanvi de TBA per la parafina transferint les mostres a un nou vial amb 1/3 part de TBA i 2/3 parts d'oli de parafina (Mineral Oil, Sigma), a 30°C durant un mínim de 12 h o fins que el TBA s'evapora completament.
2. Escalfar els vials amb parafina (Paraplast, Sigma) a 60°C i afegir-hi les mostres i agitar. Manténir a 58-59°C durant un mínim de 48 h, amb dos canvis per dia, transferint les mostres a nous vials de parafina fosa amb unes pinces escalfades.
3. Preparar els motlles per fer el bloc (es poden fer amb paper, que serà més fàcil per desenmotllar), afegir la parafina fosa i les mostres, orientant-les segons els tall que es vulgui fer.
4. Solidificar en una placa calefactora a 30°C perquè es faci de forma més lenta i homogènia. Guardar a 4°C fins al moment de tallar-los.

Microtomia

Malgrat és molt difícil mantenir condicions lliures de RNAses durant aquests passos, el material utilitzat per a la microtomia ha estat esterilitzat. Els talls s'han fet a 8-10 μm . Per afavorir l'adherència del tall en el portaobjectes es van tractar prèviament amb poli-D-lisina.

1. Orientar el bloc i tallar-lo en forma de trapezi amb un bisturí.
2. Orientar el bloc en el micròtom i seccionar la mostra.
3. Extendre els talls en un bany a 35°C, mantenint la cara hidrofílica del tall a sota, en contacte amb l'aigua, i la hidrofòbica a sobre.
4. Recollir els talls en portaobjectes previament tractats amb poli-D-lisina i mantenir en placa calefactora a 42°C durant un mínim de 30 min i a temperatura ambient, protegits de la llum i la pols, durant 48h o fins s'assequin completament.
5. Es poden guardar els portaobjectes protegits i amb sílica gel, tot i que els talls perden adherència amb el temps.

Pretractament dels portaobjectes amb poli-D-lisina:

1. Submergir els portaobjectes en aigua destil·lada DEPC durant 2 h i fornejar tota la nit a 80°C. Aquest tractament és per eliminar les RNAses i només serà necessari si en treballa amb RNA.
2. Submergir els portaobjectes en una solució de poly-D-Lysine 50 µg/ml (Sigma) en Tris-HCl 10 mM pH 8.0 durant 30 min a temperatura ambient.
3. Deixar assecar i guardar en condicions lliures de RNAses. Es poden guardar mesos abans de fer-los servir.

5.3. Hibridació i detecció

Pretractament dels talls histològics

Cada pas es fa en cistelles amb capacitat per a 50 portaobjectes i cubetes de 375 ml. El pretractament s'ha realitzat just abans de la hibridació. Tot el material i reactius són lliures d'RNAses i es treballa amb cura per evitar-ne la contaminació.

1. Desparafinar les mostres amb xilol: 2 canvis de 10 min cadascun.
2. Rehidratar amb una sèrie alcohòlica: (1) etanol 96%, dos canvis de 2 min cadascun; (2) etanol 70%, 2 min; (3) etanol 50%, 2 min; (4) etanol 30%, 2 min; (5) H₂O destil·lada, dos canvis de 2 min cadascun.
3. Tractar amb 0.2 M HCl en H₂O destil·lada 20 min a temperatura ambient. El tractament amb clorhídric afavoreix el trencament d'estructures del teixits que dificultarien l'entrada de la sonda.
4. Rentar amb aigua destil·lada 5 min.
5. Incubar 30 min a 37°C en 100 mM TrisHCl pH 8.0, 50 mM EDTA, 1µg/ml proteinasa K (Roche). La proteïnasa K trenca estructures cel·lulars de naturalesa proteica i facilita l'entrada de la sonda dins les cèl·lules.
6. Rentar en PBS a temperatura ambient.
7. Bloquejar la proteasa incubant 2 min en una solució amb 2 mg/ml de glicina (Sigma) en tampó PBS.
8. Rentar en PBS amb 2 canvis de 30 s cadascun.
9. Refixar amb solució de formaldehid al 4% amb PBS durant 20 min a temperatura ambient. La solució de PBS amb formaldehid s'ha d'escalfar a 60°C perquè es dissolgui, per tant s'ha de preparar amb antel·lació i deixar-la refredar. El formaldehid genera gasos molt tòxics i la solució es prepara sota campana.
10. Rentar amb PBS, 2 canvis de 5 min.
11. Deshidratar mitjançant sèrie alcohòlica: (1) etanol 30% 2 min; (2) etanol 50%, 2 min; (3) etanol 70%, 2 min; (4) etanol 96%, 2 canvis de 2 min cadascun.

12. Embolicar les cistelles amb paper secant. En aquest pas es pot aturar el procés durant 24h o passar a la hibridació.

Hibridació

1. Preparar i preescalfar la quantitat necessària de tampó d'hibridació a 50°C.
Tampó d'hibridació: 50 % formamida, 5xSSC, 100 µg/ml tRNA, 2% SDS.
2. Ressuspèndre la quantitat de sonda necessària en el tampó d'hibridació preescalfat i mantenir a 55°C durant 10 min.
3. Col·locar els portaobjectes sobre un suport pla i afegir a cadascun 40 µl de la solució amb ribosonda. Per assegurar que la sonda arriba a tota la preparació es tapa amb un cubreobjectes, vigilat que no es formin bombolles.
4. Deixar hibridar tota la nit a 55°C en càmera humida. El temp de hibridació es pot modificar en funció de la concentració de la sonda i l'abundància del transcript a detectar. La temperatura de hibridació és un dels paràmetres més utilitzats per regular les condicions d'estringència. S'utilitzen temperatures de 40°C a 60°C, variant segons les necessitats d'estringència i la mida de la sonda. La càmera humida consisteix en posar papers mullats amb aigua en la caixa de plàstic on hi tenim els portaobjectes, i embolicar-la bé per evitar l'evaporació.
5. Retirar els cubreobjectes amb cura de no malmenar la mostra, generalment n'hi ha prou en submergir el portaobjectes en la solució de rentat i agitar lleument.
6. Rentats: (1) SSC 2x, 2 min; (2) SSC 1x + SDS 0.1%, dos canvis de 5 min a temperatura ambient; (3) SSC 0.2x + SDS 0.1%, dos canvis de 10 min a 55°C.
Amb aquests rentats s'elimina la sonda que no ha quedat hibridada. La concentració salina de la solució de rentat, la quantitat de detergent (SDS), la temperatura i el temps de rentat, són molt importants i determinen en gran part l'estringència de la hibridació. Sovint aquestes condicions hauran de ser modificades i trobades experimentalment si els resultats donen soroll de fons o no hi ha senyal.
7. Tractar els talls amb RNasa A per assegurar l'eliminació de les sondes no hibridades i reduir el soroll de fons: 10 µg/ml de RNasa A (Sigma) en SSC 2x, 30 min a 37°C.
8. Rentar 2 min en SSC 2x

Bloqueig, incubació amb anticòs i rentats

1. Rentar amb tampó TBS durant 5 min.
Tampó TBS: 100 mM Tris-HCl pH 7.5, 400 mM NaCl.
2. Incubar en solució de bloqueig durant 1 h.
Solució de bloqueig: 0.5% (pes/volum) de *Blocking agent* (Roche) en TBS.
3. Rentar amb tampó TBS durant 1 min.

