

Aprofundiment en la relació estructura/funció de diverses metal·lotioneïnes (MTs) per analitzar els factors que determinen la seva especificitat metàl·lica

SÍLVIA PÉREZ RAFAEL

TESI DOCTORAL

PROGRAMA DE DOCTORAT EN QUÍMICA

Dirigida per:

ÒSCAR PALACIOS BONILLA

MERCÈ CAPDEVILA VIDAL

DEPARTAMENT DE QUÍMICA

FACULTAT DE CIÈNCIES

2013

Memòria presentada per aspirar al Grau de Doctor per Sílvia Pérez Rafael.

Amb el vist i plau dels directors de la Tesi Doctoral, Òscar Palacios Bonilla, Professor Agregat de la Universitat Autònoma de Barcelona i Mercè Capdevila Vidal, Professora Titular de la Universitat Autònoma de Barcelona.

Dr. Òscar Palacios Bonilla

Dra. Mercè Capdevila Vidal

Bellaterra, 30 de setembre del 2013.

AGRAÏMENTS

El treball descrit en aquesta memòria es va dur a terme gràcies a les següents fonts de finançament:

*Projectes finançats pel *Ministerio de Ciencia e Innovación*:

1. "*Estructura, función e interacción de proteínas y redes de respuesta a metales: Metalotioneínas y Metalómica*"; DGI (BIO2006-14420-C02-02); Investigador principal: Mercè Capdevila Vidal.

2. "*Metalómica básica (proteínas, vías y redes de interacción metales-sistemas biológicos) y aplicada*"; DGI (BIO2009-12513-C02-02); Investigador principal: Mercè Capdevila Vidal.

*Concessió d'una beca PIF (4 anys de duració) de la Universitat Autònoma de Barcelona per a realitzar el doctorat en el grup de recerca de *Metal·lotioneïnes: relació estructura/funció i aplicacions*.

*Concessió de dues beques de la Universitat Autònoma de Barcelona per a realitzar dues estades predoctorals fora de Catalunya:

1. Estada de 5 setmanes a l'*Institut de Biologia Molecular* (Universitat Miguel Hernández, Elx), sota la direcció del Dr. Francisco Javier Gómez.

2. Estada de 3 mesos al *Laboratoire de Chimie Analytique Bio-inorganique et Environnement* (LCABIE) (Centre national de la recherche scientifique (CNRS), situat a Pau (França)), sota la direcció de la Dra. Joanna Szpunar.

Primer de tot voldria donar les gràcies als meus directors de Tesi, Mercè Capdevila i Òscar Palacios, que em van donar l'oportunitat de poder invertir aquests anys de la meua vida a una gran passió com és la investigació i alhora, poder seguir amb la meua formació.

L'Òscar ha sigut qui ha patit en primeria instància els meus dubtes i preocupacions, i qui sempre ha estat disponible per ajudar-me en tot lo possible, per això voldria agrair-li especialment la seva paciència i consideració. Hem passat de tots colors, ens hem enfadat i rigut. Hem porto un gran record de la nostre feina.

Tot i que Mercè i jo no hem tingut una relació tant de "trinxera" ha estat per mi un plaer tenir-la com a directora d'aquest treball.

També voldria agrair al grup de recerca en Genètica, dirigit per la Dra. Sílvia Atrian, col·laborador constant del nostre grup d'investigació, la producció de les proteïnes sense les quals no hagués estat possible aquest treball. A la Sílvia agrair-li la seva disponibilitat sempre per contestar qualsevol dubte i interrogant, la seva opinió aporta sempre un gran valor afegit.

Gràcies a les estades predoctorals, el treball realitzat a la Tesi s'ha enriquit substancialment. La primera d'elles a Elx, sota la supervisió del Dr. Francisco Javier Gómez, que em va proporcionar nous coneixement sobre ITC, i la segona a Pau al laboratori dirigit per la Dra. Joanna Szpunar, que va permetre'm fer un estudi ampli amb instrumentació HPLC.

Gràcies al cos tècnic del SAQ. Sempre han estat en molt bona disposició a ajudar-me en qualsevol cosa, tot i que jo puc ser molt pesada. En especial gràcies a Alba, M^a Jesús i Ignasi que m'han esperat quan sortia de la feina i han fet grans favors a canvi d'un simple gràcies.

Com no, als meus companys de laboratori i de planta. Cristina, Montse, Ester i Rubén en la primera etapa del doctorat, que em van fer un lloc al laboratori i em van fer sentir com a casa. Rubén, lo siento porque hablo demasiado! I els meus companys actuals; Cata, Katia, Mireia, Selene, Joan, Maribel i Jordi. Cata, te deseo toda la felicidad del mundo allí dónde vayas espero que te vaya muy bien en tu nueva etapa, sé que serás muy feliz. Gracias por tu amistad todo este tiempo, tus abrazos y tus ánimos. Hemos sufrido juntas este tramo final, que ya se acaba por fin! Katia, gràcies per la teua ajuda incondicional sempre, de debò, no sé que hagués fet sense tu, ets una gran amiga. Tu i Cata heu estat al meu costat escoltant-me pesada amb problemes i animant-me sempre que ha estat possible, moltes gràcies! Sou les millors companyes del lab del món! Mireia el teu bon humor s'encomana, encara que no passem gaire temps juntes sempre és un plaer! Joanet, quins riures que hem tingut tots plegats, moltes vegades gràcies a tu, al teu bon humor sempre. Sort!. Jordi, he disfrutat molt tenint-ne de company i tot i que ara no compartim espai físic sempre serem "labmates". Maribel, nos conocimos hace muchos años atrás y la vida nos ha vuelto a cruzar en el camino. Muchas gracias por tu amistad y te deseo todo lo mejor en esta nueva etapa. Selene, aunque llevamos poco trabajando juntas te siento como una compañera más. Als companys de planta, moltes gràcies pels ànims que hem doneu i per les bromes de passadís. Ha estat un plaer compartir amb vosaltres tots aquests anys. No us enumero que segur que em deixo algú i quedaria molt malament! Ja sabeu com sóc de "bocazas".

També, als companys de la planta d'Analítica, tant la gent del Grup de Sensors com del GTS. Susana, Tamara, Sole, Jose, Anna, Xavi, Elena, Montse, Marta, Olga, Pili, Júlia, Julio, Oriol, i l'Anna Mari que és una infiltrada d'orgànica!!...segur que em deixo a molta gent... Elena, gracias por ser una amiga que siempre está ahí, des de que nos conocimos empezando la carrera juntas, y también, como no, por tus esfuerzos por ayudarme en todo lo relacionado con la tesis, consejos, correcciones... sé que es un trabajo duro por lo que te lo agradezco enormemente. Perdón por no tener tiempo, te lo compensaré. Montse, aunque al principio no te conocía mucho, te has convertido en una persona muy importante para mí, es genial poder hablar contigo y tenerte en mi vida, gracias también por tus consejos y ayuda. Anna Mari, sens dubte la més jove entre nosaltres, una mica boja i despistada com jo, per lo qual ens entenem perfectament, el teu bon humor i actitud positiva sempre ajuda, no canviïs!!

Si hi ha alguna cosa que m'ha ajudat a desestressar-me ha estat clarament poder jugar a futbol, tant la lliga del SAF com la lliga de Valldorsala, amb la qual he conegut millor alguns companys de feina i he fet nous amics. A tots gràcies pels bons moments, NOSOSTRAS AHÍ! David, fuiste un gran entrenador, pero ya sabes que me ponían nerviosa tus gritos! Albert, gràcies pels teus consells i per permetre'm beure una miqueta de birra postpartit!

Dar gracias a Xavi Bagán y a Patricia Cardoso, por ser grandes amigos, espero poder veros con más tranquilidad después de tanto tiempo. Xavi, te echo de menos aunque siempre quieras hacerme rabiar! Patri pronto retomaré mis clases de punto!, espero poder hacerme una bufanda decente.

A quién para mí fueron y son hoy en día unas de mis mejores amigas, y un gran apoyo en mi estancia en Pau, os convertistéis en mi familia allí. Jen, Sil, Mon, Cris y Vir quiero veros pronto! Gracias por todo ese tiempo que pasé con vosotras, tan ameno y divertido, que me hizo sentir feliz a vuestro lado, y gracias también por esas comidas españolas contundentes *versus* los menús franceses tan apetecibles... Aunque estemos lejos, os tengo muy presentes en mi vida!

También quiero agradecer a mis amigas, las originales, las de siempre, con las que compartíamos buenos momentos en plena era adoslescente, y seguimos haciendo ahora. Laura, Mireia y Miriam, siempre hemos estado juntas y eso no cambiará nunca. Aunque muchas veces hemos tomado caminos diferentes siempre hemos sabido encontrarnos. Gracias por apoyarme y estar ahí!

Ese INVEST!!! Rocío, María, Anna, Judith, Marta y Gemma. Gracias por esas risas y esos días llenos de simpatía, cariño y apoyo. Estoy muy contenta de formar parte de vuestro equipo, he tenido mucha suerte con las maravillosas compañeras que me han tocado!

Y por último, pero no por ello menos importantes, más bien todo lo contrario, a mi querida familia, mis padres, mis hermanas, mi cuñado Raúl, y como no, Marc. A mis padres les agradezco los valores y educación que me han proporcionado, su cariño y su amor, siempre incondicional. No podría tener unos padres mejores, siempre me habéis apoyado y ayudado, siempre habéis estado cuando os he necesitado, y siempre habéis trabajado sin parar para que no nos faltara de nada, poniendo por delante a vuestras hijas. Habéis hecho de mí la persona que soy hoy en día, y

espero poder parecerme lo máximo a vosotros en un futuro. A mis hermanitas, que también me han ayudado en todo, y que me soportan día a día, aunque es mútuo. Sandrita y Sonieta, siempre gracias por aguantarme tanto y querermme más! Muchos desearían tener unas hermanas como las que tengo, y con las que siempre he compartido todo y puedo contar con lo que sea, explicarles mis problemas y tener siempre su apoyo, os quiero mucho! Raúl, también te agradezco tu ayuda y apoyo, y que me aguantes cuando me pongo pesada con mis cosas, ya tu sabes!.

Marc que decirte. Ya lo sabes lo importante que eres en mi vida, y ya no decir para mi tesis. Creo que después de mi, tu y la Sandra soys los que más habéis currado en este proyecto. Siempre te he tenido en los momentos buenos pero sobretodo he notado tu presencia en los momentos malos. Sé que sin ti no hubiera aguantado y por eso te quiero dar las gracias. Espero tener una vida larga para poder compensarte y regalarte almenos una parte de la felicidad que mereces.

Cuando se empieza una tesis uno piensa que sólo es un proyecto más, un trabajo con una exposición final. Cuando uno se embarca en esto arrastra a mucha gente, y les hace pasar por momentos duros cuando te ven sufrir y estresarte. Quiero pedir perdón a todos aquellos que me queréis y habéis penado conmigo en mis momentos difíciles. Gracias, lo recordaré siempre!.

Resum

La tasca investigadora realitzada, i recollida en la present Tesi Doctoral, és el resultat de l'estudi i caracterització de l'especificitat metàl·lica, vers Zn(II), Cu(I) i Cd(II), de diferents metal·lotioneïnes i de l'anàlisi dels factors que poden determinar aquesta especificitat.

El conjunt de proteïnes estudiades el componen principalment isoformes d'MTs de mol·luscs: els cargols terrestres *H.pomatia* i *C.aspersum* i el barretet marí *M.crenulata*. L'estudi de les propietats coordinants d'aquestes proteïnes ha fet possible establir l'existència, en els dos cargols, d'una isoforma d'MT amb una clara preferència per Cd(II) i d'altres per Cu(I), podent relacionar aquest comportament amb el rol fisiològic d'aquestes proteïnes (destoxicació de cadmi i homeòstasi de coure, respectivament). En canvi, *M.crenulata* té una única MT, McMT, que no presenta una clara especificitat per Zn(II), Cd(II) o Cu(I), podent participar en ambdós tipus de processos fisiològics. L'estudi conjunt de les diferents MTs ha permès concloure que proteïnes similars (contingut en cisteïnes i la seva posició relativa dins la cadena peptídica) poden presentar especificitats metàl·liques molt diferents, sent els aminoàcids no coordinants els responsables d'aquesta diversitat.

S'han estudiat també altres MTs: de *B.floridae* (amfiox) i de *D.melanogaster* (mosca). L'amfiox, considerat un organisme model en l'estudi del llinatge evolutiu dels vertebrats, ha estat àmpliament estudiat a nivell genòmic i proteic, però fins el moment es desconeixia l'existència d'MTs. La descripció del seu genoma complert va permetre identificar dues isoformes d'MT (BfMT1 i BfMT2), que posteriorment varem produir recombinantment. L'estudi de les característiques coordinants d'aquestes dues proteïnes ha permès establir que BfMT1 presenta una certa especificitat per enllaçar Cu(I) mentre que BfMT2 mostra una major especificitat metàl·lica per Zn(II) i Cd(II), fets que concorden amb el comportament observat a nivell genòmic dels seus respectius gens.

D'altra banda, en *Drosophila* havíem descrit i estudiat 4 isoformes d'MT, totes elles amb una clara preferència per Cu(I). En aquest treball s'ha estudiat una cinquena MT, MtnE, descoberta recentment. Els resultats obtinguts indiquen que MtnE és la isoforma amb menor especificitat per Cu(I) del conjunt d'MTs de *D.melanogaster*, amb un lloc de coordinació particular per Zn(II).

Adicionalment, s'ha utilitzat l'acoblament d'un sistema cromatogràfic (*size exclusion-HPLC*) amb diferents tipus de detecció (UV-Vis, ESI-MS i ICP-MS) per estudiar l'evolució amb el temps d'algunes preparacions d'MTs, aquelles riques en lligands sulfur. Els resultats han permès observar el creixement i compactació dels agregats Cd_xS_y -MT de les preparacions inicials obtingudes *in vivo*.

Finalment s'han determinat els paràmetres termodinàmics associats a la reacció de bescanvi de Zn(II) per Cd(II) en diverses MTs mitjançant la tècnica d'ITC (Isothermal Titration Calorimetry). Aquest estudi ha permès establir en les MTs estudiades una relació entre els valors calculats de les constants d'afinitat i l'especificitat metàl·lica vers ions metàl·lics divalents i monovalents.

Summary

The research work embodied in this PhD Thesis is the result of the study and characterization of the metal specificity, towards Zn (II), Cu (I) and Cd (II), of different metallothioneins and of the analysis of the factors that could determine this specificity.

The set of studied proteins is mainly composed by mollusc MT isoforms: the terrestrial snails *H.pomatia* and *C.aspersum* and the keyhole limpet *M.crenulata*. The study of the coordination properties of these proteins allowed to establish the existence, in both snails, of an MT isoform with a clear preference for Cd(II) and others to Cu(I), which correlates with their physiological role (cadmium detoxification and copper homeostasis, respectively). In contrast, *M.crenulata* has only one MT, McMT, which does not show any clear specificity for Zn(II), Cd(II) nor Cu(I), being able to participate in both type of physiological processes. The comparison of the behaviour of these different MTs allowed to conclude that similar proteins (in terms of cysteine content and their relative position in the peptide chain) can exhibit very different metal specificities, being the non-coordinating aminoacids responsible for this diversity.

Others MTs have also been studied: from *B.floridae* (amphioxus) and *D.melanogaster* (fly). Amphioxus, which is considered a model organism for the study of the vertebrates's evolutive lineage, has been extensively studied at genomic and protein level, but until now the existence of MTs was not described. The report of its complete genome allowed to identify two MT isoforms (BfMT1 and BfMT2), which were recombinantly produced in our labs. The study of their coordinating abilities allowed to observe that BfMT1 shows some specificity to bind Cu(I) while BfMT2 shows greater specificity towards Zn(II) and Cd(II). This is consistent with the behavior at genomic level their respective genes.

Already described and studied four MT isoforms in *Drosophila*, all of them exhibiting a clear preference for Cu(I). In this work we have studied a fifth MT, MtnE, recently discovered. The results obtained indicate that MtnE is the isoform with the lowest specificity for Cu(I) among the set of *D.melanogaster* MTs, embracing a particular coordination for Zn(II).

Additionally, the coupling of a chromatographic system (size-exclusion HPLC) with different detection techniques (UV-Vis, ESI-MS and ICP-MS) was carried out in order to study the time evolution of some MTs preparations, those rich in sulfide ligands. The results allowed to observe the growth and compactation of the CdxSy-MT aggregates formed *in vivo*.

Finally, the thermodynamic parameters related with the Zn(II) for Cd(II) replacement process in various MTs have been determined by means of ITC (Isothermal Titration Calorimetry). This has allowed to establish a relationship between the calculated values of the affinity constants of the studied MTs and their metal specificity towards monovalent and divalent metal ions.

ABREUJAMENTS

aa:	Aminoàcid
ADN	Àcid desoxiribbonucleic
BfMT1:	Isoforma d'MT 1 de l'amfiox <i>Brianchoyoma floridare</i>
BfMT2:	Isoforma d'MT 2 de l'amfiox <i>Brianchoyoma floridare</i>
CaCdCuMT:	Isoforma d'MT d'especificitat mixta del cargol terrestre <i>Cornu aspersum</i>
CaCdMT:	Isoforma d'MT específica de cadmi del cargol terrestre <i>Cornu aspersum</i>
CaCuMT:	Isoforma d'MT específica de coure del cargol terrestre <i>Cornu aspersum</i>
Cys:	Cisteïna
DC:	Dicroïsme circular
DRX	Difracció de raigs X
eq:	Equivalent molar
ESI-MS:	Espectroscòpia de masses amb ionització per electrosprai
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
His:	Histidina
HpCdMT:	Isoforma d'MT específica de cadmi del cargol terrestre <i>Helix pomatia</i>
HpCuMT:	Isoforma d'MT específica de coure del cargol terrestre <i>Helix pomatia</i>
HpCuMTmut:	Mutant de la isoforma HpCuMT
HPLC:	High Performance Liquid Chromatography (Cromatografia líquida d'alta resolució)
M	Metall
MS	Mass spectrometry (Espectrometria de masses)
ICP-AES:	Espectroscòpia d'emissió atòmica de plasma acoblat per inducció
ICP_{conv}	Mesures d'ICP-AES de les mostres sense tractament àcid
ICP_{àcid}	Mesures d'ICP-AES de les mostres amb tractament àcid
ITC:	Isothermal Titration Calorimetry (Calorimetria isoterma de titulació)
MCD:	Magnetic Circular Dichroism (Dicroïsme circular magnètic)
McMT:	MT del barretet marí <i>Megathura crenulata</i>
MT / MTs:	Metal·lotioneïna / metal·lotioneïnes
MtnE:	Cinquena isoforma d'MT de <i>Drosophila melanogaster</i>
ORF:	Open Reading Frames (Marc obert de lectura)
PCs:	Fitoquelatines

RMN:	Ressonància Magnètica Nuclear
SE-HPLC	Cromatografia líquida d'exclusió molecular
S_{cys}:	Sofre cisteínic
TCLM	Transferència de càrrega de lligand a metall
Tris:	Tris(hidroximetil)aminometà
TOF	Analitzador de temps de vol
UV-Vis:	Ultraviolela-visible
	Indica la presentació de resultats <i>in vivo</i>
	Indica la comparació de resultats <i>in vivo</i> i <i>in vitro</i>

Índex

1. Introducció	3
1.1. Metal·lotioneïnes	3
1.1.1. Propietats i característiques	3
1.1.2. Reactivitat i funcions	4
1.1.3. Mètodes d'obtenció	8
1.1.4. Característiques estructurals	10
1.1.4.1. Anions clorur	15
1.1.4.2. Anions sulfur	15
1.1.5. Classificació	17
1.2. Les metal·lotioneïnes en els organismes vius	22
1.2.1. MTs de mol·luscs	23
1.2.1.1. Metal·lotioneïnes en gastròpodes terrestres: el sistema d'MTs en els cargols <i>Helix pomatia</i> i <i>Cornu aspersum</i>	24
1.2.1.2. Metal·lotioneïnes en gastròpodes marins: la isoforma d'MT de <i>Megathura crenulata</i>	28
1.2.2. Altres MTs	29
1.2.2.1. El sistema d'MTs en els amfioxos	29
1.2.2.2. El sistema d'MTs de la mosca <i>Drosophila melanogaster</i>	30
1.3. Disseny experimental	32
2. Objectius	37
3. Resultats i discussió	41
3.1. Estudi del sistema d'MTs de diversos mol·luscs	45
3.1.1. Estudi de la capacitat coordinant de les diferents isoformes d'MT del gastròpode terrestre <i>Helix pomatia</i> : HpCdMT i HpCuMT	45
3.1.1.1. Comportament de HpCdMT envers Zn(II) i Cd(II)	45
3.1.1.2. Comportament de HpCdMT envers Cu(I)	47
3.1.1.3. Comportament de HpCuMT envers Zn(II) i Cd(II)	50
3.1.1.4. Comportament de HpCuMT envers Cu(I)	54
3.1.1.5. Estudi de la participació del residu d'His en l'enllaç metàl·lic de HpCuMT	57
3.1.1.6. Estabilitat dels complexos Cd ₆ -HpCdMT i Cu ₁₂ -HpCuMT	61
3.1.2. Estudi de la capacitat coordinant de les diferents isoformes d'MT del gastròpode terrestre <i>Cornu aspersum</i> : CaCdMT, CaCdCuMT i CaCuMT	63
3.1.2.1. Comportament de les isoformes CaMTs envers Zn(II)	63
3.1.2.2. Comportament de les isoformes CaMTs envers Cd(II)	65
3.1.2.3. Comportament de les isoformes CaMTs envers Cu(I)	70
3.1.3. Estudi de la capacitat coordinant de la metal·lotioneïna del gastròpode marí <i>Megathura crenulata</i> : McMT	77

3.1.3.1. Comportament de McMT envers Zn(II)	78
3.1.3.2. Comportament de McMT envers Cd(II)	78
3.1.3.3. Comportament de McMT envers Cu(I)	80
3.1.4. Anàlisi comparativa de la capacitat de coordinació metàl·lica exhibida per les MTs de mol·luscs estudiades	83
3.1.4.1. Consideracions globals.....	91
3.2. Estudi del sistema d'MTs de l'amfiox	95
3.2.1. Estudi de la capacitat coordinant de les isoformes d'MT de l'amfiox <i>Branchiostoma floridae</i> : BfMT1 i BfMT2	95
3.2.1.1. Comportament de BfMT1 i BfMT2 envers Zn(II)	96
3.2.1.2. Comportament de BfMT1 i BfMT2 envers Cd(II)	98
3.2.1.3. Comportament de BfMT1 i BfMT2 envers Cu(I)	103
3.2.2. Consideracions globals	108
3.3. Estudi del sistema d'MTs de la mosca <i>Drosophila melanogaster</i>	111
3.3.1. Estudi de la capacitat coordinant d'una cinquena isoforma d'MT de <i>Drosophila melanogaster</i> : MtnE.....	111
3.3.1.1. Comportament d'MtnE envers Zn(II) i Cd(II)	111
3.3.1.2. Comportament d'MtnE envers Cu(I).....	114
3.3.1.3. Comparació de la capacitat d'enllaç d'MtnE en el sistema d'MTs de l'organisme de <i>Drosophila melanogaster</i>	116
3.3.2. Consideracions globals	120
3.4. Estudi termodinàmic del desplaçament Zn ^{II} /Cd ^{II} en varies Zn-MTs mitjançant la tècnica d'ITC	123
3.4.1. Característiques químiques de les proteïnes estudiades.....	125
3.4.2. Dades calorimètriques associades al desplaçament metàl·lic Zn ^{II} /Cd ^{II} en varies Zn-MTs.....	126
3.4.3. Anàlisi de les dades termodinàmiques i comparació amb d'altres estudis sobre la reacció de desplaçament Zn ^{II} /Cd ^{II} en les espècies Zn-MT in vivo.....	129
3.4.4. Consideracions globals	132
3.5. Estudi de l'evolució amb el temps de les preparacions Cd-MT	135
3.5.1. Estudi de l'evolució amb el temps mitjançant les tècniques de DC, UV- Vis i ESI-MS	136
3.5.2. Estudi de l'evolució amb el temps mitjançant la tècnica d'HPLC acoblada a diferents detectors: UV-Vis, ICP-MS i ESI-MS	145
3.5.3. Consideracions globals	158
4. Conclusions	163
5. Procediment experimental i tècniques utilitzades	169
5.1. Obtenció i caracterització de la proteïna	169
5.1.1. Espectroscòpia d'emissió atòmica amb plasma acoblat inductivament (ICP-AES)	171

5.1.2. Espectrometria de masses ESI-TOF MS.....	171
5.1.3 Espectroscòpia de dicroisme circular (DC).....	172
5.1.4. Espectroscòpia d'absorció ultraviolat-visible (UV-Vis)	174
5.2. Agents valorants de Cd(II) i Cu(I)	175
5.2.1. Solució de Cd(II).....	175
5.2.2. Solució de Cu(I).....	175
5.3. Calorimetria Isoterma de Titulació (ITC).....	175
5.4. Tècniques acoblades a SE-HPLC (Size Exclusion-High Performance Liquid Chromatography).....	181
6. Bibliografia	187

7. Annex

7.1. Annex d'experiments: caracterització de les diferents MTs estudiades

- 7.1.1. Caracterització de les isoformes d'MT del cargol *Helix pomatia*
- 7.1.2. Caracterització de les isoformes d'MT del cargol *Cornu aspersum*
- 7.1.3. Caracterització de l'MT del barretet marí *Megathura crenulata*
- 7.1.4. Caracterització de les isoformes d'MT de l'amfiox *Brianchostoma floridae*
- 7.1.5. Caracterització de la cinquena isoforma d'MT de *Drosophila melanogaster*

7.2. Articles publicats

Article 1: "Shaping mechanisms of metal specificity in a family of metazoan metallothioneins: evolutionary differentiation of mollusc metallothioneins"

Article 2: "The role of histidine in a copper-specific metallothionein"

Article 3: "Physiological relevance and contribution to metal balance of specific and non-specific metallothionein isoforms in the garden snail, *Cantareus aspersus*"

Article 4: "Differential ESI-MS behaviour of highly similar metallothioneins"

Article 5: "The metal binding abilities of *Megathura crenulata* metallothionein (McMT) in the frame of *Gastropoda* MTs"

Article 6: "Metal Dealing at the Origin of the Chordata Phylum: The Metallothionein System and Metal Overload Response in *Amphioxus*"

Article 7: "Is *MtnE*, the fifth *Drosophila* metallothionein, functionally distinct isoform from the other members of this polymorphic protein family?"

1. INTRODUCCIÓ

1. Introducció

1.1. Metal·lotioneïnes

Fa més de 50 anys es va descobrir, en el còrtex de ronyó de cavall, una proteïna petita associada a Cd(II) i Zn(II) i que presentava com a característica principal un elevat contingut en residus de cisteïna,^[1] així van anomenar-la metal·lotioneïna (MT). Des d'aquell primer descobriment han estat moltes les metal·lotioneïnes (MTs) descobertes, aïllades i estudiades en multitud d'organismes.

L'interès creixent, per part del món científic, vers aquesta família de proteïnes des de la seva descoberta es reflecteix en la celebració de 4 reunions científiques internacionals exclusivament dedicades a les MTs.^[2, 3, 4, 5] Les MTs han estat també el tema principal de diversos llibres,^[6, 7, 8] capítols d'enciclopèdies,^[9, 10] números especials en revistes de divulgació científica,^[11] així com de la redacció de més de 100 articles de revisió que inclouen la paraula "metallothionein" en el títol. Un altre fet rellevant indicatiu de la seva importància és el fet que es troben una gran quantitat de seqüències d'MTs en les bases de dades de proteïnes més utilitzades com, per exemple, en la *UniprotKB/(Swis-Pro and TrEMBL) databases*,^[12] on es troben descrites fins a 202 seqüències d'MTs pertanyents a 109 organismes. Val a dir que el gran focus d'atenció s'ha concentrat en les MTs de mamífer i vertebrats, que constitueixen aproximadament el 30% del total de les MTs descrites. Aquesta gran quantitat d'informació disponible per les MTs de mamífers i vertebrats va provocar en la comunitat científica la falsa percepció de que les característiques d'aquestes eren extensibles a tota la resta, les d'altres organismes. Un estudi més extensiu d'un ampli ventall de isoformes d'MT ha permès observar característiques particulars i, per tant, qüestionar la similitud entre les MTs de mamífer i les d'altres organismes.

1.1.1. Propietats i característiques

Tota la comunitat científica que treballa en el camp de les MTs coincideix en què els membres d'aquesta superfamília de metal·loproteïnes tenen les següents característiques en comú:^[12]

- **Presentes en la major part d'organismes vius, tant procariotes com eucariotes.** Han estat identificades tant en organismes unicel·lulars (cianobacteris, llevats, protozous i recentment micobacteris^[13]) com en pluricel·lulars (vertebrats, invertebrats i plantes).
- **Baix pes molecular** (3-10 kDa) (30-100 aminoàcids).

- **Elevat contingut en residus cisteínics** (aprox. 30% del seus aminoàcids), particularitat que els hi confereix una **elevada capacitat per coordinar metalls pesants**.
- Aquestes cisteïnes coordinen ions metàl·lics mitjançant enllaços covalents, donant lloc a **clústers metall-tiolat**.^[14, 15]
- **Absència d'estructura secundària en la seva forma apo**, és a dir, el clúster metall-MT és el responsable de la seva estructura tridimensional.
- **Elevada estabilitat tèrmica i gran labilitat cinètica**.
- **Dins un organisme (*in vivo*) enllacen metalls tant essencials (Zn(II) i Cu(I)), com tòxics (Cd(II), Hg(II), Ag(I) i Pb(II)).**^[16, 17] En canvi, ***in vitro*** tenen l'habilitat de coordinar, a més dels anteriorment citats, **una gran varietat d'altres ions metàl·lics** com Au(I), Bi(III), Fe(II), Ni(II), Po, Pt(II) i Tc(IV).^[16]
- **Baix índex de residus hidrofòbics** (0-3%), histidina i arginina, i l'**absència**, en la majoria d'MTs, **de residus aromàtics**.^[16, 18]
- **Motius cisteínics característics:** X-Cys-X-Cys-X, X-Cys-Cys-X o X-Cys-Cys-Cys-X, essent X un aminoàcid diferent a la cisteïna.

L'alt contingut en residus de cisteïna és el tret més característic d'aquestes proteïnes, ja que les Cys són les responsables principals de la coordinació metàl·lica, si bé de vegades els residus d'His també poden coordinar metalls. Aquest enllaç metall-proteïnes és el que els hi proporciona la seva estructura tridimensional i, en conseqüència, determina la seva funció. Finalment cal remarcar l'existència d'una gran diversitat, tant en longitud com en composició, de seqüències d'aminoàcids entre les MTs conegudes. Això implica una diferenciació en la seva capacitat d'enllaç, la seva estructura tridimensional i, per tant, les seves funcions biològiques. D'aquí que sigui imperatiu cercar una estratègia adequada per a classificar i subdividir aquesta família que es troba en constant creixent.

1.1.2. Reactivitat i funcions

Després de més de cinc dècades des del seu descobriment, i de la publicació de milers d'articles dedicats a l'estudi de les MTs, les seves funcions fisiològiques específiques són encara poc conegudes i objecte d'un profund debat dins la comunitat científica. Tot i així, està generalment acceptat el fet que aquestes proteïnes estan involucrades en diferents processos biològics depenent dels organismes i/o isoformes considerades.

Val a dir que la majoria de les funcions atribuïdes a aquesta família de proteïnes són conseqüència directa de les seves característiques intrínseques i de la seva reactivitat.^[18, 19] Així es fa estrictament necessari dotar-nos d'un profund coneixement sobre la reactivitat química

d'aquests sistemes d'MTs però sempre tenint en compte que no necessàriament en tots els casos aquesta reactivitat química informa sobre la seva reactivitat fisiològica. Les metal·lotioneïnes formen agregats metall-tiolat que presenten una elevada estabilitat tèrmica, però alhora presenten una gran labilitat cinètica que els permeten un intercanvi metàl·lic ràpid amb d'altres proteïnes.^[18] També cal tenir en compte la reactivitat pròpia dels grups tiolat de les cisteïnes, que poden oxidar-se fàcilment i de manera reversible, formant ponts disulfur, a més de la seva capacitat de reaccionar amb d'altres espècies electrofíliques i radicalàries.^[20] Així, de forma general, la reactivitat de les MTs es caracteritza per:^[12]

- **Capacitat d'enllaçar i alliberar ions metàl·lics:** degut a la naturalesa de l'MT com a lligand polidentat (grups tiolat) presenta una gran afinitat per la majoria dels ions metàl·lics més tous. Cal destacar que alguns estudis^[21, 22] suggereixen que, en medis extra i intracel·lulars, gran part de les molècules d'MT es troben en la seva forma desmetal·lada (apo-MT) o parcialment metal·lada, fet que podria propiciar la captació d'ions metàl·lics.

- **Bescanvi metàl·lic:** un cop la proteïna es troba en forma metal·lada (principalment amb Zn(II) o Cu(I)), els cations poden ser bescanviats, total o parcialment, per uns altres de major afinitat. Aquest bescanvi es basa en l'afinitat dels ions metàl·lics pesants pels lligands tiolat de la proteïna que, d'acord amb la gradació descrita pel tiolats metàl·lics, segueix la sèrie $\text{Fe(II)} \approx \text{Zn(II)} \approx \text{Co(II)} < \text{Pb(II)} < \text{Cd(II)} < \text{Cu(I)} < \text{Au(I)} \approx \text{Ag(I)} < \text{Hg(II)} < \text{Bi(III)}$.^[23] Segons aquesta gradació, les espècies que contenen Zn(II) inicialment enllaçats són més reactives, i per tant, tenen més tendència a bescanviar aquests ions metàl·lics per uns altres, que els agregats Cu-MT que presenten un enllaç Cu-S_{Cys} més estable. Així, en cas d'intoxicació amb ions metàl·lics xenobiòtics, com Cd(II), Pb(II) o Hg(II), aquests serien capaços de desplaçar els ions Zn(II) inicialment enllaçats a MT ja que mostren una major afinitat pels lligands tiolats.

- **Transferència metàl·lica entre proteïnes i altres biomolècules:** aquesta particular reactivitat engloba la transferència de metalls entre MTs^[10] i entre les MTs i altres biomolècules intra i/o extracel·lulars.^[24] Molts dels treballs presents en la literatura es basen en aquesta reactivitat, treballant a partir de diferents isoformes d'MT de mamífer, considerant-les bàsicament com a acceptores o donadores de Zn(II) i limitant així el rol d'aquestes MTs en la homeòstasi del Zn(II).