4. Diluir l'anticòs anti-digoxigenina lligat a la fosfatasa alcalina (Roche) a una concentració de 1:1000 en 0.5% (pes/volum) de BSA en TBS. La dilució de l'anticòs pot variar en funció de l'abundància del missatger i dels resultats obtinguts.
5. Col·locar els portaobjectes en un suport pla, afegir 100 µl de solució d'anticòs a cada portaobjectes procurant que arribi a tota la mostra i evitant l'aparició de bombolles. Incubar durant 1h en càmera humida.
6. Rentar les preparacions en TBS amb tres rentats de 5 min cadascun.

Detecció

1. Rentar les preparacions amb tampó de detecció durant 5 min.
Tampó de detecció: 100 mM Tris-HCl pH 9.5, 100 mM NaCl, 50 mM MgCl₂
2. Col·locar els portaobjectes en un suport pla, afegir 100 µl de solució de detecció i incubar en fosc fins que es vegi coloració intensa (màxim durant 16 hores). És important tenir cura a repartir la solució de forma homogènia per tot el tall.
Solució de detecció (10 ml): 45µl NBT (Roche) + 35µl BCIP (Roche) en 10 ml de tampó de detecció.
3. Aturar la reacció amb aigua destil·lada. Col·locar els portaobjectes en la cistella i fer dos rentats de 2 min cadascun en H₂O destil·lada.
4. Deshidratar amb un sèrie alcohòlica: (1) etanol 30%, 1 min; (2) etanol 50%, 1min; (3) etanol 70%, 1 min; (4) etanol 90%, 1 min; (5) etanol 96%, 2 rentats, 1 min cadascun; (6) xilol, 2 rentats, 1 min cadascun.
5. Afegir 1-2 gotes de la resina Entellan (Merk) i muntar amb el cubreobjectes.
6. Deixar assecar i fer la observació al microscopi. L'anàlisi de les mostres es va fer amb un microscopi Olympus AH-2 i la càmera de fotografia digital acoblada Olympus CAMEDIA C-4040ZOOM.

VII. BIBLIOGRAFIA

VII. BIBLIOGRAFIA

- Akashi, K., Nishimura, N., Ishida, Y. i Yokota, A.** (2004) "Potent hydroxyl radical-scavenging activity of drought-induced type-2 metallothionein in wild watermelon" *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 323, no. 1, pp. 72-78.
- Andrews, G.K.** (2000) "Regulation of metallothionein gene expression by oxidative stress and metal ions" *Biochemical Pharmacology*, vol. 59, no. 1, pp. 95-104.
- Arabidopsis Genome Initiative.** (2000) "Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*" *Nature*, vol. 408, no. 6814, pp. 796-815.
- Bauman, J.W., Liu, J., Liu, Y.P. i Klaassen, C.D.** (1991) "Increase in metallothionein produced by chemicals that induce oxidative stress" *Toxicology and Applied Pharmacology*, vol. 110, no. 2, pp. 347-354.
- Bertini, I., Hartmann, H.J., Klein, T., Liu, G., Luchinat, C. i Weser, U.** (2000) "High resolution solution structure of the protein part of Cu7 metallothionein" *European Journal of Biochemistry/FEBS*, vol. 267, no. 4, pp. 1008-1018.
- Blindauer, C.A., Harrison, M.D., Parkinson, J.A., Robinson, A.K., Cavet, J.S., Robinson, N.J. i Sadler, P.J.** (2001) "A metallothionein containing a zinc finger within a four-metal cluster protects a bacterium from zinc toxicity" *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 98, no. 17, pp. 9593-9598.
- Brewer, G.J.** (2000) "Recognition, diagnosis, and management of Wilson's disease", *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N. Y.)*, vol. 223, no. 1, pp. 39-46.
- Brkljacic, J.M., Samardzic, J.T., Timotijevic, G.S. i Maksimovic, V.R.** (2004) "Expression analysis of buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) metallothionein-like gene (MT3) under different stress and physiological conditions" *Journal of Plant Physiology*, vol. 161, no. 6, pp. 741-746.
- Buchanan-Wollaston, V.** (1994) "Isolation of cDNA clones for genes that are expressed during leaf senescence in *Brassica napus*. Identification of a gene encoding a senescence-specific metallothionein-like protein" *Plant Physiology*, vol. 105, no. 3, pp. 839-846.