- **Activitat redox:** una ampla gamma d'estudis han proposat que les Zn-MTs són molècules amb activitat redox i que, per tant, poden ser oxidades per oxidants cel·lulars seus, com el disulfur de glutatió (GSSG) o compostos de seleni, provocant l'alliberament de Zn(II) i, com a conseqüència, deixant grups tiolat lliures fàcilment oxidables (quan totes Cys coordinen Zn(II) aquestes estan protegides en front l'oxidació).^[25, 26, 27] Així, l'activitat redox de les Zn-MTs dependria de la quantitat de Zn(II) que aquestes tenen enllaçat, fet que a la vegada esta

relacionat amb la presència d'altres proteïnes que puguin enllaçar Zn(II). Hi ha nombrosos estudis sobre el comportament redox de les MTs vers altres agents oxidants més forts que el GSSG i espècies radicalàries (H_2O_2 , NO, $\text{OH}^\cdot$ i $\text{O}_2^{\cdot-}$) sota condicions d'estrès^[25, 27, 28] que també provoquen l'oxidació de les Cys. En qualsevol cas, no està clar si l'alliberament del metall en aquests processos és la funció principal de les MTs o tan sols el resultat de l'estrès oxidatiu, si bé, les evidències experimentals deixen clar que les MTs reaccionen en presència d'oxidants i espècies radicalàries.

L'especial i variada reactivitat d'aquestes proteïnes, implicades en multitud de processos fisiològics,^[29] evidencia la dificultat d'assignar-les-hi una única funció biològica. Considerant que fora lògic associar una sèrie de funcions precises a cadascuna de les MTs trobades en diversos organismes, en comptes d'intentar assignar una única funció com es fa amb la majoria de proteïnes, això no ha estat gens fàcil degut a la diversitat de reactivitats descrites. A continuació es descriuen les principals funcions atribuïbles a aquesta família de metal·loproteïnes:

- **Destoxicació de metalls tòxics.** Aquesta correspon a la primera i inicialment més acceptada funció atribuïda a les MTs i basada en certes evidències experimentals observades: augment de la sensibilitat enfront la contaminació amb cadmi d'organismes modificats genèticament que no poden sintetitzar MT (MT-KO),^[30, 31, 32] i la capacitat d'inducció que mostren els metalls tòxics com Ag(I), Cd(II) i Hg (II) sobre els gens que codifiquen aquestes proteïnes.^[30, 33, 34, 35, 36] Encara que són varies les raons per a les quals se'ls atribueix aquest comportament, s'ha de tenir present que la contaminació per metalls pesants és un fet recent des d'un punt de vista evolutiu i que la seqüència primària de les MTs és altament conservada entre els diferents organismes (ancestre comú). Per tant, encara que aquesta sorgís com una funció posterior no pot explicar l'existència d'aquestes proteïnes, sinó que semblaria més aviat que aquestes propietats coordinants corresponen a una conseqüència indirecta del seu elevat contingut en residus coordinants.
- **Homeòstasi de Zn(II) i Cu(I).**^[37, 38] Controlar els nivells de Zn(II) i Cu(I) en els sistemes biològics resulta crucial en la majoria d'organismes, per exemple, en mamífers on el zinc és l'element de transició més abundant després del ferro. Tanmateix, el coure és un oligoelement menys abundant que el zinc però indispensable per a la vida, ja que forma part de molts centres actius en diferents metal·loproteïnes. Tot i que aquests ions juguen un paper essencial en el metabolisme, cal tenir en compte que la concentració intracel·lular de Zn(II) i Cu(I) lliures s'ha de mantenir molt baixa degut a la seva pròpia reactivitat, i per tant, el control de la seva concentració és molt important. S'ha proposat que les MTs, que en condicions fisiològiques normals

s'aïllen enllaçant Zn(II) i/o Cu(I), poden tenir una funció important en la regulació de Zn(II) i Cu(I), interactuant amb d'altres proteïnes per tal de transferir l'ió metàl·lic enllaçat necessari per als diferents processos metabòlics.^[39, 40] Actualment, tot i que no es té gaire informació sobre els transportadors d'aquests metalls i de les seves interaccions amb els diferents components intracel·lulars, s'han publicat alguns estudis que suggereixen la participació de les MTs en la regulació de l'absorció de Zn i Cu per part de la cèl·lula^[41] i en la seva distribució, emmagatzematge i alliberament en diferents condicions fisiològiques.^[31, 1, 42, 43, 44, 45, 46, 47]

- **Carabines moleculars.** Les carabines o xaperones són aquelles proteïnes presents en totes les cèl·lules que tenen com a funció ajudar al plegament d'altres proteïnes durant la seva síntesi. S'ha proposat en molts casos que les MTs podrien actuar com a carabines moleculars en la síntesi d'algunes metal·loproteïnes i de factors de transcripció dependents del metall, actuant com a reservori de zinc, Zn(II) enllaçat als grups tiolats, i alliberant el metall que podria unir-se a la metal·loproteïna en un procés d'oxidació dels tiolats de les cisteïnes formant ponts disulfur (cistina).^[40, 48]
- **Agents antioxidants.** El paper de les MTs com agents antioxidants ha estat àmpliament estudiat^[49, 50] a partir de la demostració de la presència d'MTs en medis cel·lulars en condicions d'estrès oxidatiu en coexistència amb espècies reactives d'oxigen (ROS) i de nitrogen (RNS) a l'entorn intracel·lular, causades per diferents factors (l'exposició a radiacions varies –UV, raigs-X, etc.–, resultat de reaccions d'oxidació-reducció on intervé l'oxigen així com també dins la mitocondria com a residu de vies metabòliques).^[51] Diferents treballs han permès comprovar que el dany cel·lular per part de les ROS és més important en les cèl·lules on s'ha suprimit la síntesi d'MTs, i així s'ha proposat que les MTs podrien participar en el procés d'eliminació dels radicals lliures hidroxil, peròxid, o superòxid^[27, 52, 53] reaccionant-hi directament i oxidant-se, formant ponts disulfur, o bé cedint ions Zn(II) o Cu(I) a enzims antioxidants, com per exemple la superòxid dismutasa (SOD).^[54, 55]
- **Control metabòlic.** Alguns estudis han relacionat les MTs amb la regulació del balanç energètic cel·lular, com el que es presenta en estudis amb organismes on s'ha suprimit l'expressió gènica de les seves MTs^[56] provocant una major tendència a patir obesitat.
- **Paper antiapoptòtic i com a agent de protecció i regeneració cel·lular.** És rellevant la contribució dels estudis que mostren com les MTs podrien estar implicades en aquestes funcions esmentades.^[57, 58, 59, 60, 61] Aquestes estan relacionades amb el seu paper com antioxidants i xaperones, ja que quan estan implicades en certs processos

biològics poden jugar un paper antiapoptòtic i en d'altres com a agents per a la protecció cel·lular o participar en la regeneració cel·lular.

1.1.3. Mètodes d'obtenció

El descobriment d'aquestes proteïnes tant particulars en multitud d'organismes va despertar un gran interès per estudiar-les i conseqüentment va resultar estrictament necessari dotar-se de metodologies idònies per a l'obtenció de les MTs en bona qualitat i puresa, en termes analítics, per a l'estudi de les seves propietats característiques i de les seves funcions. L'obtenció i purificació de proteïnes sempre ha estat una tasca complicada degut a la gran complexitat de les mostres. En el cas de les MTs, l'obtenció de mostres apropiades per a la seva caracterització constitueix un repte especial degut a algunes de les seves característiques intrínseques: l'existència, de forma habitual, d'un gran polimorfisme dins el mateix organisme; un patró d'expressió gènica complicat; gran quantitat d'agents inductors de la seva síntesi; i la seva gran habilitat per enllaçar una gran varietat d'ions metàl·lics.^[12]

El fet que en un teixit puguin coexistir diferents isoformes i subisoformes d'MT, amb una elevada homologia seqüencial, i que depenent de les condicions utilitzades en la purificació el seu contingut metàl·lic pugui variar (mostrant inclús la formació d'una mescla de compostos amb diferents tipus d'ions metàl·lics enllaçats, que requeriran una esfera de coordinació, i per tant, una estructura tridimensional particular), entre d'altres inconvenients, explica la gran heterogeneïtat que mostren les preparacions natives i que complica enormement l'optimització del procés de purificació i separació de forma acurada de la isoforma d'MT desitjada.

El mètode més tradicional i també el més utilitzat per obtenir metal·lotioneïnes, sobretot a la dècada dels 90, consisteix en induir la seva biosíntesi en els éssers vius on es troba l'MT desitjada de forma nativa i posteriorment procedir a l'**aïllament i purificació** a partir dels òrgans on ha tingut lloc una major producció de la proteïna.^[8] Mitjançant la seva inducció, que pot tenir lloc a causa d'un gran nombre d'agents (com, per exemple, la presència d'ions metàl·lics, agents radicals oxidants, exposició a radiació UV o determinades hormones) es poden obtenir les MTs en forma nativa presents en diferents teixits d'animals o plantes.

S'ha de tenir en compte que quan s'indueix la síntesi d'MTs per presència d'un metall, aquest condiona/determina l'ió metàl·lic coordinat a l'MT en el moment de l'aïllament. Per tant, pot donar-se el cas, que les espècies aïllades potser no siguin representatives d'un paper fisiològic real en el sistema biològic en estudi. El Cd(II) ha estat uns dels ions metàl·lics més utilitzats amb aquest propòsit i, per tant, es recuperen espècies Cd-MT. Això implica que en el cas que la finalitat sigui estudiar el comportament d'una MT coordinada a Zn(II) o Cu(I), serà indispensable dur a terme un procés d'acidificació de la Cd-MT aïllada per obtenir la forma demetal·lada (forma apo-MT) i posteriorment reconstituir-la amb Zn(II) o Cu(I) per obtenir els

corresponents complexos. El principal problema d'aquesta metodologia es troba en què els complexos així obtinguts no sempre són isoestructurals a les formes Zn- o Cu-MT natives.^[11]

Altres inconvenients d'aquest mètode són: la necessitat de grans quantitats de teixit, un procés de purificació llarg, l'obtenció d'MTs en baixa concentració i baixa puresa, i el fet de no poder obtenir MTs de tots els organismes desitjats.

En vista de la dificultat d'obtenir les metal·lotioneïnes de forma nativa, una alternativa habitual per a l'obtenció de proteïnes petites i pèptids és preparar-les sintèticament, en aquest cas l'obtenció d'MTs mitjançant la **síntesi química de les cadenes polipeptídiques** sobre un suport sòlid.^[62] Aquest mètode ha estat emprat per a produir principalment la forma apo de pèptids petits, com MTs de fongs^[62, 63] i dominis per separat de diverses MTs de mamífer.^[62, 63, 64, 65, 66, 67] Un avantatge molt important d'aquest procediment és que permet obtenir proteïnes mutades, és a dir, dissenyar modificacions en les seqüències d'MTs desitjades, i així tenir la possibilitat d'avaluar les propietats de la proteïna quan es substitueixen determinats aminoàcids. No obstant també compta amb moltes limitacions pel fet de tractar-se d'unes proteïnes molt riques en residus de Cys, fàcilment oxidables durant els processos de síntesi química dels pèptids, requerint la protecció química d'aquests residus per evitar la seva oxidació, fet que limita tant la longitud de la cadena com la seva puresa. Així, els principals inconvenients d'aquesta metodologia són: la limitació en la longitud de la cadena polipeptídica; que la proteïna obtinguda es trobi en la seva forma apo (demetal·lada), amb la necessitat d'un pas posterior de reconstitució *in vitro* amb el catió metàl·lic desitjat; i que la puresa també és força baixa.^[68]

Una bona alternativa a aquests dos mètodes és l'obtenció de proteïnes mitjançant la **tècnica de l'ADN recombinant**,^[69] que va aparèixer en el camp de les MTs cap als anys 90 provocant una autèntica revolució en la recerca de les MTs. Aquesta metodologia resulta ser una eina molt valuosa ja que permet l'obtenció dels complexos metall-MT en grans quantitats, amb un alt grau de puresa i estructurats en un entorn cel·lular (citoplasma de la cèl·lula de producció) suposadament de manera similar i equivalent a la produïda de forma nativa.^[70, 71, 72]

La tècnica consisteix en la utilització de cèl·lules bacterianes o de llevat (hoste), d'un grau de complexitat baix, per sintetitzar proteïnes (en aquest cas MTs) pròpies d'altres organismes (productes heteròlegs). Per aconseguir-ho s'introdueix dins l'hoste un plasmidi (seqüència d'ADN circular) que contingui tota la informació (*vector*) per a la síntesi de l'MT desitjada (*proteïna recombinant*): la seqüència que codifica la proteïna, els senyals de transcripció i traducció adequats, una seqüència que faci l'hoste immune a un determinat antibiòtic (penicilina, ampicilina, etc.), i la informació genètica addicional que garanteixi que la molècula de l'ADN que conté tots aquests elements es mantingui estable dins la cèl·lula i es transmeti als descendents (**Fig. 1**).

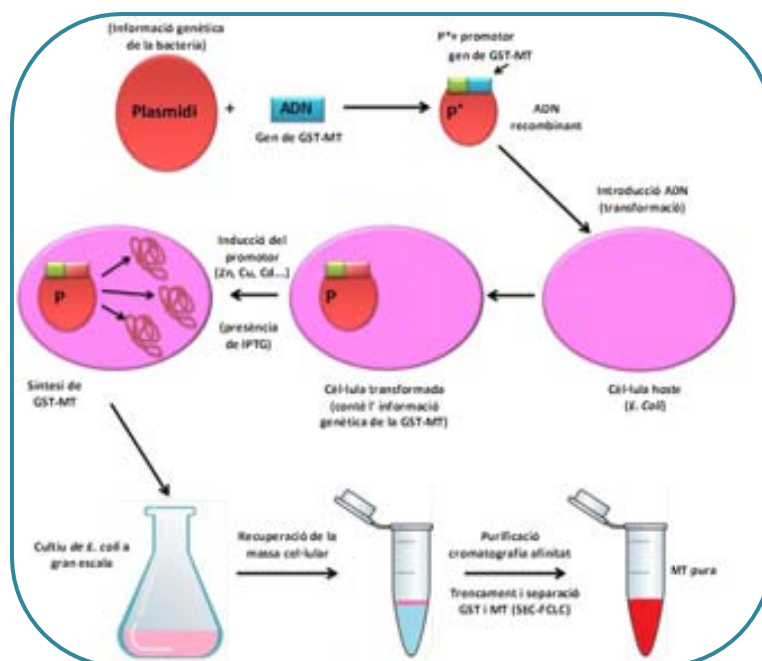


Fig. 1. Esquema general d'obtenció i purificació d'una proteïna recombinant.

Mitjançant aquest procediment es poden obtenir MTs amb una elevada concentració ($\sim 10^{-4}$ M) i puresa (>95%) en la seva forma metal·lada, evitant les dificultats de les purificacions de les MTs natives des de l'organisme o els teixits complets (d'un grau de complexitat molt superior), i fins i tot permet sintetitzar per separat els diferents dominis constituents d'algunes MTs així com l'obtenció de qualsevol mutant desitjat (mutagènesi dirigida). Aquesta metodologia permet disposar de diferents seqüències i fragments d'una gran varietat d'MTs de diferents organismes, des de mamífers^[73, 74, 75, 76, 77] a invertebrats,^[78] facilitant així una anàlisi funcional i estructural de qualsevol MT. Cal ressaltar que aquest procediment permet obtenir aquestes proteïnes enllaçades a diferents ions metàl·lics simplement afegint al medi de cultiu un excés del metall desitjat,^[69] una característica que la fa una tècnica especialment interessant i molt adient per a l'estudi de les MTs.

El conjunt d'avantatges que ofereix aquesta tècnica ha fet que actualment el mètode de l'ADN recombinant sigui el més utilitzat per a l'obtenció d'MTs i el que s'ha emprat per a obtenir les MTs estudiades en aquesta Tesi Doctoral.

1.1.4. Característiques estructurals

És ben conegut que l'estructura de les MTs, el seu plegament tridimensional, es basa en la coordinació metàl·lica ja que quan les metal·lotioneïnes es troben sense metall coordinat (forma apo) presenten essencialment una cadena desordenada (*random coil*). En presència d'ions metàl·lics, gràcies a la flexibilitat de la cadena peptídica, els complexos metall-tiolat formats mostren una disposició espacial dels àtoms de sofre cisteínic coordinants (de vegades també pels N_{His}) on es satisfan les geometries de coordinació específiques dels ions metàl·lics

enllaçats (Cd(II) i Zn(II) presentarien únicament coordinació tetraèdrica mentre que Cu(I) pot mostrar diversos entorns de coordinació) en una conformació global de la proteïna sense excessives tensions. En definitiva, l'estructura terciària de la proteïna està determinada pel nombre i disposició dels residus de Cys dins la cadena proteica i per la seva preferència coordinant envers els ions metàl·lics. Estudis estructurals mostren com en la majoria de casos aquesta coordinació a metalls dóna lloc a estructures que presenten un sol domini (monodominials) o dos dominis independents (bidominials).

Les millors tècniques per a caracteritzar l'estructura d'una proteïna són l'espectroscòpia de RMN i la difracció de raigs X, amb les que en molts casos es pot determinar la distància d'enllaç metall-sofre i les geometries de coordinació metàl·liques. Tot i així, val a dir que aquestes tècniques presenten també alguns problemes intrínsecs. Pel que fa a la difracció de raigs X, el principal problema es troba en la dificultat d'obtenir mostres cristal·lines. L'espectroscòpia de RMN, en canvi, requereix grans quantitats de proteïna, de les quals no sempre es disposa, i en moltes ocasions la flexibilitat de les cadenes peptídiques i la labilitat dels ions metàl·lics impedeixen la seva completa determinació estructural. Addicionalment, els metalls fisiològicament enllaçats a les MTs (Zn i Cu) no tenen cap isòtop actiu en RMN, cosa que impedeix la determinació de les connectivitats metall-cisteïna. Degut a aquestes dificultats, són molt poques les estructures tridimensionals d'MTs que fins al moment s'han pogut resoldre amb tècniques de ressonància magnètica multinuclear (RMN) o per difracció de raigs X (**Taula 1**).

<u>Organisme</u>		<u>Complex metall-MT</u>	<u>Tècnica</u>
Mamífer	Humà, rata i conill	Cd ₇ -MT2	RMN
	Rata	Cd ₅ Zn ₂ -MT2	DRX
	Ratolí	Cd ₇ -MT1	RMN
	Ratolí i humà	Cd ₇ -MT3	RMN
Peix (<i>N.coriiceps</i>)		Cd ₇ -MT	RMN
Crustaci	<i>C.sapidus</i>	Cd ₆ -MT1	RMN
	<i>H.americanus</i>		
Equinoderm (<i>S.purpuratus</i>)		Cd ₇ -MTA	RMN
Llevat (<i>S.cerevisiae</i>)		Cu ₈ -Cup1	DRX
		Cu ₇ -Cup1	RMN
		Ag ₇ -Cup1	RMN
Fong (<i>N.crassa</i>)		Cu ₆ -NcMT	RMN
Cianobacteri (<i>S.elongatus</i>)		Zn ₄ -SmtA	RMN
Planta (<i>T.aestivum</i>)		Zn ₄ -β _E -E _C -1	RMN

Taula 1. Complexos metall-MT d'estructura tridimensional inclosa en la *Protein Data Bank* (PDB). En la taula les sigles RMN corresponen a ressonància magnètica nuclear i DRX a difracció de raigs X.

Endinsant-nos una mica més en l'anàlisi de les estructures 3D d'MTs fins al moment resoltes i més properes a aquest treball s'observa que, tret de la proteïna SmtA de cianobacteri que presenta un únic domini,^[79] tots els complexos metall-MT dels cations metàl·lics divalents Zn(II) i Cd(II) formen una estructura dividida en dos dominis, cadascun amb un clúster metall-tiolat.

Les MTs de mamífer, les més estudiades i de les que es té més informació, presenten un voltant de 60 aa i donen lloc generalment a la formació d'espècies d'estequiometria M_7 -MT quan enllacen cadmi o zinc ($M = Cd, Zn$) (**Fig. 2**), en la que els metalls es disposen en dos clústers metall-tiolat anomenats α (alfa) i β (beta)^[16]. El seu domini N-terminal, β , està format per 3 ions divalents enllaçats tetraèdricament a 9 tiolats cisteïnics, (M_3 -SCys₉), i el seu domini C terminal, α , forma un clúster amb 4 ions divalents també coordinats tetraèdricament a 11 residus de cisteïna, (M_4 -SCys₁₁). Com es pot observar en la **Fig. 2** i **Fig. 3**, el domini β presenta 3 SCys pontals i 6 de terminals, formant així un anell de sis membres, a diferència del domini α on s'observa la fusió de dos anells de sis membres com els anteriors, compartint dos enllaços en una estructura on existeixen 5 SCys pontals i 6 terminals.

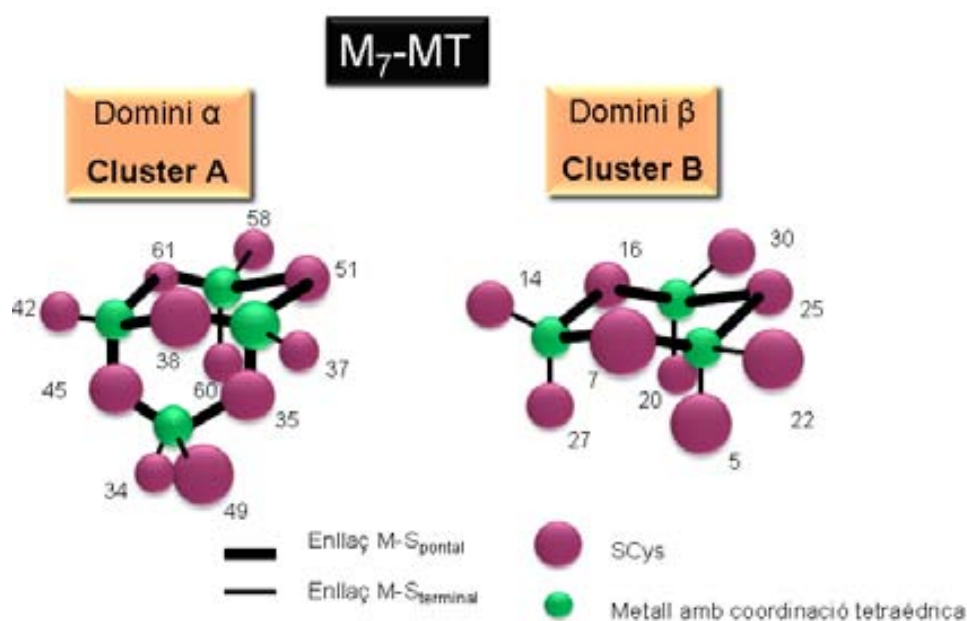


Fig. 2. Representació de l'estructura tridimensional dels clústers metàl·lics dels dos dominis de Cd_7 -MT2 determinada per RMN de ^{113}Cd i ^1H i per difracció de raigs X. La numeració correspon a la localització de les cisteïnes en la seqüència de 62 aminoàcids de l'MT2 de fetge de ratolí.^[16]

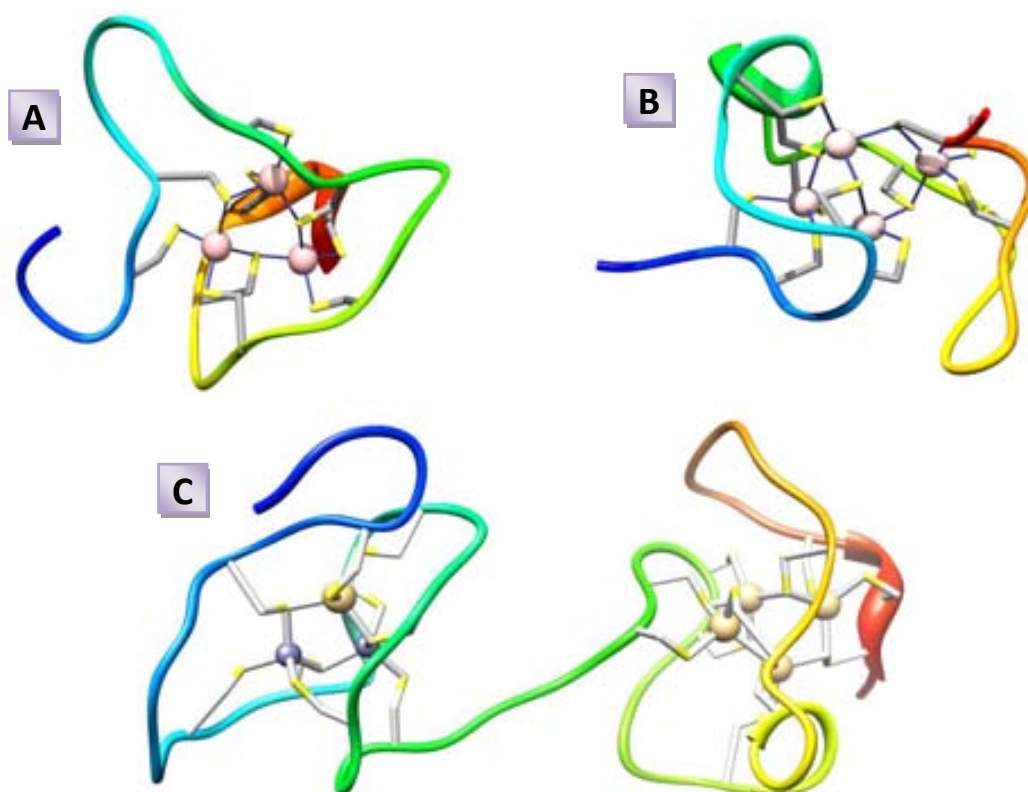


Fig. 3. Estructura tridimensional de l'MT d'humà Cd₇-MT2 mostrant A) el domini β tancant el clúster Cd₃(SCys)₉, B) el domini α amb el clúster Cd₄(SCys)₁₁ (entrades del PDB 2mhu and 1mhu, respectivament); on els ions de Cd(II) es mostren com esferes, els residus de Cys com a pals i els enllaços de S-Cd com a línies negres sòlides ^[12]. C) Estructura tridimensional de la proteïna sencera Cd₅Zn₂-MT2 (els ions Zn(II) es mostren com esferes grises).

Pel que respecta a les MTs de crustaci, bàsicament crancs i llagostes, mostren una longitud similar a les isoformes de mamífer amb 58-59 aa. L'estructura tridimensional de l'espècie Cd₆-MT (corresponent al cranc *C.sapidus* i la llagosta *H.americanus*), resolta per RMN de ¹¹³Cd, mostra l'existència de dos dominis amb la mateixa estequiometria metall-tiolat que el domini β de l'MT de mamífer (M₃-SCys₉).^[16]

Recentment (**Taula 1**), s'ha descrit per primera vegada l'estructura tridimensional de l'únic clúster metàl·lic present en l'MT de cianobacteri, Zn₄-SmtA. En aquest clúster de tipus α de mamífer, participen en la coordinació 2 residus d'His, en les posicions que ocuparien dos residus de Cys, formant un clúster metàl·lic del tipus M₄(Scys)₉(NHis)₂.^[79, 80] Aquesta isoforma d'MT té a més la particularitat de ser extremadament inert al desplaçament del Zn(II) inicialment enllaçat per Cd(II). Aquesta observació ha fet plausible proposar una estreta relació entre aquesta MT i les proteïnes conegudes com a dits de Zn (*Zn fingers*).^[79]

Tot i que hi ha força dades referents a la coordinació de les MTs a Cu(I) en vertebrats, invertebrats i eucariotes, al mateix temps existeix una gran manca d'informació referent a les estructures d'aquests complexos Cu-MT. L'estructura més estudiada i l'única completament resolta tridimensionalment fins al moment correspon a la Cup1 del llevat *Saccharomyces cerevisiae*. L'altra estructura pertany al fong *N.crassa* (NcMT), on desafortunadament les mesures de RMN^[81] només han permès determinar l'estructura tridimensional de la cadena

polipeptídica del clúster $\text{Cu}_6\text{-NcMT}$, que és consistent amb la presència d'un únic domini.^[82] Per altra banda, el complex de Cu de la isoforma Cup1 (de 53 aa, dels quals 12 són Cys i 1 His) s'ha aconseguit resoldre tant per raigs X^[83] com per RMN.^[84, 85] L'estructura del complex $\text{Cu}_7\text{-Cup1}$ va ser determinada mitjançant RMN de ^1H i ^{109}Ag a partir de l'espècie $\text{Ag}_7\text{-Cup1}$ (a causa de la inexistència d'isòtops de coure actius en RMN) aprofitant la suposada isoestructuralitat de les formes Cu-Cup1 i Ag-Cup1 . Posteriorment, l'estudi estructural de la mateixa mitjançant difracció de raigs X^[83] va permetre observar l'existència de 8 Cu coordinats a la proteïna. Com es pot veure en la **Fig. 4** el clúster $\text{Cu}_8\text{-Cup1}$ resolt conté els ions Cu(I) enllaçats a través de 10 de les seves 12 Cys, on cada residu uneix de 2 a 3 ions de Cu(I) , sense ser cap d'ells un residu de S_{Cys} terminal. Finalment, l'anàlisi estructural dels complexos Cu-MT ha permès determinar que en les MTs la coordinació a Cu(I) es produeix a través de dos (geometria lineal) o tres (trigonal plana) lligands cisteínics.^[16, 18, 9] Cal remarcar la impossibilitat de les MTs per enllaçar Cu(II) , sempre enllacen Cu en estat d'oxidació +1, ja que el Cu(II) oxida els residus de cisteïna a cistina^[86] formant ponts disulfur i reduint-se a Cu(I) .

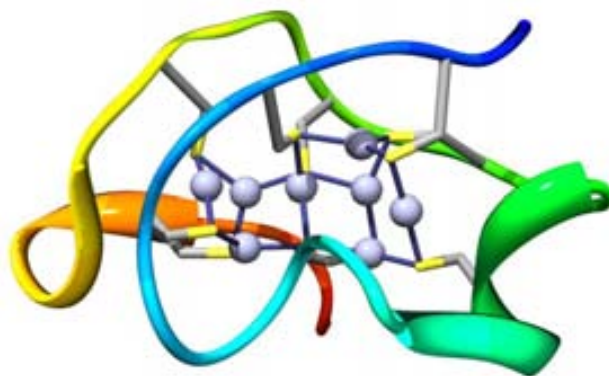


Fig. 4. Estructura 3D de la $\text{Cu}_8\text{-Cup1}$ de *S. cerevisiae*, mostrant el clúster de $\text{Cu}_8(\text{SCys})_{10}$ (entrada en PDB 1rju). Els Cu(I) es mostren com esferes, els residus de cisteïna com a pals i els enllaços S-Cu com a línies sòlides.

Una alternativa a la RMN i la difracció de raigs X es troba en les tècniques espectroscòpiques d'absorció UV-visible, dicromisme circular, dicromisme circular magnètic i d'emissió, generalment utilitzades en la caracterització i estudi de les MTs. Aquestes permeten observar algunes característiques estructurals de la proteïna i de l'enllaç metall-proteïna, proporcionant informació sobre l'estequiometria dels complexos metall-MT formats.^[16] Un avantatge important a l'hora d'utilitzar aquestes tècniques en l'estudi de les MTs és l'absència, en la majoria d'MTs, de residus aromàtics. Així en el cas de mesurar la forma holo-MT totes les absorcions detectades en la regió de 240-800 nm correspondran únicament als cromòfors metall-MT mentre que els cromòfors de la forma apo-MT només absorbiran per sota de 220 nm.

Un fet àmpliament acceptat per la comunitat científica és que els principals responsables de l'elevada capacitat de les MTs per enllaçar diferents ions metàl·lics són els residus de cisteïna, presents en un major ràtio en les MTs que en qualsevol altre tipus de proteïnes, i en alguns casos

també pels residus d'His. D'aquesta manera, els residus de Cys i His normalment proporcionen els àtoms donadors de sofre i nitrogen que els ions metàl·lics requereixen per satisfer els seus entorns de coordinació. De tota manera, es poden trobar a la literatura diversos exemples que demostren la presència de lligands no proteics coordinant a les metal·lotioneïnes. L'estudi d'un ampli nombre de metal·lotioneïnes ha fet possible, en alguns casos, observar i analitzar la participació d'anions clorur^[87] i sulfur^[88, 89] com a lligands en els agregats metall-MT. Ambdós casos han estat descrits pel grup de recerca on s'emmarca aquesta Tesi Doctoral.

1.1.4.1. Anions clorur

Els exemples disponibles de la participació dels ions clorur com a lligands addicionals en els complexos metall-MT són escasos però, tot i així, està àmpliament acceptada la contribució d'aquests lligands no proteics en l'estructura i estabilitat de les espècies metall-MT. Aquesta contribució es va proposar per primera vegada quan s'estudiava la interacció de les metal·lotioneïnes amb l'ATP,^[44] concretament en la Cd₇-MT2 on els anions clorur enllaçaven residus de lisina. Posteriorment, en estudis realitzats per aquest grup de recerca, es va proposar també la participació dels ions clorur en MtnB de la *D.melanogaster*^[90] així com per MT4^[91] recombinant de ratolí. En aquests casos es van observar unes absorcions característiques de DC i UV-Vis a aproximadament 240 nm. Amb la finalitat d'aclarir si aquesta contribució diferia substancialment depenent de l'MT i dels ions metàl·lics involucrats, per l'absència d'una correlació entre la contribució dels lligands inorgànics i les corresponents dades espectroscòpiques (DC, UV, Raman), i finalment per aportar llum al possible rol dels ions clorur en els clústers metàl·lics de les MTs, aquest grup de recerca va presentar un treball on s'analitzava la influència dels anions Cl⁻ en els complexos Zn- i Cd-MT de les isoformes MT1 i MT4 de mamífer. Es van dur a terme produccions recombinants d'MT1 i MT4 de ratolí en medis suplementats amb Cd(II) i Zn(II), així com experiments *in vitro* de desplaçament de Zn^{II}/Cd^{II} en presència i absència d'ions clorur.^[87] Els resultats obtinguts confirmen les evidències espectroscòpiques (absorció a ca. 240 nm) per la participació dels anions clorur com a lligands addicionals, suggerint que aquesta contribució depèn de cada MT particular, i que aquesta estaria associada principalment a l'enllaç a MT1.