- Buchanan-Wollaston, V., Ainsworth, C.** (1997) "Leaf senescence in *Brassica napus*: cloning of senescence related genes by subtractive hybridisation" *Plant Molecular Biology*, vol. 33, no. 5, pp. 821-834.
- Butt, A., Mousley, C., Morris, K., Beynon, J., Can, C., Holub, E., Greenberg, J.T. i Buchanan-Wollaston, V.** (1998) "Differential expression of a senescence-enhanced metallothionein gene in *Arabidopsis* in response to isolates of *Peronospora parasitica* and *Pseudomonas syringae*" *The Plant Journal*, vol. 16, no. 2, pp. 209-221.
- Capdevila, M., Cols, N., Romero-Isart, N., Gonzalez-Duarte, R., Atrian, S. i Gonzalez-Duarte, P.** (1997) "Recombinant synthesis of mouse Zn3-beta and Zn4-alpha metallothionein 1 domains and characterization of their cadmium(II) binding capacity" *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, vol. 53, no. 8, pp. 681-688.
- Choi, D., Kim, H.M., Yun, H.K., Park, J.A., Kim, W.T. i Bok, S.H.** (1996) "Molecular cloning of a metallothionein-like gene from *Nicotiana glutinosa* L. and its induction by wounding and tobacco mosaic virus infection" *Plant Physiology*, vol. 112, no. 1, pp. 353-359.
- Chubatsu, L.S. i Meneghini, R.** (1993) "Metallothionein protects DNA from oxidative damage" *The Biochemical Journal*, vol. 291, pp. 193-198.
- Clemens, S.** (2001) "Molecular mechanisms of plant metal tolerance and homeostasis" *Planta*, vol. 212, no. 4, pp. 475-486.
- Clemens, S., Kim, E.J., Neumann, D. i Schroeder, J.I.** (1999) "Tolerance to toxic metals by a gene family of phytochelatin synthases from plants and yeast" *The EMBO Journal*, vol. 18, no. 12, pp. 3325-3333.
- Clemens, S., Palmgren, M.G. i Kramer, U.** (2002) "A long way ahead: understanding and engineering plant metal accumulation" *Trends in Plant Science*, vol. 7, no. 7, pp. 309-315.
- Clemens, S., Schroeder, J.I. i Degenkolb, T.** (2001) "*Caenorhabditis elegans* expresses a functional phytochelatin synthase" *European Journal of Biochemistry/FEBS*, vol. 268, no. 13, pp. 3640-3643.
- Clendennen, S.K., May, G.D.** (1997) "Differential gene expression in ripening banana fruit" *Plant Physiology*, vol. 115, no. 2, pp. 463-469.
- Cobbett, C. i Goldsbrough, P.** (2002) "Phytochelatin and metallothioneins: roles in heavy metal detoxification and homeostasis" *Annual Reviews of Plant Biology*, vol. 53, pp. 159-182.
- Cobbett, C.S.** (2000) "Phytochelatin and their roles in heavy metal detoxification" *Plant Physiology*, vol. 123, no. 3, pp. 825-832.
- Cooper, C.E., Patel, R.P., Brookes, P.S. i Darley-Usmar, V.M.** (2002) "Nanotransducers in cellular redox signaling: modification of thiols by reactive oxygen and nitrogen species" *Trends in Biochemical Sciences*, vol. 27, no. 10, pp. 489-492.
- Coupe, S.A., Taylor, J.E. i Roberts, J.A.** (1995) "Characterisation of an mRNA encoding a metallothionein-like protein that accumulates during ethylene-promoted abscission of *Sambucus nigra* L. leaflets" *Planta*, vol. 197, no. 3, pp. 442-447.
- Coyle, P., Philcox, J.C., Carey, L.C. i Rofe, A.M.** (2002) "Metallothionein: the multipurpose protein" *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, vol. 59, no. 4, pp. 627-647.

- Dallinger, R., Berger, B., Hunziker, P. i Kagi, J.H.** (1997) "Metallothionein in snail Cd and Cu metabolism" *Nature*, vol. 388, no. 6639, pp. 237-238.
- Dalton, T., Fu, K., Palmiter, R.D. i Andrews, G.K.** (1996) "Transgenic mice that overexpress metallothionein-I resist dietary zinc deficiency" *The Journal of Nutrition*, vol. 126, no. 4, pp. 825-833.
- Daniels, M.J., Turner-Cavet, J.S., Selkirk, R., Sun, H., Parkinson, J.A., Sadler, P.J. i Robinson, N.J.** (1998) "Coordination of Zn²⁺ (and Cd²⁺) by prokaryotic metallothionein. Involvement of histimidazole" *Journal of Biological Chemistry*, vol. 273, no. 36, pp. 22957-22961.
- Davies, C., Robinson, S.P.** (2000) "Differential screening indicates a dramatic change in mRNA profiles during grape berry ripening. Cloning and characterization of cDNAs encoding putative cell wall and stress response proteins" *Plant Physiology*, vol. 122, no. 3, pp. 803-812.
- De, S.K., McMaster, M.T. i Andrews, G.K.** (1990) "Endotoxin induction of murine metallothionein gene expression" *Journal of Biological Chemistry*, vol. 265, no. 25, pp. 15267-15274.
- Domenech, J., Palacios, O., Villarreal, L., Gonzalez-Duarte, P., Capdevila, M. i Atrian, S.** (2003) "MTO: the second member of a *Drosophila* dual copper-thionein system" *FEBS letters*, vol. 533, no. 1-3, pp. 72-78.
- Dominguez-Solis, J.R., Gutierrez-Alcala, G., Vega, J.M., Romero, L.C. i Gotor, C.** (2001) "The cytosolic O-acetylserine(thiol)lyase gene is regulated by heavy metals and can function in cadmium tolerance" *Journal of Biological Chemistry*, vol. 276, no. 12, pp. 9297-9302.
- Evans, I.M., Gatehouse, L.N., Gatehouse, J.A., Robinson, N.J. i Croy, R.R.** (1990) "A gene from pea (*Pisum sativum* L.) with homology to metallothionein genes" *FEBS letters*, vol. 262, no. 1, pp. 29-32.
- Evans, K.M., Gatehouse, J.A., Lindsay, W.P., Shi, J., Tommey, A.M. i Robinson, N.J.** (1992) "Expression of the pea metallothionein-like gene *PsMTA* in *Escherichia coli* and *Arabidopsis thaliana* and analysis of trace metal ion accumulation: implications for *PsMTA* function" *Plant Molecular Biology*, vol. 20, no. 6, pp. 1019-1028.
- Fabisiak, J.P., Borisenko, G.G., Liu, S.X., Tyurin, V.A., Pitt, B.R. i Kagan, V.E.** (2002) "Redox sensor function of metallothioneins" *Methods in Enzymology*, vol. 353, pp. 268-281.
- Facheris, M., Beretta, S. i Ferrarese, C.** (2004) "Peripheral markers of oxidative stress and excitotoxicity in neurodegenerative disorders: tools for diagnosis and therapy?" *Journal of Alzheimer's Disease*, vol. 6, no. 2, pp. 177-184.
- Fernandez-Guijarro, B., Celestino, C. i Toribio, M.** (1995) "Influence of external factors on secondary embryogenesis and germination in somatic embryos from leaves of *Quercus suber* L." *Plant Cell Tissue Organ Culture*, vol. 41, pp. 99-106.
- Fischer, E.H., Davie, E.W.** (1998) "Recent excitement regarding metallothionein" *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 95, no. 7, pp. 333-334.
- Foley, R.C., Liang, Z.M. i Singh, K.B.** (1997) "Analysis of type 1 metallothionein cDNAs in *Vicia faba*" *Plant Molecular Biology*, vol. 33, no. 4, pp. 583-591.
- Fowler, B.A., Hildebrand, C.E., Kojima, Y. i Webb, M.** (1987) "Nomenclature of metallothionein", *Experientia Supplementum*, vol. 52, pp. 19-22.
- Furey, W.F., Robbins, A.H., Clancy, L.L., Winge, D.R., Wang, B.C. i Stout, C.D.** (1986) "Crystal structure of Cd,Zn metallothionein" *Science*, vol. 231, no. 4739, pp. 704-710.