1.1.4.2. Anions sulfur

La participació dels anions sulfur (S²⁻) com a lligands addicionals es va determinar per primer cop en els agregats metàl·lics d'uns pèptids anomenats fitoquelatines (PCs).^[92, 93, 94] Les fitoquelatines,^[118] també anomenades cadistines, són uns pèptids d'origen enzimàtic i de fórmula general (γ-Glu-Cys)_nGly presents normalment en plantes, algues i fongs, i estretament

relacionats amb les MTs. Inicialment van ser considerades i classificades com a metal·lotioneïnes dins la Classe III (**Apartat 1.1.5.**), principalment perquè comparteixen la particularitat de ser riques en residus de cisteïna que també utilitzen per coordinar diferents ions metàl·lics. Posteriorment, s'ha demostrat que, a més a més dels residus de Cys, utilitzen anions sulfur àcid-làbils com a lligands addicionals per a la coordinació del Cd(II). Les PCs s'aïllen formant nanoclusters CdS-Ec denominats *crystallites*^[95] en les que el recobriment proteic embolcalla un microcristall de sulfur metàl·lic (**Fig. 5**). Un fet rellevant que reforça la idea del paper destoxicador enfront metalls tòxics que s'atribueix a aquests pèptids, és l'existència d'un increment de la seva síntesi quan l'organisme es troba en presència de metalls pesants.^[96] Fins al moment, totes les dades aportades feien pensar que el mecanisme de destoxicació que seguien les MTs i les PCs eren diferents però a la llum dels recents descobriments hi ha base per obrir i ampliar aquest debat.

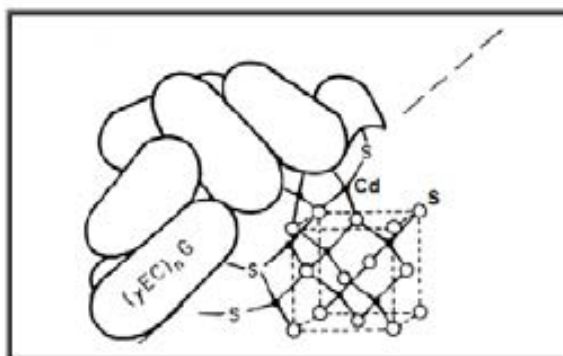


Fig. 5. Representació dels agregats metall-PC on la proteïna recobreix els microcristalls de CdS (*crystallites*), els quals s'uneixen a la PC mitjançant enllaços Cd-S_{Cys} (extret de Winge *et al.*^[95]).

Els primers indicis sobre la possible participació de lligands sulfur addicionals en els complexos metall-MT provenen de les evidències experimentals recollides en la biosíntesi de la isoforma QsMT de *Q.suber*.^[97] Tot i així, no va ser fins l'any 2005 on, a partir d'un estudi metòdic i extens dut a terme pel grup de recerca on s'emmarca aquesta Tesi Doctoral mitjançant DC, UV-Vis i ESI-MS, que s'aconsegueix descriure la presència d'aquests lligands sulfur (S^{2-}) com a tercer component (no proteic) dels clústers metall-MT en diverses bioproduccions d'MTs produïdes en *E.coli*.^[88] en medis rics en Zn i Cd. Així, es va observar la presència en major proporció i importància d'aquests lligands sulfur en les bioproduccions Cd-MT, coexistent espècies que contenen anions sulfur, M_x-S_y -MT, amb les espècies esperades sense lligands sulfur, M_x -MT. El fet de que mai abans cap altre grup de recerca hagués estat capaç de detectar la presència d'aquests lligands sulfur en les MTs va portar una gran controvèrsia i va fer que es dubtés de la fiabilitat dels resultats. Conseqüentment, va dissenyar un estudi per tal de poder demostrar la presència d'aquests lligands no proteics addicionals també en mostres d'MTs natives.^[89] Concretament, es van purificar els complexos metall-S-Cup1 del seu organisme original el llevat *Saccharomyces cerevisiae*. A la llum d'aquests resultats es va poder afirmar que havien estat els

protocols de purificació de mostres natives tant estrictes, sense mencionar cap tipus de tractament àcid, els causants de que no s'hagués descobert la presència de lligands sulfur fins a l'aplicació de la metodologia de la síntesi de l'ADN recombinant en el camp de les MTs.

La presència de lligands sulfur tant en les formes natives com recombinants dels complexos metall-MT obre un nou món de possibilitats. Actualment, altres grups de recerca han especulat amb la relació de l'augment de la capacitat de les MTs per segrestar ions Cd(II) en funció de la quantitat de S^{2-} present en solució.^[98, 99] Altres grups directament han aprofitat aquesta propietat de les MTs de formar clústers metall- S^{2-} com a mètode per a la biosíntesis *in vivo* de nanopartícules metàl·liques mitjançant la seva síntesi recombinant en *E.coli*.^[100, 101] En el cas d'aquest grup de recerca, el coneixement aportat per la síntesi recombinant de multitud d'MTs diferents i el seu estudi a través de les tècniques de DC, UV i ESI-MS ha permès determinar les principals característiques i evidències experimentals de la seva presència en diverses mostres. En aquest àmbit, ha estat clau poder relacionar l'existència d'aquests lligands sulfur en les bioproduccions recombinants en medis de cultiu rics en metalls divalents (especialment en presència del metall tòxic Cd(II)) en aquelles MTs que presenten baixa preferència metàl·lica pels ions divalents, i en major mesura per l'ió metàl·lic Cu(I). Encara queden moltes incògnites per descobrir com la influència que pot tenir la presència dels lligands sulfur amb la seva capacitat de captar ions Cd(II), la seva relació amb una possible funció de destoxicació del metall pesant Cd(II) i inclús la definició de les particularitats de l'evolució al llarg del temps que mostren les espècies CdS-MT *in vivo*. Per tant, la presència de lligands sulfur va esdevenir una variable més a tenir en compte en l'estudi de les MTs recombinants. Dins aquesta Tesi doctoral s'analitzaran alguns d'aquests aspectes per aportar dades rellevants que permetin resoldre o aclarir algunes d'aquestes qüestions.

1.1.5. Classificació

La forma habitual de classificar les proteïnes és en base a la seva funcionalitat (proteases, oxigenases, reductases, etc.). Encara que a les MTs se'ls hi han atribuït algunes funcions concretes, i en general més d'una, és un problema classificar-les de la manera tradicional ja que encara avui en dia és difícil conèixer la seva funció fisiològica principal. Llavors, no és difícil entendre perquè les primeres classificacions proposades es basaven en les seves homologies seqüencials i característiques estructurals.

Així, la primera classificació d'MTs proposada es basava en la similitud de la seva seqüència d'aminoàcids amb la de la primera MT descoberta, l'MT de cavall. Així quedaven dividides en 3 grans grups:^[102, 103]

Classe I: MTs on els residus cisteïnics estan localitzats en posicions anàlogues (alineables) a l'MT de cavall. En la classe I s'inclouen una gran varietat d'MTs, de mamífer però també d'altres famílies, vertebrats i alguns d'invertebrats, i totes relacionades per una estructura primària similar i constituïdes per dos dominis independents.

Classe II: s'inclouen en aquest grup totes aquelles MTs que tenen residus cisteïnics localitzats en posicions diferents (no alineables) als de l'MT equina, constituint un grup amb una gran heterogeneïtat de seqüències. S'han aïllat de fongs, plantes, invertebrats i d'alguns bacteris. Moltes tenen la particularitat de presentar un únic domini (monodominials).

Classe III: tenen totes un origen enzimàtic (biosintetitzades enzimàticament) i per tant, no es sintetitzen a partir d'ARN missatger com les de les classes I i II. Habitualment es troben en plantes, algues i alguns fongs. La classe III recopila els polipèptids atípics que contenen unitats – γ -(Glu-Cys) i que habitualment s'anomenen fitoquelatines o cadistines (veure **Apartat 1.1.4.2.**).

L'any 1997 (en el Congrés Internacional sobre MTs, *Metallothionein IV*) sorgeix una proposta de classificació que diferencia les MTs segons relacions filogeniques i criteris seqüencials. D'aquesta manera queden dividides en famílies, subfamílies, subgrups, isoformes i subisoformes.^[104]

Com s'ha indicat abans, cap d'aquestes dues classificacions té en compte la funcionalitat de les MTs. L'estudi sistemàtic i extens d'una gran varietat de noves MTs, més enllà de les dominants MT1 i MT2 de mamífer i Cup1 de llevat si mitjançant la implementació d'un mètode unificat per obtenir les MTs i estudiar les seves característiques d'enllaç metàl·lic, dut a terme per aquest grup de recerca, ha permès proposar una classificació complementària i per primera vegada amb criteris funcionals per aquesta família de metal·loproteïnes. Es coneix que els ions metàl·lics Zn(II) i Cu(I) són els que es troben fisiològicament enllaçant a les MTs en els organismes vius, i que a més tots dos mostren preferències d'enllaç diferents. Així, els diferents entorns de coordinació del Zn(II) i Cu(I) conduiran, inclús amb el mateix lligand (mateixa MT), a la proteïna a adoptar una conformació particular donant lloc, per tant, a complexos metall-MT amb estructures específiques. La proposta surt del supòsit de que, per la relació estructura-funció, sigui l'estructura la que determini la seva funció. Així, depenent de l'ió metàl·lic que enllaci cal esperar estructures específiques i per tant funcions característiques.^[17, 105] La base d'aquesta nova classificació són les preferències de les MTs per enllaçar Zn i Cu *in vivo* distingint entre dues famílies d'MTs:

- **Zn-tioneïnes:** aquestes, en medis rics en Zn, només enllacen Zn(II) generant espècies homometàl·liques, Zn-MT. En canvi, en medis rics en Cu donen lloc a espècies heterometàl·liques, que contenen Zn(II) i Cu(I) (Zn,Cu-MT).
- **Cu-tioneïnes:** són aquelles que en medis rics en Cu donen lloc a espècies homometàl·liques Cu-MT i, per tant, no requereixen Zn per assolir un bon grau d'estructuració.

Aquesta proposta inicial que dividia les MTs en dos grans grups, en els extrems de Zn- i Cu-tioneïnes, va ser adequada i s'adaptava bé fins que noves aportacions en l'estudi d'un nombre important d'MTs van forçar a replantejar-la i actualitzar-la. Les principals observacions fetes en relació a l'existència de lligands sulfur àcid-làbils en algunes bioproduccions en medis de cultiu rics Zn(II) i, principalment en Cd(II),^[88] l'observació de la influència del grau d'oxigenació dels medis de cultiu d'*E.coli* amb la naturalesa homo- o heterometàl·lica dels complexos Cu-MT biosintetitzats,^[106] així com algunes particularitats de l'enllaç metàl·lic que es desprenen dels estudis *in vitro*, van evidenciar l'existència d'un gran nombre de proteïnes que no presentaven propietats clares de Zn- ni de Cu-tioneïnes i en conseqüència, de difícil classificació. El conjunt de dades obtingudes suggereixen l'existència d'una gradació de les propietats coordinants de les MTs que permet ordenar-les entre aquests dos extrems, les Zn-tioneïnes genuïnes i les Cu-tioneïnes estrictes.^[72, 107] Aquests dos extrems convergeixen en una classe central d'MTs que presenten unes característiques intermèdies (Fig. 6).



Fig. 6. Representació esquemàtica de la gradació de les MTs vers el seu caràcter de Zn- o Cu-tioneïna.

Per tal d'establir aquesta gradació s'han considerat els següents factors:^[108]

- 1) Presència o absència de Zn(II) en els complexos metall-MT biosintetitzats en medis enriquits en Cu(II) (sota diferents graus d'oxigenació dels cultius d'*E.coli*).
- 2) Presència o absència de lligands sulfur en les formes Cd-MT obtingudes *in vivo*.
- 3) Presència o absència de Zn(II) en les formes Cd-MT biosintetitzades.
- 4) Grau de reticència a l'intercanvi Zn/Cd *in vitro* de les Zn-MTs obtingudes *in vivo*.
- 5) Nombre d'equivalents de Cu(I) necessaris (en relació amb el nombre de Cys) per tal de reproduir *in vitro* les espècies Cu-MT obtingudes *in vivo*.

Les propietats de les Zn- i Cu-tioneïnes genuïnes, les qual són completament oposades, es presenten en la següent taula (**Taula 2**) i esquema (**Fig. 7**):

Zn-tioneïnes genuïnes	Cu-tioneïnes genuïnes
En les bioproduccions en medis enriquits en Zn(II) i Cd(II) es sintetitzen com a única espècie	Es sintetitzen com a mescla d'espècies quan són bioproduïdes en medis enriquits en medis rics en metalls divalents, Zn(II) i Cd(II)
Contenen Zn(II) en ser bioproduïdes en medis enriquits en Cd(II)	Contenen lligands de S^{2-} en ser produïdes en medis enriquits en Cd(II)
Reticència a l'intercanvi Zn^{II}/Cd^{II} <i>in vitro</i>	No mostren cap reticència a l'intercanvi de Zn^{II}/Cd^{II} <i>in vitro</i>
Formació d'espècies heterometàl·liques en les bioproduccions en medis rics en Cu(II), independentment del grau d'oxigenació del cultiu	S'obtenen com a espècies homometàl·liques en ser bioproduïdes en medis enriquits en Cu(II), independentment del grau d'oxigenació del cultiu

Taula 2. Comparació de les propietats de les Zn-tioneïnes i les Cu-tioneïnes genuïnes.

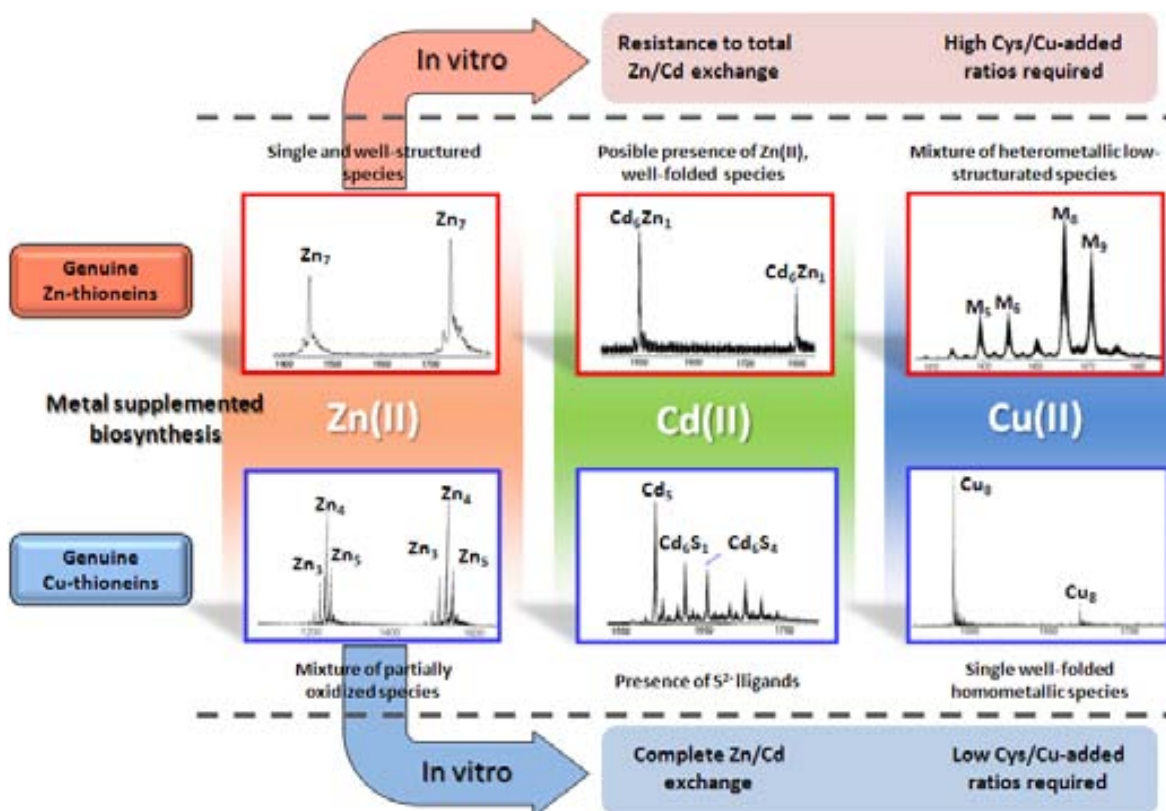


Fig. 7. Representació esquemàtica de les dades experimentals i procés deductiu seguit per a classificar les MTs estudiades segons el seu caràcter de Zn- o Cu-tioneïnes (extre de Ò.Palacios *et al.*^[11]).

La característica principal de les Zn-tioneïnes genuïnes és la formació d'una única espècie Zn-MT amb un grau d'estructuració elevat en la seva biosíntesi en medis enriquits en Zn(II). Aquests ions Zn(II) presenten resistència a ser desplaçats tant *in vivo* (bioproduccions de Cd-MT, on de vegades es pot observar la presència de complexos heterometàl·lics Zn,Cd-MT) com *in vitro* (reticència a intercanviar completament el Zn(II) pel Cd(II)). En canvi, les Cu-tioneïnes

genuïnes, presenten la particularitat de formar una mescla d'espècies M-MT quan es biosintetitzen en medis de cultiu d'*E.coli* suplementats en Cd(II) o Zn(II). Addicionalment, ha estat determinant per a aquesta classificació la descoberta de la presència de lligands sulfur addicionals en les bioproduccions dels complexos Cd-MT de diverses MTs. En concret, s'ha pogut establir la relació entre l'existència d'aquests lligands sulfur amb un major caràcter de Cu-tioneïna de la proteïna. S'ha comprovat que la quantitat de lligands sulfur és proporcional al caràcter de Cu-tioneïna d'una determinada MT i que aquests es troben completament absents en els complexos formats per les Zn-tioneïnes genuïnes. Aquestes observacions indiquen que les MTs amb un elevat caràcter de Zn-tioneïna no requeririen lligands addicionals per a coordinar ions divalents, mentre que les Cu-tioneïnes, especialment dissenyades per a coordinar ions monovalents, en ser obligades a coordinar metalls divalents, i especialment Cd(II), fan ús dels lligands sulfur per estabilitzar els seus complexos metàl·lics.

Els estudis *in vivo* i *in vitro* de coordinació del Cu(I) a les MTs també varen aportar evidències clares per a la seva classificació. Les Zn-tioneïnes genuïnes es caracteritzen per l'obtenció de complexos heterometàl·lics Zn,Cu-MT en ser biosintetitzades en medis de enriquits en Cu(II), independentment del grau d'oxigenació dels cultius, suggerint un possible paper del Zn(II) per al correcte plegament de la proteïna quan coordina ions Cu(I) *in vivo*. Per altra banda, les Cu-tioneïnes genuïnes donen lloc sota qualsevol grau d'oxigenació a espècies homometàl·liques de Cu(I). Finalment, es va estudiar la influència del número d'equivalents de Cu(I) necessaris per reproduir les espècies Cu-MT biosintetitzades en condicions normals d'oxigenació (nº Cys/eq de Cu(I)) en relació al seu caràcter de Cu- i Zn-tioneïnes. S'ha pogut observar que aquelles isoformes classificades com a Zn-tioneïnes genuïnes requereixen unes ratios Cys/Cu(I) majors que les Cu-tioneïnes. Aquesta observació estaria d'acord amb la hipòtesi de que dins les cèl·lules les metal·lotioneïnes es produïrien exclusivament com a complexos Zn-MT i que, posteriorment, aquest metall seria substituït per Cu(I) tot depenent de les necessitats de la cèl·lula. Així, en el cas de les Cu-tioneïnes, en que tot el Zn(II) és substituït per Cu(I), la quantitat de Cu(I) necessària per efectuar aquesta substitució serà més gran que en el cas de les Zn-tioneïnes on la substitució només és parcial.

Una vegada definida aquesta nova proposta de classificació de les MTs resulta interessant relacionar les seves diferents capacitats de coordinació metàl·lica i les seves possibles funcions fisiològiques. Aquest és el cas de la isoforma Cup1 de llevat, classificada com l'MT amb el caràcter de Cu-tioneïna més extrem coneguda fins al moment, que dóna lloc a espècies homometàl·liques de Cu altament específiques, en plena concordança amb les observacions fetes a nivell d'inducció de l'MT nativa, ja que aquesta únicament es sintetitza en llevat com a resposta a un excés de Cu o Ag.^[108] En canvi, aquelles MTs que han estat definides com a Zn-tioneïnes extremes, les isoformes CeMT1 (nematode) i MeMT (musclo), es sintetitzen

de forma nativa a nivells basals indicant una major preferència pels ions Zn(II). Finalment també es pot trobar una estreta relació fisiològica i la coordinació metàl·lica observada en aquelles MTs definides com a formes intermèdies entre les Zn- i Cu-tioneïnes genuïnes. És el cas de la CkMT^[109] de pollastres o la Crs5^[106] de llevat situades al mig de la gradació, i per a les que s'ha atribuït una possible participació tant en el metabolisme del Cu(I) com en el del Zn(II). Així, aquesta bona correlació entre l'estudi i classificació de les MTs de forma gradual entre Zn- i Cu-tioneïnes i les possibles funcions o evidències de comportament fisiològic que presenten en els organismes vius reforça la idoneïtat de l'aplicació de la classificació proposada per aquestes metal·loproteïnes i, alhora, la confirmació de la seva base funcional.

1.2. Les metal·lotioneïnes en els organismes vius

L'anàlisi de la bibliografia sobre les MTs posa de manifest la gran hegemonia i el gran focus d'atenció que s'ha posat en l'estudi de les metal·lotioneïnes de mamífers, fongs i darrerament també plantes, tot i que les MTs es troben presents en pràcticament la totalitat d'organismes vius, coneixent-se més de 250 metal·loproteïnes procedents del regne animal, vegetal i procariota.^[110] De fet les més estudiades i conegudes, MT1 i MT2 (mamífer) i la Cup1 (llevat), només representen una petita porció dels organismes vius on els pèptids d'MT han estat identificats. La gran diversitat i heterogeneïtat de les seqüències existents aboca irremeiablement a la comunitat científica a profunditzar en l'estudi dels pèptids presents en altres organismes.

En els mamífers s'han identificat 4 gens codificants d'MT per les isoformes MT1, MT2, MT3 i MT4, i en algun cas inclús poden presentar subisoformes. Mostren una gran similitud seqüencial, en concret contenen 20 residus de Cys en posicions completament conservades. És rellevant remarcar les diferències detectades en els seus patrons d'expressió, on MT1 i MT2 es sintetitzen constitutivament i de forma ubiqua, l'MT3 es sintetitza en el sistema nerviós central i MT4 en l'epiteli escamós estratificat.^[111, 112]

Les MTs d'invertebrats han estat relativament molt menys estudiades des d'un punt de vista químic o estructural que les anteriors. La majoria d'estudis han estat enfocats en l'anàlisi del seu potencial ús com a biomarcadors de contaminació, obviant molt més altres aspectes d'aquestes proteïnes i on globalment existeix una gran manca d'informació. El fet que aquestes MTs provenguin d'un conjunt molt extens d'organismes amb gran diversitat provoca que el constitueixin un nombre molt gran de pèptids amb molta heterogeneïtat seqüencial i amb poques característiques comunes. Els sistemes d'MTs més coneguts en aquesta família són els d'insectes,^[113] crustacis,^[114, 115, 116] equinoderm,^[117] mol·luscs^[118, 119] i nematodes.^[119, 120, 121]

D'aquesta manera, el treball de Tesi Doctoral que es presenta té el seu focus principal en la determinació de l'especificitat metàl·lica de les isoformes d'MT presents en diferents grups

d'organismes que es consideren d'alguna manera "*models*". Com es presentarà més endavant, es centra en 3 grans grups. El més important i el que tindrà més representativitat en la Tesi és el cas dels mol·luscs. En concret, els gastròpodes terrestres amb les isoformes d'MT dels cargols *Helix pomatia* i *Cornu aspersum* i així com el dels gastròpodes marins amb la única isoforma d'MT present en el barretet marí *Megathura crenulata*. Concretament, el sistema dels cargols terrestres és molt particular i interessant ja que presenta polimorfisme en la formació de les diferents isoformes d'MT, amb una extremada homologia entre elles però que a la vegada semblen presentar unes preferències d'enllaç a metall diametralment oposades (Cd-MT i Cu-MTs). Gràcies al fet que aquestes mostren una elevada similitud és possible fer una cerca dels factors que determinen aquesta especialització metàl·lica.

L'estudi de les propietats coordinants de les metal·lotioneïnes enfront diferents ions metàl·lics es va fer extensiu a altres organismes com són la mosca *Drosophila melanogaster*, a través de la caracterització d'una cinquena isoforma d'MT aïllada recentment, i a les dues isoformes d'MT de *Brianchoyoma floridae*, organisme del tipus amfiox de la família dels cefalocordats. El cas de la mosca *D.melanogaster* es presenta com un organisme model inqüestionable dins dels invertebrats. Té la particularitat de ser l'únic que presenta un polimorfisme d'MTs que mostren, de manera extrema, una gran preferència metàl·lica pel ió Cu(I). Finalment, l'organisme amfiox té una gran rellevància com a model en estudis evolutius, però sorprenentment no hi ha cap informació sobre el seu sistema d'MTs.

1.2.1. MTs de mol·luscs

Els mol·luscs comprenen una àmplia varietat d'espècies amb gran importància des d'un punt de vista econòmic, mèdic i mediambiental. Taxonòmicament dins d'aquest fílum s'inclouen gastròpodes, bivalvs i cefalòpodes, entre d'altres.^[119] Una particularitat molt especial de les diferents espècies de mol·luscs és la d'haver esdevingut capaces d'adaptar-se a pràcticament a tots els habitats de la terra.^[122] Dins d'aquesta família s'han donat situacions diferents i variades. Mentre els bivals i cefalòpodes, entre d'altres, s'han propagat de forma predominant en el medi marí, certs llinatges de gastròpodes han conquerit els habitats terrestres.^[123, 124]

Es coneix que les MTs es troben involucrades en multitud de processos,^[30] essent específics a cadascun dels grups d'organismes considerats i depenent de les seves necessitats fisiològiques concretes. En particular l'extraordinària multiplicitat i diversitat de les isoformes d'MT al llarg de cadascuna de les branques de l'arbre de la vida, i especialment en els invertebrats, pot estar relacionada amb la seva habilitat per adaptar-se i ser útil per una gran varietat de funcions,^[125] representant així un exemple interessant d'adaptació tot evolucionant a nivell molecular. D'aquesta manera, els requeriments mediambientals específics experimentats per aquells organismes que han conquistat i per tant, que han hagut d'adaptar-se tot

evolucionant a nous hàbitats, podrien explicar l'aparició de multiplicitat d'isoformes d'MT. En el cas de les metal·lotioneïnes, existeix una variabilitat moderada a través de la distància filogenètica dels organismes que pot reflectir una funcionalitat conservada. Per altra banda, és cert que l'aparició de noves isoformes d'MT ha tingut lloc amb la preservació de les posicions d'aquells aminoàcids que són essencials per a la formació i l'estabilitat de l'arquitectura dels clústers metàl·lics.^[126]

Un exemple perfecte d'aquesta adaptació i del polimorfisme de les MTs és el que mostren els gastròpodes terrestres (cargols terrestres), organismes que han demostrat tenir una extraordinària capacitat per adaptar-se i dominar l'hàbitat que els envoltava. Un dels més exitosos han estat certs llinatges de cargols anomenats pulmonats, *Panpulmonata*.^[127] Aquests organismes en la seva transició al medi terrestre han perdut les brànquies i han desenvolupat pulmons per respirar, explotant l'aire amb oxigen a través de la superfície de la cavitat anomenada *mantell*. Aquesta evolució per adaptar-se ha succeït afectant profundament al genoma i a la fisiologia dels cargols.^[119] Així els gastròpodes pulmonats terrestres (els més estudiats *Helix pomatia* i *Ariantna arbustorum*^[128]) exhibeixen una combinació de propietats única, essent un sistema excel·lent per a l'estudi de la diversificació evolutiva de les proteïnes i de la relació entre aquesta i la diferenciació funcional en les diferents isoformes d'MT.

En aquest escenari, resulta rellevant preguntar-se quina situació és la que presenten aquells gastròpodes que no van conquerir la terra i es van quedar habitant el món marí. Diferents estudis^[126] mostren com els gastròpodes no pulmonats i marins no presenten cap polimorfisme d'MT. Aquest fet dóna força a la idea de que ha estat l'adaptació al món terrestre el fet que ha donat lloc al polimorfisme de les MTs que s'observa en els cargols terrestres, com per exemple, en *Helix pomatia*, *Cornu aspersum* i *Ariantna arbustorum*, entre d'altres. Especialment interessant és el cas de la *Megathura crenulata* (*giant keyhole limpet*), un gastròpode marí pertanyent a la família dels Fissurellids, organisme molt ben estudiat ja que la seva hemocianina és utilitzada com a transportador haptènic i estimulant immune. Va ser precisament durant l'estudi^[129] d'aquesta hemocianina quan, recentment, va ser possible descriure la presència d'una única isoforma d'MT en aquest organisme.

1.2.1.1. Metal·lotioneïnes en gastròpodes terrestres: el sistema d'MTs en els cargols

Helix pomatia i *Cornu aspersum*

L'existència del polimorfisme d'MT en una gran varietat d'organismes ha estat àmpliament descrita, tot i que existeixen diferents situacions, diferents graus de diversificació. Existeixen casos on els organismes mostren varies isoformes d'MT amb especificitats metàl·liques divergents fins a d'altres on les MTs no presenten diferències significatives en la

seva afinitat metàl·lica. La família dels gastròpodes pulmonats, en concret *Helix pomatia*, *Biomphalaria glataria* i *Cornu aspersum*, constitueixen un model perfecte d'estudi. En aquests, ha estat possible descriure l'existència de 3 gens que codifiquen 3 isoformes d'MT (CuMT, CdMT and Cd/CuMT) respectivament aïllades de forma nativa com espècies homometàl·liques de Cu(I)- o Cd(II)-, o heterometàl·liques Cu(I),Cd(II)-. El contingut metàl·lic determinat en aquestes espècies es troba en concordança amb l'observació de que els gastròpodes terrestres toleren concentracions elevades de cadmi i coure, acumulant ambdós metalls en els seus teixits. Els cargols són capaços de reduir la toxicitat del cadmi alhora que posseeixen mecanismes que procuren la disponibilitat del coure per als requeriments metabòlics de l'organisme. D'aquesta manera, en correspondència al contingut metàl·lic d'aquestes MTs natives, la seva especificitat metàl·lica fisiològica, es pot teoritzar sobre les seves possibles funcions. Així les isoformes CuMT, produïdes constitutivament, estan associades amb la homeòstasi del Cu essencial, per assegurar-ho en la biosíntesi de la hemocianina.^[137] Per altra banda, les isoformes CdMT, induïbles, podrien tenir el seu rol com destoxicadores del metall no essencial i tòxic Cd(II).^[130] Finalment, la isoforma Cd/CuMT s'aïlla, en alguns casos, nativament com a complexos que contenen ambdós Cd(II) i Cu(I) simultàniament, encara que aquests es sintetitzen en nivells mínims indicant una menor importància en el metabolisme dels metalls.^[131]

Si bé existeix l'esperada homologia entre les MTs de cargol i les d'altres mol·luscs, el grau d'identitat entre les primeres i les de vertebrats és més gran que l'observat amb les MTs d'altres invertebrats. Aquest grau d'identitat vers les MTs de vertebrats també s'observa en d'altres MTs de mol·luscs, com ostres i musclos. Una característica que evidencia aquest fet és que les MTs de mol·luscs poden estar classificades dins la classe I, on es troben les de vertebrats i, en canvi, les MTs d'altres invertebrats com la de la mosca de la fruita, el nematode i l'eriçó de mar es troben dins la classe II.^[132, 133]

Així, les MTs de cargols terrestres mostren algunes característiques típiques de les MTs de la classe I, amb prop de 60 aminoàcids dels quals 18-20 són residus cisteínics. Pel seu contingut en cisteïnes les metal·lotioneïnes de cargols terrestres són capaces d'enllaçar fins a 6 ó 7 ions metàl·lics divalents (Cd(II), Zn(II)). Per tant, tot i que la informació disponible sobre l'estructura terciària d'aquestes MTs d'invertebrats terrestres és escassa, per la seva similitud amb l'estructura primària de les MTs de vertebrats, caldria esperar una estructuració dels clústers metall-tiolat de la proteïna en 2 dominis.^[128, 133]

En el cas dels cargols *Helix pomatia* i *Cornu aspersum*, tots dos objecte d'estudi en aquesta Tesi Doctoral, presenten un polimorfisme d'MT similar però amb algunes divergències. En el cas del cargol terrestre *Helix pomatia*, s'han aïllat dues isoformes d'MT dels seus òrgans (**Fig. 8**). La primera identificada va ser la isoforma que conté únicament Cd, anomenada HpCdMT, que es va trobar a l'hepatopàncrees ("midgut gland"). Aquesta proteïna consta de 66

aa, 18 dels quals són cisteïnes. La segona isoforma, HpCuMT, es troba en el mantell (actua com a pulmó) enllaçant a Cu. Consta de 64 aa, dels que 18 corresponen a residus cisteïnics, a més de tenir una histidina. És molt interessant comprovar com les dues isoformes d'*Helix pomatia* presenten els residus de Cys en exactament les mateixes posicions, perfectament alineables, tot i que cal remarcar que la resta d'aminoàcids només mostren homologia en un 43% (Fig. 8).^[134]

```

HpCuMT GRGK--NCGGACNSNPCCSCGNDCKCGAGCNCDCSSCHCSNDDCKCGSQCTGSGSCCKCGSACGCK
HpCdMT GKKGKGEKCTSA CRSEPCQCGSKCQCGEGCTCAACKTCNCTSDGCKCGKECTGPDSCCKCGSSCSCK
      *:*:*      :*  .**.*:*:*.*.*.*:*:*  **.*  *  .*:*:*:*.*.*****.:***.*****:*.*

```

Fig. 8. Alineació de la seqüència d'aminoàcids de les dues isoformes trobades pel cargol terrestre *H. pomatia*, HpCuMT i HpCdMT, mitjançant l'aplicació CrustalW. En negreta i fons groc s'observen els residus de cisteïna. L'asterisc (*) indica que en aquella posició els residus són 100% idèntics, els dos punts (:) que les posicions en les que ha succeït una substitució conservativa i un punt (.) indica substitucions menys conservatives.