- Garcia-Hernandez, M., Murphy, A. i Taiz, L.** (1998) "Metallothioneins 1 and 2 have distinct but overlapping expression patterns in Arabidopsis" *Plant Physiology*, vol. 118, no. 2, pp. 387-397.
- Giles, G.I., Tasker, K.M., Collins, C., Giles, N.M., O'rourke, E. i Jacob, C.** (2002) "Reactive sulphur species: an in vitro investigation of the oxidation properties of disulphide S-oxides" *The Biochemical Journal*, vol. 364, pp. 579-585.
- Grill, E., Loffler, S., Winnacker, E.L. i Zenk, M.H.** (1989), "Phytochelatin, the Heavy-Metal-Binding Peptides of Plants, are Synthesized from Glutathione by a Specific Glutamylcysteine Dipeptidyl Transpeptidase (Phytochelatin Synthase) " *PNAS*, vol. 86, pp. 6838-6842.
- Guo, W.J., Bundithya, W. i Goldsbrough, P.B.** (2003) "Characterization of the Arabidopsis metallothionein gene family: tissue-specific expression and induction during senescence and in response to copper" *New Phytologist*, vol. 159, no. 2, pp. 369-381.
- Hall, J.L.** (2002) "Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance" *Journal of Experimental Botany*, vol. 53, no. 366, pp. 1-11.
- Haq, F., Mahoney, M. i Koropatnick, J.** (2003), "Signaling events for metallothionein induction", *Mutation research*, vol. 533, no. 1-2, pp. 211-226.
- Hsieh, H.M., Liu, W.K. i Huang, P.C.** (1995) "A novel stress-inducible metallothionein-like gene from rice" *Plant Molecular Biology*, vol. 28, no. 3, pp. 381-389.
- Hudspeth, R.L., Hobbs, S.L., Anderson, D.M., Rajasekaran, K. i Gula, J.W.** (1996) "Characterization and expression of metallothionein-like genes in cotton" *Plant Molecular Biology*, vol. 31, no. 3, pp. 701-705.
- Jacob, C., Maret, W. i Vallee, B.L.** (1998) "Control of zinc transfer between thionein, metallothionein, and zinc proteins" *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 95, no. 7, pp. 3489-3494.
- Jiang, K., Meng, Y.L. i Feldman, L.J.** (2003) "Quiescent center formation in maize roots is associated with an auxin-regulated oxidizing environment" *Development (Cambridge, England)*, vol. 130, no. 7, pp. 1429-1438.
- Jiang, L.J., Maret, W. i Vallee, B.L.** (1998) "The ATP-metallothionein complex" *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 95, no. 16, pp. 9146-9149.
- Jiang, L.J., Maret, W. i Vallee, B.L.** (1998) "The glutathione redox couple modulates zinc transfer from metallothionein to zinc-depleted sorbitol dehydrogenase" *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 95, no. 7, pp. 3483-3488.
- Jofre, A., Molinas, M. i Pla, M.** (2003) "A 10-kDa class-C1 sHsp protects *E. coli* from oxidative and high-temperature stress" *Planta*, vol. 217, no. 5, pp. 813-819.
- Juang, R.H., McCue, K.F. i Ow, D.W.** (1993) "Two purine biosynthetic enzymes that are required for cadmium tolerance in *Schizosaccharomyces pombe* utilize cysteine sulfinic acid in vitro" *Archives of Biochemistry and Biophysics*, vol. 304, no. 2, pp. 392-401.
- Kagi, J.H.** (1991) "Overview of metallothionein" *Methods in Enzymology*, vol. 205, pp. 613-626.
- Kambe, T., Yamaguchi-Iwai, Y., Sasaki, R. i Nagao, M.** (2004) "Overview of mammalian zinc transporters" *Cellular and molecular life sciences: CMLS*, vol. 61, no. 1, pp. 49-68.

- Karin, M., Najarian, R., Haslinger, A., Valenzuela, P., Welch, J. i Fogel, S.** (1984) "Primary structure and transcription of an amplified genetic locus: the CUP1 locus of yeast", Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 81, no. 2, pp. 337-341.
- Kawashima, I., Inokuchi, Y., Chino, M., Kimura, M. i Shimizu, N.** (1991) "Isolation of a gene for metallothionein-like protein from soybean" Plant Cell Physiology, vol. 32, no. 6, pp. 913-916.
- Kawashima, I., Kennedy, T.D., Chino, M. i Lane, B.G.** (1992) "Wheat Ec metallothionein genes. Like mammalian Zn²⁺ metallothionein genes, wheat Zn²⁺ metallothionein genes are conspicuously expressed during embryogenesis" European journal of biochemistry / FEBS, vol. 209, no. 3, pp. 971-976.
- Kelly, E.J., Quaife, C.J., Froelick, G.J. i Palmiter, R.D.** (1996) "Metallothionein I and II protect against zinc deficiency and zinc toxicity in mice" The Journal of Nutrition, vol. 126, no. 7, pp. 1782-1790.
- Kille, P., Winge, D.R., Harwood, J.L. i Kay, J.** (1991) "A plant metallothionein produced in *E. coli*" FEBS letters, vol. 295, no. 1-3, pp. 171-175.
- Klaassen, C.D., Liu, J. i Choudhuri, S.** (1999) "Metallothionein: an intracellular protein to protect against cadmium toxicity" Annual Review of Pharmacology and Toxicology, vol. 39, pp. 267-294.
- Kojima, Y.** (1991) "Definitions and nomenclature of metallothioneins" Methods in enzymology, vol. 205, pp. 8-10.
- Kojima, Y., Binz, P.A. i Kagi, J.H.R.** (1999) "Nomenclature of metallothionein: proposal for a revision" in *Metallothionein IV*, eds. Y. Kojima, P.A. Binz i J.H.R. Kagi, 1st edn, Klaassen C., Birkhauser Verlag, Basel.
- Kupper, H., Lombi, E., Zhao, F.J. i McGrath, S.P.** (2000) "Cellular compartmentation of cadmium and zinc in relation to other elements in the hyperaccumulator *Arabidopsis halleri*" Planta, vol. 212, no. 1, pp. 75-84.
- Lane, B.G., Kajioka, R.: Kennedy, T. D.** (1987) "The weat germ Ec protein is a zinc-containing metallothionein" Biochemistry and Cell Biology, vol. 65, pp. 1001-1005.
- Lazo, J.S., Kondo, Y., Dellapiazza, D., Michalska, A.E., Choo, K.H.A. i Pitt, B.R.** (1995) "Enhanced Sensitivity to Oxidative Stress in Cultured Embryonic Cells from Transgenic Mice Deficient in Metallothionein I and II Genes " The Journal of Biological Chemistry, vol. 270, pp. 5506-5510.
- Ledger, S.E., Gardner, R.C.** (1994) "Cloning and characterization of five cDNAs for genes differentially expressed during fruit development of kiwifruit (*Actinidia deliciosa* var. *deliciosa*)" Plant Molecular Biology, vol. 25, no. 5, pp. 877-886.
- Lee, J., Donghwan, S., Won-yong, S., Inhwan, H. i Youngsook, L.** (2004) "Arabidopsis metallothioneins 2a and 3 enhance resistance to cadmium when expressed in *Vicia faba* guard cells" Plant Molecular Biology, vol. 54, pp. 805-815.
- Liu, J., Hara, C., Umeda, M., Zhao, Y., Okita, T.W. i Uchimiya, H.** (1995) "Analysis of randomly isolated cDNAs from developing endosperm of rice (*Oryza sativa* L.): evaluation of expressed sequence tags, and expression levels of mRNAs" Plant Molecular Biology, vol. 29, no. 4, pp. 685-689.
- Liu, J., Liu, Y., Hartley, D., Klaassen, C.D., Shehin-Johnson, S.E., Lucas, A. i Cohen, S.D.** (1999) "Metallothionein-I/III knockout mice are sensitive to acetaminophen-induced hepatotoxicity" The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, vol. 289, no. 1, pp. 580-586.

- Liu, Y., Liu, J., Iszard, M.B., Andrews, G.K., Palmiter, R.D. i Klaassen, C.D.** (1995) "Transgenic mice that overexpress metallothionein-I are protected from cadmium lethality and hepatotoxicity" *Toxicology and Applied Pharmacology*, vol. 135, no. 2, pp. 222-228.
- Ma, M., Laub, P., Jiab, Y., Tsangb, W., Lama, S., Tama, N. i Wong, Y.** (2003) "The isolation and characterization of Type 1 metallothionein (MT) cDNA from a heavy-metal-tolerant plant, *Festuca rubra* cv. Merlin" *Plant Science*, vol. 164, pp. 51-60.
- Maret, W.** (1994) "Oxidative metal release from metallothionein via zinc-thiol/disulfide interchange" *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 91, no. 1, pp. 237-241.
- Margoshes, M., Vallee, B.L.** (1957) "A cadmium protein from equine kidney cortex" *Journal of the American Chemical Society*, vol. 79, pp. 4813-4814.
- Masters, B.A., Kelly, E.J., Quaife, C.J., Brinster, R.L. i Palmiter, R.D.** (1994) "Targeted disruption of metallothionein I and II genes increases sensitivity to cadmium" *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 91, no. 2, pp. 584-588.
- Mejare, M., Bulow, L.** (2001) "Metal-binding proteins and peptides in bioremediation and phytoremediation of heavy metals, *Trends in Biotechnology*, vol. 19, no. 2, pp. 67-73.
- Meneghini, R.** (1997) "Iron homeostasis, oxidative stress, and DNA damage" *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 23, no. 5, pp. 783-792.
- Miller, J.D., Arteca, R.N. i Pell, E.J.** (1999) "Senescence-associated gene expression during ozone-induced leaf senescence in *Arabidopsis*" *Plant Physiology*, vol. 120, no. 4, pp. 1015-1024.
- Miranda, J.R., Thomas, M.A., Thurman, D.A. i Tomsett, A.B.** (1990) "Metallothionein genes from the flowering plant *Mimulus guttatus*" *FEBS letters*, vol. 260, no. 2, pp. 277-280.
- Murashige, T. & Skoog, T.** (1962) "A revised medium for growth and bioassays with tobacco tissue cultures" *Plant Physiology*, vol. 15, pp. 473-479.
- Murphy, A., Taiz, L.** (1995), "Comparison of metallothionein gene expression and nonprotein thiols in ten *Arabidopsis* ecotypes. Correlation with copper tolerance", *Plant physiology*, vol. 109, no. 3, pp. 945-954.
- Navabpour, S., Morris, K., Allen, R., Harrison, E., Mackerness, S. i Buchanan-Wollaston, V.** (2003) "Expression of senescence-enhanced genes in response to oxidative stress" *Journal of Experimental Botany*, vol. 54, no. 391, pp. 2285-2292.
- Nielson, K.B., Winge, D.R.** (1984) "Preferential binding of copper to the beta domain of metallothionein" *Journal of Biological Chemistry*, vol. 259, no. 8, pp. 4941-4946.
- Nordberg, M., Nordberg, G.F.** (1987) "On the role of metallothionein in cadmium induced renal toxicity" *Experientia Supplementum*, vol. 52, pp. 669-675.
- Otvos, J.D., Armitage, I.M.** (1980) "Structure of the metal clusters in rabbit liver metallothionein" *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 77, no. 12, pp. 7094-7098.
- Palacios, O.** (2003) Noves aportacions a l'estudi de la capacitat coordinant de les metal·lotioneïnes: el catió Ag(I) com a substitut de Cu(I) en les Cu(I)-MT i l'espectrometria de masses (ESI-MS) com a

tècnica essencial i complementària a l'espectroscòpia òptica., Tesi doctoral, Universitat Autònoma de Barcelona.