A diferència de HpCdMT que s'expressa en diferents tipus de cèl·lules, la isoforma HpCuMT s'expressa exclusivament en unes cèl·lules anomenades rogocits, que es troben en pràcticament tots els teixits dels cargols. Els rogocits són els dipòsits més importants d'emmagatzematge de coure. El número de rogocits amb contingut de coure augmenta intensament després de l'administració de coure a través de la dieta dels cargols. Alguns estudis



han demostrat que l'exposició a cadmi d'aquests no fa variar ni l'enllaç a coure ni provoca la inducció de HpCuMT.^[135, 136, 137, 138] El fet que aquesta isoforma aïllada en els rogocits del mantell contingui exclusivament Cu, en concret 12 ions Cu(I) per cada mol de HpCuMT, sembla suggerir que aquesta proteïna està involucrada en el metabolisme del coure i particularment en la síntesi d'hemocianina, responsable de la respiració cel·lular en el cargol. Donat que quantitats elevades de Cu poden produir efectes tòxics en els cargols, la seva regulació homeostàtica és un punt primordial per a la supervivència d'aquests organismes.

La isoforma de Cd mostra una seqüència similar a la de les MTs de mamífer encara que té un menor contingut en residus de cisteïna.^[139, 140] Aquesta isoforma, quan s'obté a partir del cargol, presenta una estequiometria Cd₆-HpCdMT, anàloga a la trobada en MTs d'altres crustacis marins i en el nematode *Caenorhabditis elegans*. Aquesta però, difereix d'altres com les MTs de musclo, de llagosta marina i de mamífer, les quals totes enllacen 7 equivalents d'ions divalents. Estudis estructurals de Cd₆-HpCdMT proposen una disposició dels ions Cd(II) en dos clústers de 3 Cd enllaçats per 9 sofres cisteïnics donant lloc a agregats (Cd₃Cys₉), similars als clústers trobats en MTs de vertebrats i d'invertebrats, i en els que els cadmis presenten coordinació tetraèdrica.^[140]



El cargol terrestre *C. aspersum* presenta 3 isoformes d'MT diferents en els seus teixits (**Fig. 9**). Aquest organisme presenta dos isoformes d'MT, CaCdMT i CaCuMT, anomenades així pel fet de que de forma nativa es troben enllaçant preferentment Cd(II) i Cu(I) respectivament^[141] i perquè són molt similars (anàlogues) a la HpCdMT i HpCuMT aïllades del cargol terrestre *H. pomatia* prèviament descrites. Addicionalment presenta una tercera isoforma, aïllada del *midgut gland* dels cargols exposats a Cd, formant un complex que enllaça tant Cd(II) com Cu(I) i per tant, ha estat anomenada com CaCdCuMT.^[131] És interessant observar com les seqüències de les 3 isoformes d'MT difereixen tan sols en alguns dels residus no cisteínics, tal i com s'observa també en el cas de les MTs de *Helix pomatia*.

```

CaCuMT  MSGRG--QNCGGACNSNFCNCGNDCNCGTGNCNDQCSARHCSNDDCKCGSQCTRSGSKCGNAGCGCK
CaCdCuMT MSGKG--SACAGSCNSNFCSCGDDCKCGAGCSCAQCYSCQCNNDTCKCGSQCTSGSKCG-SCGCK
CaCdMT  MSGKGKGEKCTAACRNEFCQCGSKCQCGEGCTCAACKTCNCTSDGCKCGKECTGPDSCKCGSSCGCK
          ***:*  .  *  .:*.:.**.*.:.**  **.*  *  :  :*.  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *

```

Fig. 9. Alineament en base a similitud seqüencial de les isoformes d'MT del cargol terrestre *C. aspersum* mitjançant l'aplicació CrustalW. En negreta i fons groc s'observen els residus de cisteïna i en blau trobem el residu tirosina. L'asterisc (*) indica que en aquella posició els residus són 100% idèntics, els dos punts (:) que les posicions en les que ha succeït una substitució conservativa i un punt (.) indica substitucions menys conservatives.

Davant la situació particular que exhibeixen els sistemes d'MTs dels cargols terrestres pulmonats resulta difícil confirmar si la gran especificitat fisiològica per diferents ions metàl·lics i a la mateixa vegada una extremada homologia seqüencial (principalment dels residus de Cys) que mostren és resultat de les condicions específiques del medi cel·lular o més aviat pels mecanismes d'evolució molecular que han modelat la seqüència d'aminoàcids per a determinar la seva especificitat metàl·lica. Inclús una tercera opció, que sigui el resultat d'una combinació de les dues anteriors. D'aquesta manera és fa estrictament necessari realitzar un estudi de les propietats enllaçants d'aquests dos sistemes d'MTs, el d'*H. pomatia* i *C. aspersum*, per tal de verificar si realment aquestes isoformes, donada la similitud de les seves seqüències, presenten característiques d'enllaç diferents o si bé l'ió metàl·lic que enllacen amb preferència depèn de l'òrgan on s'expressen. Aquest treball s'engloba dins un projecte que té com a objectiu identificar i avaluar els factors que determinen l'especificitat i preferència metàl·lica de les isoformes d'MT del cargol *Helix pomatia* i *Cornu aspersum* per tal d'obtenir informació sobre els mecanismes mitjançant els quals la funcionalitat i diferenciació molecular ha determinat l'evolució d'aquests sistemes d'MTs models dels gastròpodes terrestres.

1.2.1.2. Metal·lotioneïnes en gastròpodes marins: la isoforma d'MT de *Megathura crenulata*



En analitzar la situació tan particular del sistema d'MTs en els gastròpodes terrestres i pulmonats resulta rellevant examinar que succeeix amb el sistema d'MTs dels gastròpodes marins no pulmonats. A diferència dels primers en els gastròpodes no pulmonats no s'ha reportat cap tipus de polimorfisme d'MT. Especialment rellevant és el cas del sistema d'MT en l'organisme

Megathura crenulata, (barretet marí), gastròpode marí que no presenta cap polimorfisme d'MT. En concret, al 2003 va ser possible, durant un estudi que tenia com a objectiu identificar les seqüències que codifiquen la hemocianina, aïllar el cDNA complet que codificava una nova MT (McMT).^[129] La manca d'estudis de seqüenciació fan impossible descartar completament l'existència d'altres gens codificants per d'altres isoformes d'MT, tot i que fins al moment no hi ha cap evidència de cap altre isogen d'MT que s'expressi de forma significativa en aquest organisme. Finalment, és remarcable que es trobés aquesta única isoforma d'MT en un estudi enfocat a l'hemocianina, indicant, inicialment, una plausible relació d'aquesta amb la síntesi d'hemocianina.

McMT MSGKGENCTAECKSDPFCACGDSCKCGEGCACTTCVKTEAKTTCKCGESCKCEGCKEKEGACKCESGCASCK
Fig. 10. Seqüència d' aminoàcids de l'MT del barretet marí *M.crenulata*, McMT.

Des d'un punt de vista seqüencial, en un primer anàlisi de l'estructura primària de McMT (**Fig. 10**) s'observa com aquesta proteïna és evidentment homòloga a les altres MTs de gastròpodes conegudes, tant en longitud (número d'aa) com en residus de Cys. De forma molt interessant, l'anàlisi prèvia del cDNA corresponent a la seqüència de McMT^[129] mostra una inserció peculiar de 5 residus en l'extrem C-terminal de McMT que no es troba en les MTs de gastròpodes descrites fins al moment, però el que en canvi sí que s'ha observat i és característica de la isoforma MT3 de mamífer. Tot i així, cal esmentar que McMT té absent el tetrapèptid CPCP, funcional en el domini β d'MT3 i que se sap que suprimeixen el procés de creixement neuronal.^[129] Finalment, s'ha proposat a McMT com una proteïna molt propera a la isoforma de Cu de *Helix pomatia*, la HpCuMT, però a la vegada exhibint algunes característiques relacionades amb la isoforma HpCdMT.^[129]

En base a les dades de que es disposa i a les hipòtesis plantejades és evident la manca d'estudis que permetin avaluar les capacitats coordinants de McMT envers diferents ions metàl·lics. És considerat per tant necessari, realitzar l'estudi de caracterització d'aquesta MT per

donar un raonament a les observacions publicades i determinar la seva especificitat metàl·lica nativa que previsiblement podria donar sentit a una possible relació d'aquesta amb l'hemocianina.

1.2.2. Altres MTs

1.2.2.1. El sistema d'MTs en els amfioxos

Hi ha molts aspectes referents a aquesta família de proteïnes (MTs) que encara es desconeixen, com per exemple, la incertesa sobre el seu origen i diferenciació al llarg del camí evolutiu. Tot i que s'ha proposat per a les MTs un origen polifilètic,^[125] sembla ser que la seva història evolutiva és particularment difícil per ser interpretada a través dels criteris d'evolució moleculars estàndards. Varies dècades dedicades a l'estudi de les MTs han permès dibuixar un mapa prou clar sobre el procés evolutiu sofert pel sistema d'MTs dins el subfílum dels vertebrats.^[142] Tot i això, encara hi ha poca informació sobre el punt (o punts) que va donar lloc i es origen de la diversificació de les MTs en els vertebrats en relació amb altres grups d'organismes.

A més dels vertebrats, en el fílum dels cordats existeixen dos subfílums més: els cefalocordats (els lancelets o amfiox) i els tunicats (prèviament urocordats). La posició privilegiada d'aquests grups d'organismes en l'arbre de la vida, essent els parents més propers dels vertebrats, fan que siguin molt rellevants en estudis de filogenètica molecular i d'evolució del genoma en els organismes cordats/vertebrats.^[143, 144, 145] S'ha posat gran interès sobre els cordats no vertebrats, en especial l'amfiox, degut a que se'l considera organisme model en l'estudi del llinatge evolutiu dels vertebrats. Aquests organismes, tot i seguir línees evolutives diferents dels vertebrats des de fa més de 520 milions d'anys, proveeixen de pistes sobre l'origen dels vertebrats servint de punt de partida a partir del qual rastrejar com els vertebrats han evolucionat i adaptat. S'han estudiat a nivell genòmic amb la finalitat d'ampliar el coneixement que es té en el camp evolutiu, com per exemple la diferenciació i especialització en els sistemes gen/proteïna, proporcionant informació sobre com els vertebrats han utilitzat els antics gens per noves funcions.^[146] Pel que fa a les metal·lotioneïnes, de fet, hi ha molt poca informació disponible sobre el sistema d'MTs en els cordats no vertebrats. En el cas dels cefalocordats (amfioxos) no hi havia informació disponible de cap MT fins a l'estudi



Imatge 1. Portada de la prestigiosa revista *Nature* on s'inclou l'important descobriment de la descripció completa del genoma d'MT

presentat en aquesta Tesi Doctoral, excepte per l'anotació d'un ORF en amfiox (*Branchiostoma floridae*) que aparentment codificava una MT.

Vista la gran importància d'aquest organisme, amfiox, en estudis evolutius del sistema gen/proteïna i per l'absència d'estudis sobre les seves MTs, es va decidir dur a terme un estudi del sistema d'MTs en els lancelets, explotant així aquesta oportunitat gràcies a la recent descripció del genoma complet de l'amfiox.^[145] El grup de recerca en genètica dirigit per la Dra. S. Atrian, amb el que mantenim una col·laboració permanent, va identificar *in silico* 2 ORF's diferents, que previsiblement codificaven dos isoformes d'MT, a partir de genoma complet disponible de l'espècie de lancelets de Florida (*B.floridae*). L'estudi de les propietats coordinants d'aquestes proteïnes formen part d'aquesta Tesi Doctoral, **Apartat 3.2.**

1.2.2.2. El sistema d'MTs de la mosca *Drosophila melanogaster*



Com ha quedat àmpliament exemplificat en aquesta introducció, molts organismes presenten polimorfisme d'MT en els seus teixits i és en aquest sentit on la recerca intenta buscar una correlació entre la diferenciació funcional i l'aparició de múltiples formes d'MT.^[125] La base d'aquestes diferències d'especificitat metàl·lica observades podria respondre a una relació estructura/funció, a la seva funció fisiològica i a la diferenciació dels seus patrons evolutius. Moltes vegades, aquest polimorfisme és de difícil interpretació, ja que les diferències d'especificitat metàl·lica observades no sempre tenen una correlació directa amb una funció fisiològica diferenciada. En referència al polimorfisme d'MT i les seves respectives especificitats metàl·liques fisiològiques, dins el fílum animal globalment s'han observat tres situacions diferents i extremadament oposades. El primer cas de polimorfisme, el constitueixen aquells sistemes que tenen diferents isoformes d'MT amb lleugeres diferències en les seves funcions i preferències d'enllaç metàl·lic però que per altra banda, existeixen diferències més marcades en la seva especificitat metàl·lica. Un exemple serien els vertebrats amb les 4 isoformes d'MT de mamífer,^[147] les quals predominantment exhibeixen major habilitat per coordinar ions divalents però que addicionalment, altres isoformes poden presentar una major capacitat per enllaçar ions monovalents com Cu(I) que d'altres. Un segon cas, són aquells sistemes d'MT que mostren preferències metàl·liques completament diferenciades, i per tant, que informen sobre la seva possible funció biològica. Aquest tipus de polimorfisme d'MT és ideal per estudiar la base molecular que determina la selectivitat d'enllaç en els polipèptids d'MT. Dins d'aquest grup es troben aquelles isoformes ben diferenciades i específiques per Cd i Cu i que a la vegada són extremadament similars en la seva seqüència proteica (per exemple el sistema d'MTs dels cargols pulmonats *H.pomatia* i

C. aspersum,^[119] els gens de *Tetrahymena*^[148] i de crustacis^[126]). Finalment, la situació menys freqüent es aquella exhibida per alguns organismes on es possible trobar que totes les isoformes del seu sistema d'MTs tenen un marcat caràcter de Cu-tioneïnes. Aquesta és la situació observada en fongs i llevats,^[149] i excepcionalment, insectes dipteria.^[150] El sistema d'MTs de *Drosophila*, com a model de dipteria, es considera un cas excepcional ja que és l'únic organisme metazoa que sintetitza només Cu-tioneïnes, les quals mostren una extraordinària similitud amb la proteïna paradigmàtica Cup1 (del llevat *S. cerevisiae*), la Cu-tioneïna més extrema descrita fins aleshores. La importància d'aquest polimorfisme ha provocat que hagi estat àmpliament estudiat, tant a nivell genòmic com proteic.

Fins al moment de l'anàlisi seqüencial del genoma de *D. melanogaster* dut a terme pel laboratori del Prof. Schaffner (Universitat de Zürich), el sistema d'MT de *Drosophila* es composava per 4 isoformes d'MT (MtnA, MtnB, MtnC i MtnD).^[151] Recentment una cinquena isoforma d'MT s'ha descobert en el genoma de la *D. melanogaster* (estudi realitzat pel Prof. Schaffner). Aquesta va ser anomenada MtnE i caracteritzada a nivell estructural i d'expressió.^[152] El gen que codifica MtnE, està localitzat dins el clúster de gens anomenats *MtnB-like*, entre *MtnB* i *MtnD*. Es va confirmar la presència d'aquest nou gen *MtnE* (mateixa posició cromosòmica i arquitectura del gen) a les 12 espècies de *Drosophila* on el genoma ha estat completament seqüenciat.^[153]

L'expressió d'*MtnE*, com passa amb els altres gens d'*Mtn*, respon als metalls pesants a través del factor de transcripció de regulació metàl·lica (dMTF-1).^[151] Conseqüentment, MtnE es sintetitza en resposta a ions metàl·lics pesants, fisiològics (zinc i coure) i xenobiòtics (cadmi, mercuri i plata).^[152] El conjunt de dades publicades indiquen clarament que MtnE, de la mateixa manera que les altres MTs de *D. melanogaster*, tindria un possible rol en el metabolisme del coure (des de la ingesta fins a la distribució, emmagatzematge, alliberament i destoxicació en l'organisme) així com a per la tolerància al cadmi (a través del bloqueig de l'assimilació digestiva). En aquest sentit, els estudis realitzats suggereixen que l'MtnE podria actuar complementant la funció de les altres proteïnes d'MT en *Drosophila*, tot i que fins al moment no s'han explorat ni estudiat les preferències metàl·liques d'aquesta nova isoforma.

Les 4 isoformes de *D. melanogaster* estudiades a nivell proteic es poden dividir en dos grups: per una banda MtnA, amb 10 Cys; i per l'altre les anomenades *MtnB-like*, amb 12 Cys, que inclou les isoformes MtnB, MtnC i MtnD. Aquesta divisió, ja observada a nivell genòmic, també es va poder apreciar en estudiar les seves seqüències primàries (**Fig. 11**) i el seu comportament en enllaçar Zn(II), Cd(II) i Cu(I), tant *in vivo* com *in vitro*.^[113]

Es va dur a terme un estudi extensiu, per part d'aquest grup de recerca, de les 4 isoformes d'MT de *Drosophila* mitjançant una mateixa estratègia experimental. Es va poder demostrar com totes 4 presentaven les mateixes propietats en coordinar diferents metalls

pesants, tant pel que fa a l'estequirmetria de les espècies formades, com a les característiques espectroscòpiques dels complexos amb Cd(II) i Cu(I). MtnC i MtnD presenten una menor capacitat per enllaçar cadmi i coure comparades amb MtnA o MtnB, fet que s'atribueix principalment per una inestabilitat intrínseca dels complexos formats.^[113]

```

MtnB  MVCKGCGTNCQCSAQKCGDNCACNKDCQCVCKNGPKDQCCSNK-
MtnC  MVCKGCGTNCCKQDTKCGDNCACNQDCKCVCKNGPKDQCCSK-
MtnD  MGCKACGTNCQCSATKCGDNCACSQQCQSCCKNGPKDKCCSTKN
MtnE  MPCKGCGNNCQCSAGKCGGNCAGNSQCQCAAKTGAK--CCQAK-
MtnA  MPCKP-CGSGCKCASQATKGSNCGSDCKCG---GDKKSAKGCSE
      *  *   ** . . *: *       . . *   . . *: *   *  *   . *   .