- Palmiter, R.D.** (1998) "The elusive function of metallothioneins" *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 95, no. 15, pp. 8428-8430.
- Penkowa, M., Molinero, A., Carrasco, J. i Hidalgo, J.** (2001) "Interleukin-6 deficiency reduces the brain inflammatory response and increases oxidative stress and neurodegeneration after kainic acid-induced seizures" *Neuroscience*, vol. 102, no. 4, pp. 805-818.
- Pennell, R.I., Lamb, C.** (1997) "Programmed Cell Death in Plants" *The Plant Cell*, vol. 9, no. 7, pp. 1157-1168.
- Peterson, C.W., Narula, S.S. i Armitage, I.M.** (1996) "3D solution structure of copper and silver-substituted yeast metallothioneins" *FEBS letters*, vol. 379, no. 1, pp. 85-93.
- Pitt, B.R., Schwarz, M., Woo, E.S., Yee, E., Wasserloos, K., Tran, S., Weng, W., Mannix, R.J., Watkins, S.A., Tyurina, Y.Y., Tyurin, V.A., Kagan, V.E. i Lazo, J.S.** (1997) "Overexpression of metallothionein decreases sensitivity of pulmonary endothelial cells to oxidant injury" *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology*, vol. 273, pp. L856-L865.
- Pla, M., Huguet, G., Verdaguer, D., Puigderrajols, P., Llompарт, B., Nadal, A. & Molinas, M.** (1998) "Stress proteins co-expressed in suberized and lignified cells and in apical meristems" *Plant Science*, vol. 139, pp. 49-57.
- Prasad, M.N.V.** (1999) "Metallothioneins and Metal Binding Complexes in Plants" in *Heavy metal stress in plants: from molecules to ecosystems* Prasad, M.N.V; Hagemeyer, J., Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- Quaife, C.J., Findley, S.D., Erickson, J.C., Froelick, G.J., Kelly, E.J., Zambrowicz, B.P. i Palmiter, R.D.** (1994) "Induction of a new metallothionein isoform (MT-IV) occurs during differentiation of stratified squamous epithelia" *Biochemistry (John Wiley i Sons)*, vol. 33, no. 23, pp. 7250-7259.
- Quirino, B.F., Noh, Y.S., Himelblau, E. i Amasino, R.M.** (2000) "Molecular aspects of leaf senescence" *Trends in Plant Science*, vol. 5, no. 7, pp. 278-282.
- Rae, T.D., Schmidt, P.J., Pufahl, R.A., Culotta, V.C. i O'Halloran, T.V.** (1999) "Undetectable intracellular free copper: the requirement of a copper chaperone for superoxide dismutase" *Science*, vol. 284, no. 5415, pp. 805-808.
- Rausser, W.E.** (2000) "The role of thiols in plants under metals stress" in *Sulfur nutrition and sulfur assimilation in higher plants* Brunold, C., Paul Haupt, Bern, Switzerland.
- Razem, F.A., Bernards, M.A.** (2003) "Reactive oxygen species production in association with suberization: evidence for an NADPH-dependent oxidase" *Journal of Experimental Botany*, vol. 54, no. 384, pp. 935-941.
- Rea, P.A., Vatamaniuk, O.K. i Rigden, D.J.** (2004), "Weeds, Worms, and More. Papain's Long-Lost Cousin, Phytochelatin Synthase", *Plant physiology*, vol. 136, no. 1, pp. 2463-2474.
- Riek, R., Precheur, B., Wang, Y., Mackay, E.A., Wider, G., Guntert, P., Liu, A., Kagi, J.H. i Wuthrich, K.** (1999) "NMR structure of the sea urchin (*Strongylocentrotus purpuratus*) metallothionein MTA" *Journal of Molecular Biology*, vol. 291, no. 2, pp. 417-428.

- Robbins, A.H., McRee, D.E., Williamson, M., Collett, S.A., Xuong, N.H., Furey, W.F., Wang, B.C. i Stout, C.D.** (1991) "Refined crystal structure of Cd, Zn metallothionein at 2.0 Å resolution" *Journal of Molecular Biology*, vol. 221, no. 4, pp. 1269-1293.
- Robinson, N.J., Wilson, J.R. i Turner, J.S.** (1996) "Expression of the type 2 metallothionein-like gene MT2 from *Arabidopsis thaliana* in Zn(2+)-metallothionein-deficient *Synechococcus* PCC 7942: putative role for MT2 in Zn²⁺ metabolism" *Plant Molecular Biology*, vol. 30, no. 6, pp. 1169-1179.
- Roosens, N.H., Bernard, C., Lepiae, R. i Verbruggen, N.** (2004) "Evidence for copper homeostasis function of metallothionein (MT3) in the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*" *FEBS letters*, vol. 577, no. 1-2, pp. 9-16.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T.** (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd edn, Cold Spring Harbor Lab. Press, Plainview, NY.
- Schenck, R.U. & Hildebrandt, A.C.** (1972) "Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures." *Canadian Journal of Botany*, vol. 50, pp. 199-204.
- Sevier, C.S., Kaiser, C.A.** (2002) "Formation and transfer of disulphide bonds in living cells" *Nature reviews. Molecular cell biology*, vol. 3, no. 11, pp. 836-847.
- Suhy, D.A., Simon, K.D., Linzer, D.I. i O'Halloran, T.V.** (1999) "Metallothionein is part of a zinc-scavenging mechanism for cell survival under conditions of extreme zinc deprivation" *Journal of Biological Chemistry*, vol. 274, no. 14, pp. 9183-9192.
- Takahashi, Y., Ogra, Y. i Suzuki, K.T.** (2005) "Nuclear trafficking of metallothionein requires oxidation of a cytosolic partner" *Journal of Cellular Physiology*, vol. 202, no. 2, pp. 563-569.
- Tamai, K.T., Gralla, E.B., Ellerby, L.M., Valentine, J.S. i Thiele, D.J.** (1993) "Yeast and mammalian metallothioneins functionally substitute for yeast copper-zinc superoxide dismutase" *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 90, no. 17, pp. 8013-8017.
- Tapiero, H., Townsend, D.M. i Tew, K.D.** (2003), "Trace elements in human physiology and pathology. Copper" *Biomedicine i pharmacotherapy*, vol. 57, no. 9, pp. 386-398.
- Thornalley, P.J., Vasak, M.** (1985) "Possible role for metallothionein in protection against radiation-induced oxidative stress. Kinetics and mechanism of its reaction with superoxide and hydroxyl radicals" *Biochimica et biophysica acta*, vol. 827, no. 1, pp. 36-44.
- Tong, Y.P., Kneer, R. i Zhu, Y.G.** (2004) "Vacuolar compartmentalization: a second-generation approach to engineering plants for phytoremediation" *Trends in Plant Science*, vol. 9, no. 1, pp. 7-9.
- Tsuji, N., Nishikori, S., Iwabe, O., Shiraki, K., Miyasaka, H., Takagi, M., Hirata, K. i Miyamoto, K.** (2004) "Characterization of phytochelatin synthase-like protein encoded by alr0975 from a prokaryote, *Nostoc* sp. PCC 7120" *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 315, no. 3, pp. 751-755.
- Tucker, S.L., Thornton, C.R., Tasker, K., Jacob, C., Giles, G., Egan, M. i Talbot, N.J.** (2004) "A Fungal Metallothionein Is Required for Pathogenicity of *Magnaporthe grisea*" *The Plant Cell*, vol. 16, no. 6, pp. 1575-1588.
- Uchida, Y., Takio, K., Titani, K., Ihara, Y. i Tomonaga, M.** (1991) "The growth inhibitory factor that is deficient in the Alzheimer's disease brain is a 68 amino acid metallothionein-like protein" *Neuron*, vol. 7, no. 2, pp. 337-347.

- Valls, M., Bofill, R., Gonzalez-Duarte, R., Gonzalez-Duarte, P., Capdevila, M. i Atrian, S.** (2001) "A new insight into metallothionein (MT) classification and evolution. The *in vivo* and *in vitro* metal binding features of *Homarus americanus* recombinant MT" *Journal of Biological Chemistry*, vol. 276, no. 35, pp. 32835-32843.
- van Hoof, N.A., Hassinen, V.H., Hakvoort, H.W., Ballintijn, K.F., Schat, H., Verkleij, J.A., Ernst, W.H., Karenlampi, S.O. i Tervahauta, A.I.** (2001) "Enhanced copper tolerance in *Silene vulgaris* (Moench) Garcke populations from copper mines is associated with increased transcript levels of a 2b-type metallothionein gene" *Plant Physiology*, vol. 126, no. 4, pp. 1519-1526.
- Vasak, M., Hasler, D.W.** (2000) "Metallothioneins: new functional and structural insights" *Current Opinion in Chemical Biology*, vol. 4, no. 2, pp. 177-183.
- Vatamaniuk, O.K., Bucher, E.A., Ward, J.T. i Rea, P.A.** (2001) "A new pathway for heavy metal detoxification in animals. Phytochelatin synthase is required for cadmium tolerance in *Caenorhabditis elegans*" *Journal of Biological Chemistry*, vol. 276, no. 24, pp. 20817-20820.
- Vranova, E., Inze, D. i Van Breusegem, F.** (2002) "Signal transduction during oxidative stress", *Journal of Experimental Botany* vol. 53, no. 372, pp. 1227-1236.
- Waisberg, M., Joseph, P., Hale, B. i Beyersmann, D.** (2003) "Molecular and cellular mechanisms of cadmium carcinogenesis" *Toxicology*, vol. 192, no. 2-3, pp. 95-117.
- Whetten, R., Sederoff, R.** (1995), "Lignin Biosynthesis", *The Plant cell*, vol. 7, no. 7, pp. 1001-1013.
- Winge, D.R., Nielson, K.B.** (1984) "Formation of the metal-thiolate clusters of rat liver metallothionein" *Environmental Health Perspectives*, vol. 54, pp. 129-133.
- Wojtaszek, P.** (1997) "Oxidative burst: an early plant response to pathogen infection" *The Biochemical Journal*, vol. 322, no. Pt 3, pp. 681-692.
- Wong, H.L., Sakamoto, T., Kawasaki, T., Umemura, K. i Shimamoto, K.** (2004) "Down-regulation of metallothionein, a reactive oxygen scavenger, by the small GTPase OsRac1 in rice" *Plant Physiology*, vol. 135, no. 3, pp. 1447-1456.
- Woo, E.S., Lazo, J.S.** (1997) "Nucleocytoplasmic functionality of metallothionein" *Cancer Research*, vol. 57, no. 19, pp. 4236-4241.
- Zangger, K., Shen, G., Oz, G., Otvos, J.D. i Armitage, I.M.** (2001) "Oxidative dimerization in metallothionein is a result of intermolecular disulphide bonds between cysteines in the alpha-domain" *The Biochemical Journal*, vol. 359, no. Pt 2, pp. 353-360.
- Zhou, J. i Goldsbrough, P.B.** (1994), "Functional homologs of fungal metallothionein genes from *Arabidopsis*", *The Plant cell*, vol. 6, no. 6, pp. 875-884.
- Zhu, C., Lu, T., Zhang, R., Zhao, N. i Liu, J.** (2000) "Modeling of kiwifruit metallothionein kiwi503" *Chinese Science Bulletin*, vol. 45, no. 15, pp. 1413-1417.

VIII. ANNEX

VIII. ANNEX

En aquest annex es presenten dos treballs relatius al desenvolupament i manteniment d'un sistema d'embriogènesi somàtica en alzina surera, amb un enfoc especialment destinat a l'ús per a estudis en biologia molecular. Aquest sistema permet solventar algunes de les dificultats que representa treballar amb espècies forestals, i la seva caracterització serveix de base per a posteriors treballs del grup.

L'embriogènesi somàtica en alzina surera, aplicació per a estudis de biologia molecular

Al 1986 el grup de Toribio i Celestino, interessats en la micropropagació d'aquesta espècie d'interès forestal i industrial, aconseguixen estimular la formació d'embrions somàtics de surera a partir de fragments cotiledonars d'embrió zigòtic. L'embriogènesi somàtica es dona en alguns casos de forma natural, es coneix com apomixi i consisteix en la generació i desenvolupament d'embrions a partir de teixit somàtic en un procés similar a l'embriogènesi zigòtica. Més tard aquest grup aconseguix la formació d'embriogènesi a partir d'altres embrions sense l'addició de reguladors de creixement en el medi, i estableix una línia d'embriogènesi secundària o repetitiva (Fernández-Guijarro *et al.*, 1995, *Plant Cell Tissue Organ Culture* 41:99-106). Com a sistema de micropropagació, l'embriogènesi secundària teòricament permet aconseguir un elevat nombre de plantes que es pot mantenir per subcultiu a baix cost, però malauradament és molt freqüent un fort coll d'ampolla en el pas d'embrió a planta.

Per altra banda la recerca a nivell molecular amb espècies forestals com l'alzina surera es troba amb greus dificultats al tractar plantes sovint de mida molt gran, de creixement lent i amb gran part de teixits llenyosos, fent pràcticament impossible controlar les condicions de cultiu, i en general alentint els estudis. Mentrestant, les tècniques de biologia molecular requereixen cada cop més de grans quantitats de material genèticament idèntic, ràpid d'aconseguir i fàcil de manipular. En aquest sentit ha estat molt extesa la utilització d'organismes model com la planta *Arabidopsis*, que a més de totes les avantatges que suposa per la petita mida i curta durada del seu cicle vital té un genoma relativament petit en comparació a la majoria d'espècies forestals.

Amb l'objectiu d'aprofundir en el coneixement de l'alzina surera i dinamitzar-ne l'estudi a nivell molecular, el nostre grup de recerca ha col·laborat en la caracterització del sistema d'embriogènesi secundària iniciat pel grup de Toribio i Celestino, amb un enfoc especialment destinat a la seva aplicació per a estudis moleculars. En aquest sentit s'han caracteritzat aspectes a nivell histològic i cel·lular en un estudi que ha donat lloc a la publicació d'una tesi doctoral (Puigderrajols, 2000. *Embriogènesi somàtica secundària en surera (Quercus suber L.): Caracterització i aplicació a l'estudi de proteïnes d'estrès*, Universitat de Girona) i a diversos articles, dos dels quals es presenten en aquest annex.

Article 4

“Ultrastructure of early secondary embryogenesis by multicellular and unicellular pathways in cork oak (Quercus suber L.)”

S'estudien els esdeveniments cel·lulars primerencs de l'embriogènesi secundària en un sistema d'embriogènesi recurrent en alzina surera. En aquest sistema els embrions tenen origen multicel·lular per gemmació a partir d'una massa proliferativa compacta o unicel·lular partir de cal·lus friables. Per una banda, l'origen de la massa proliferativa compacta es dona a nivell de les cèl·lules de l'epidermis en l'hipocòtil, i es caracteritza per una disminució de la relació nucli/citoplasma i un marcat increment dels productes de reserva. En la perifèria de la massa proliferativa compacta es forma el primordi meristemàtic, acompanyat de diferenciació cel·lular i d'una dràstica reducció dels productes de reserva. Els primordis meristemàtics evolucionen a embrions globulars per l'organització de la protodermis i de dos centres interns. Per altra banda, l'anàlisi dels cal·lus friables mitjançant microscopia mostren una seqüència hipotètica que consisteix amb el pas de cèl·lules aïllades a grups de poques cèl·lules, a agrupacions majors de cèl·lules meristemàtiques i a embrions globulars. Les cèl·lules aïllades mostren característiques típiques de les cèl·lules embriogèniques, com són citoplasma abundant i un gran nombre de cossos lipídics i de grans de midó. Quan es comparen amb els agregats meristemàtics s'observa una desdiferenciació cel·lular progressiva i una reducció dràstica dels productes de reserva. La formació de l'embrió globular s'inicia per la bipolarització progressiva d'agregats meristemàtics grans. En general, la comparació a nivell ultraestructural de les dues vies embriogèniques mostra que els canvis subcel·lulars segueixen un patró seqüencial similar, especialment pel que fa als productes de reserva. Es discuteix el possible paper de les extrusions de plastidis i dels cossos multivessiculars en el patró canviant del metabolisme del midó durant l'embriogènesi.

Article 5

“Developmentally and stress-induced small heat shock proteins in cork oak somatic embryos”

S'ha estudiat el patró d'acumulació de proteïnes de xoc de calor de baix pes molecular (sHSPs) durant el desenvolupament d'embrions somàtics d'alzina surera en condicions normals i en resposta a estrès. Anàlisis per Western blot utilitzant anticossos policlonals contra la HSP17 de surera recombinant mostren una acumulació transitòria de la proteïna durant la maduració i germinació dels embrions somàtics. La quantitat de proteïna incrementa en tots els estadis de desenvolupament dels embrions en resposta a l'estrès. Durant el desenvolupament normal les sHSPs s'acumulen en les regions en diferenciació inicial, però no en les zones en divisió més activa, dels meristemes caulinar i radicular. En canvi, en resposta a l'estrès per calor, són aquestes zones en divisió més activa les que presenten major acumulació. Aquests resultats recolzen la hipòtesi que l'expressió de les sHSPs de classe I tenen un control de l'expressió diferencial per el desenvolupament i per l'estrès. Es discuteix el possible paper de les sHSPs en relació a la seva localització tissular específica.

Agraïments

Tant de bó en cada bocí de vida es pogués fer constar, per escrit, un apartat d'agraïments, i allargar-lo fins a sentir que has fet net.

Agrair a la Dra. Marissa Molinas l'acolliment en el Laboratori del Suro, la direcció i l'entusiasme, la visió de la ciència, l'elegància del coneixement i la importància de la responsabilitat.

A la Dra. Gemma Huguet els consells, la confiança, els ànims, i ja ho saps, la resposta en els moments difícils.

A la Dra. Sílvia Atrián per la importantíssima col·laboració que hem tingut. Per acceptar el repte i assumir el mestratge, per obrir-me les portes a una ciència que d'una altra manera és de difícil accés. I a en Jordi Domènech, moltes gràcies per portar-me de la mà.

Thanks to Dr. Peter Goldsbrough, to accept so kindly my stay in your lab, to teach me more about that science and society. Thanks to Woei-Jiun Guo for your help in the lab and for those lovely evenings. Thanks Srinivas, for everything.

A dos referents importantíssims que s'amaguen entre aquestes pàgines, els dels primers anys i els que més colpegen, gràcies Pere, gràcies Anna. I a una persona extremadament entregada, apasionada de la ciència, carinyosa i principal tamponant de les meves pujades i baixades... moltíssimes gràcies Mercè!

A la Dolors, la Gemma, l'Olga i en Marçal, per totes les estones i per aquelles reunions amb polvorons on fem l'important pas d'RNA a planta.

Noies, girls, coffee girls, Anna, Lluís, Goretti, Noemí, Marta, Noe, Marga, Sílvia, Glòria, Maria, Xevi... faria vostre el capítol més ferm de l'apartat de resultats! Gràcies per les estones, els sopars, les sortides i els cafès que no sempre he fet... sou una joia. I Vicenç, Cape, Uli, Judit, Elena, Pep, la gent del passadís... moltes gràcies a tots.

I a casa queda tot el que no ha cabut en aquesta tesi... un agraïment molt dolç a la família, en especial a la mare.

I a en Carles, sens dubte la millor troballa d'aquests cinc anys de ciència, gràcies per tot.