```

Fig. 11. Alineament en base a la similitud seqüencial de les diferents isoformes d'MT de la mosca *D.melanogaster* mitjançant l'aplicació CrustalW. En negreta i fons groc s'observen els residus de cisteïna. L'asterisc (*) indica que en aquella posició els residus són 100% idèntics, els dos punts (:) les posicions en les que ha succeït una substitució conservativa i un punt (.) indica substitucions menys conservatives.

Per intentar determinar la possible funció d'MtnE, que té 10 Cys (com MtnA) però que a nivell genòmic s'ha agrupat amb les MtnB-like proteins, en aquesta Tesi Doctoral s'ha dut a terme la caracterització d'aquesta proteïna a través de l'estudi de la seva seqüència d'aminoàcids i les seves habilitats coordinants utilitzant la metodologia habitual en el grup. Aquest estudi pretén aportar informació rellevant sobre la possible funció fisiològica d'MtnE i en la interpretació del polimorfisme existent en les MT de *Drosophila*.

1.3. Disseny experimental

L'estratègia experimental (**Fig. 12**) seguida en aquesta Tesi Doctoral per tal d'estudiar, avaluar i identificar els factors que determinen l'especificitat metàl·lica de les MTs de diversos organismes comença amb la síntesis recombinant d'aquestes proteïnes en cultius d'*E.coli* suplementats amb els ions metàl·lics Cd(II), Zn(II) o Cu(II) per tal d'obtenir les corresponents preparacions metall-MT. Posteriorment, aquestes es purifiquen i s'aïllen eluïdes en tampó Tris-HCl 50 mM a pH 7.0. S'obtenen així el que denominem formes Zn-, Cd- i Cu-MTs obtingudes *in vivo* respectivament, en alta puresa (superior al 95%) i elevada concentració ($\sim 10^{-4}$ M). Cal remarcar que en el cas de les produccions amb Cu(II) aquestes es duen a terme en dos condicions d'oxigenació diferents (**Apartat 5. Procediment experimental i tècniques utilitzades**), ja que ha quedat demostrat, per treballs anteriors d'aquest grup de recerca,^[154] que la quantitat d'oxigen present en el medi de cultiu pot determinar les característiques dels complexos Cu-MT biosintetitzats, i més concretament el seu caràcter homo- o heterometàl·lic.

La síntesi i purificació de totes les metal·lotioneïnes recombinants estudiades en aquest treball ha estat duta a terme pel grup de recerca dirigit per la Dra. Sílvia Atrian, Catedràtica de Genètica de la Universitat de Barcelona.

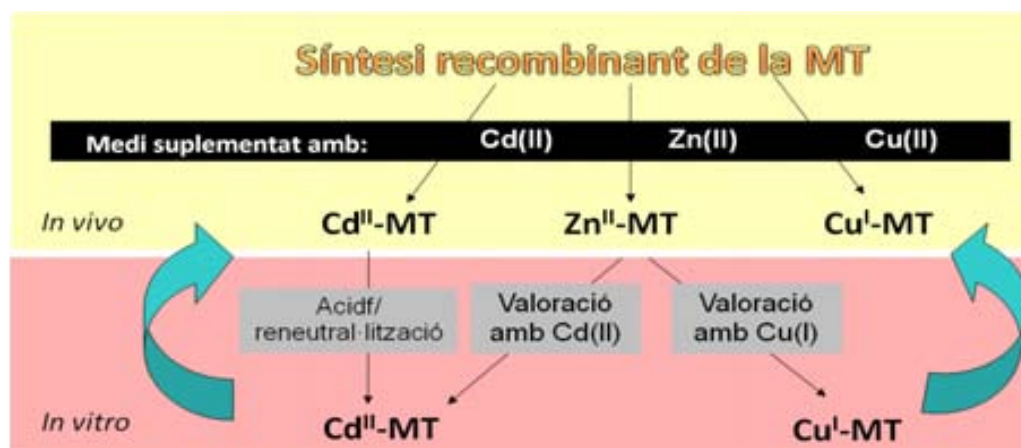


Fig. 12. Esquema representatiu de l'estratègia experimental duta a terme per a l'estudi de les propietats coordinants de les metal·lotioneïnes a partir de la seva síntesi recombinant en medis de cultius suplementats amb diferents ions metàl·lics, concretament, Zn(II), Cd(II) i Cu(II).

Una vegada obtinguts *in vivo* aquests complexos metall-MT es procedeix a la seva caracterització mitjançant diferents tècniques espectroscòpiques i espectromètriques habitualment emprades en l'estudi de proteïnes. El primer pas és comprovar la integritat de la cadena polipeptídica. Mitjançant l'anàlisi per espectrometria de masses a pH àcid (detecció de la forma apo-MT) es possible determinar el seu pes molecular exacte, i per comparació amb el pes teòric, es pot confirmar la identitat de la proteïna. L'anàlisi de les característiques de coordinació metàl·lica de les diferents preparacions d'MTs obtingudes *in vivo* es fa a través de les dades aportades pels següents procediments experimentals i tècniques emprades. A partir dels espectres d'ESI-MS enregistrats a pH 7.0 és possible detectar e identificar els diferents complexos metall-MT presents en solució així com les seves estequiometries metall i MT concretes. Per tal de conèixer la concentració de proteïna i la relació global metall/proteïna es procedeix a la determinació per ICP-AES del sofre total així com dels metalls: zinc, cadmi i coure. Finalment, les tècniques espectroscòpiques de DC i UV-Vis aporten informació sobre el plegament de la proteïna i el tipus de cromòfors existents. Una anàlisi més extensiva de les dades aportades per aquestes tècniques permetrà la confirmació de la presència/absència de lligands sulfur àcid-làbils en les espècies metall-MT detectades a través de la seva detecció per ESI-MS, per l'existència d'una divergència entre els resultats de l'ICP-AES convencional i àcid o per la presència de bandes d'absorció en els espectres de DC i UV-Vis a longituds d'ona superiors a 270-280 nm.

El següent pas en la caracterització de les propietats de coordinació metàl·lica de les MTs estudiades és l'estudi de les propietats coordinants *in vitro*. Així, es realitzen diferents experiments de bescanvi metàl·lic (valoracions) on el Zn(II) inicialment enllaçat en les formes Zn-MT recombinants és desplaçat per Cd(II) o per Cu(I). Addicionalment, es poden dur a terme altres estudis *in vitro* a partir de les preparacions Cd-MT, sotmetent-les a un procés d'acidificació i reneutral·lització (procés de descoordinació i re-coordinació del Cd(II) per estudiar el plegament

dels complexos Cd-MT *in vitro*) i un estudi de l'evolució dels complexos Cd- i CdS-MT biosintetitzats al llarg del temps. Aquest procés de bescanvi metàl·lic o d'acidificació i reneutralització per formar els complexos metall-MT *in vitro* es seguit mitjançant les tècniques de DC, UV-Vis i ESI-MS. L'anàlisi del conjunt de dades experimentals permet identificar i caracteritzar les diferents etapes del desplaçament metàl·lic i les propietats dels complexos formats, i per comparació amb el comportament mostrat *in vivo* aportar informació sobre les preferències metàl·liques de les MTs objecte d'estudi.

Addicionalment, dins el treball realitzat en aquesta Tesi doctoral, s'implementen noves tècniques en l'estudi de certes propietats de les metal·lotioneïnes, com són l'ús de l'ITC (Isothermal Titration Calorimetry) i de la tècnica de separació HPLC acoblada a diferents detectors (**Apartat 5. Procediment experimental i tècniques utilitzades**). La tècnica d'ITC permet determinar els paràmetres termodinàmics (k , ΔH , ΔS i n) associats a una reacció determinada. En el nostre cas, s'estudia el desplaçament metàl·lic Zn^{II}/Cd^{II} en algunes MTs. Finalment, s'aplica la tècnica d'HPLC i l'acoblament d'aquesta a diferents detectors (ESI-MS, UV-Vis i ICP-MS). La finalitat d'utilitzar aquestes tècniques és la de monitoritzar els canvis observats en algunes preparacions en medis rics en Cd(II) amb la particularitat que han donat lloc a la formació de complexos CdS-MT.

2. OBJECTIUS

2. Objectius

Aquesta Tesi Doctoral té com a objectiu principal aprofundir en el coneixement de la relació estructura/funció en les metal·lotioneïnes intentant identificar els factors que determinen l'especificitat metàl·lica de les MTs. Per assolir aquest objectiu global s'han estudiat les habilitats coordinants d'MTs de diferents organismes, cadascuna d'elles amb particularitats molt concretes. Els objectius parcials que han de permetre assolir l'objectiu global són:

1. Estudiar les propietats coordinants de les MTs de diferents mol·luscs enfront de Zn(II), Cd(II) i Cu(I): dels cargols terrestres *Helix pomatia* i *Cornu aspersum*; i del gastròpode marí *Megathura crenulata*.

2. Estudiar el sistema d'MTs recentment descobert en l'organisme *Brianchostoma floridae*, de gran interès en estudis evolutius i del qual no se'n té cap informació prèvia.

3. Caracteritzar les propietats coordinants de la cinquena isoforma d'MT de la mosca *Drosophila melanogaster*, MtnE, enfront de Zn(II), Cd(II) i Cu(I), i comparar-les amb les propietats descrites prèviament per a les altres isoformes.

4. Introduir com a metodologia de treball l'ITC (Isothermal Titration Calorimetry) per tal de determinar els paràmetres termodinàmics associats a la reacció de desplaçament metàl·lic Zn^{II}/Cd^{II} en els complexos Zn-MT biosintetitzats.

5. Aplicar la cromatografia d'HPLC, concretament l'exclusió molecular (SEC), acoblada a diferents detectors (UV-Vis, ICP-MS i ESI-MS) com a metodologia de treball per a monitoritzar i estudiar l'evolució amb el temps que exhibeixen algunes preparacions Cd-MT recombinants.

3. RESULTATS I DISCUSSIÓ

3. Resultats i discussió

En aquesta secció es discuteixen, de forma global i generalitzada, els principals resultats obtinguts en aquesta Tesi Doctoral. Aquests s'han dividit en 5 grans blocs. En els 3 primers es mostren i discuteixen els resultats obtinguts en l'estudi de les propietats coordinants de diferents MTs d'alguns organismes (cargols terrestres, barretet marí, amfiox i mosca) envers els ions Zn(II), Cd(II) i Cu(I), principalment mitjançant tècniques espectroscòpiques (ICP-AES, DC i UV-Vis) i l'espectrometria de masses, seguint la metodologia de treball habitualment emprada en el grup de recerca en el que s'emmarca aquest treball (**Introducció, apartat 1.3 Disseny experimental**). El primer apartat es centra en l'estudi de les MTs de diversos mol·luscs, com els cargols terrestres *Helix pomatia* (**Apartat 3.1.1**) i *Cornu aspersum* (**Apartat 3.1.2**), a més de l'única isoforma d'MT del barretet marí *Megathura crenulata* (**Apartat 3.1.3**). Addicionalment, en l'**apartat 3.1.4** es presenta l'estudi comparatiu de les propietats de totes aquestes MTs de mol·lusc anteriorment estudiades. En els següents apartats s'estudien les propietats coordinants de les metal·lotioneïnes de l'amfiox *Brianchiostoma floridae* (**Apartat 3.2**) i una cinquena isoforma d'MT de la mosca *Drosophila melanogaster* (**Apartat 3.3**). Tots aquests treballs han donat lloc a la publicació de 7 articles científics, inclosos en l'Annex d'aquesta Tesi (**Apartat 7.2**).

En els Blocs 4 i 5 s'analitza el procés d'implementació de dues noves metodologies per ampliar l'estudi de determinades característiques de les MTs, dut a terme i formant part d'aquest treball de Tesi. Així, en l'**apartat 3.4**, seguint amb la caracterització de les propietats coordinants de diverses isoformes d'MT, es presenten els resultats obtinguts en la determinació dels paràmetres termodinàmics associats al procés de bescanvi metàl·lic de Zn(II) per Cd(II) en diverses MT mitjançant la tècnica calorimètrica d'ITC (Isothermal Titration Calorimetry). Per altra banda, en l'**apartat 3.5** es recullen i discuteixen els principals resultats obtinguts en l'estudi de l'evolució amb els temps de diverses mostres d'MT (diferents isoformes d'MT de diversos organismes), que van mostrar la presència de lligands sufurs addicionals en les seves preparacions recombinants obtingudes en medis rics en Cd(II), mitjançant l'ús de cromatografia líquida (la tècnica d'HPLC) acoblada a diferents sistemes de detecció.

En tots els casos, les proteïnes estudiades han estat sintetitzades mitjançant la tècnica d'enginyeria genètica pel grup de recerca dirigit per la Dra. Sílvia Atrian, Catedràtica del Departament de Genètica de la Facultat de Biologia de la Universitat de Barcelona (**Introducció, apartat 1.1.4. Mètodes d'obtenció i 5. Procediment experimental i tècniques utilitzades**).

3.1. Estudi del sistema d'MTs de diversos mol·luscs

3.1. Estudi del sistema d'MTs de diversos mol·luscs

3.1.1. Estudi de la capacitat coordinant de les diferents isoformes d'MT del gastròpode terrestre *Helix pomatia*: HpCdMT i HpCuMT

El cargol terrestre *Helix pomatia* sintetitza dues isoformes d'MT clarament diferenciades: HpCdMT i HpCuMT (**Introducció, Apartat 1.2.1.1**). A continuació es detallen els resultats obtinguts en la seva caracterització, tant *in vivo* com *in vitro*. Al llarg del text es farà referència a l'**Annex 7.1.1** on es recopila informació extra (espectres de DC, UV-Vis i ESI-MS) enregistrada durant els experiments *in vitro* duts a terme amb aquestes proteïnes.

3.1.1.1. Comportament de HpCdMT envers Zn(II) i Cd(II)

Per tal d'obtenir informació sobre les propietats coordinants en medi fisiològic d'aquesta isoforma d'MT d'*H.pomatia*, HpCdMT, envers els ions metàl·lics divalents es va realitzar la seva biosíntesi en medis enriquits en zinc i cadmi. D'acord amb el conjunt de dades d'ESI-MS obtingudes en la **Fig. 13A i B**, en tots dos casos s'obté una única espècie d'estequiometria M_6 -MT (on M correspon a Zn(II) o Cd(II)).

Els dos complexos metàl·lics obtinguts *in vivo*, Zn_6 -HpCdMT i Cd_6 -HpCdMT, presenten uns espectres de DC intensos i ben definits amb absorcions de DC esperades (**Fig. 13C i D**). En tots dos casos, aquestes corresponen a cromòfors de geometria de coordinació tetraèdrica $M-(S_{Cys})_4$, la primera ($M = Zn(II)$) en forma de banda gaussiana a *ca.* 240 nm i la segona ($M = Cd(II)$) centrada a 250 nm en forma d'*exciton coupling*.

Cal destacar que el fet que l'espècie Cd_6 -HpCdMT biosintetitzada sigui anàloga a la prèviament aïllada de teixits de cargols *H.pomatia* exposats a quantitats tòxiques de Cd,^[155] demostra la capacitat que té aquesta proteïna per formar la citada espècie en diferents entorns cel·lulars.

També s'han realitzat estudis de bescanvi Zn^{II}/Cd^{II} *in vitro* en HpCdMT (**Annex 7.1.1., làmina 7.1.1.1**). Aquests han mostrat que la formació del complex Cd_6 -HpCdMT té lloc per a 6 eq de Cd(II) afegits a Zn_6 -HpCdMT (**Fig. 14A**). Aquesta espècie formada, estable també en presència d'un excés de Cd(II), mostra unes característiques espectroscòpiques equivalents tant a les de l'espècie obtinguda per síntesi recombinant, *in vivo*, com a les de l'aïllada de forma nativa de l'organisme. Així, es posa de manifest una vegada més, la gran preferència d'aquesta proteïna per Cd(II) i l'elevada estabilitat de l'espècie Cd_6 -HpCdMT (**Fig. 14B**). Els espectres de masses enregistrats en diferents punts de la valoració indiquen que es tracta d'un desplaçament equivalent a equivalent (la coordinació d'un Cd(II) provoca el desplaçament d'un Zn(II)), a través de la formació de diferents complexos Zn_xCd_y -HpCdMT, on $x+y=6$, i que coexisteixen fins a la

formació d'una única espècie $\text{Cd}_6\text{-HpCdMT}$. Aquest tipus de bescanvi metàl·lic ha estat prèviament descrit per la coordinació de Cd(II) en d'altres MTs, com és el cas de l'espècie $\text{Zn}_7\text{-MT1}$ de mamífer.^[156] Addicions posteriors de Cd(II) provoquen petits canvis estructurals en el complex $\text{Cd}_6\text{-HpCdMT}$, en base a la variació dels espectres de DC, però no s'observa la coordinació de més ions Cd(II) . Tal i com mostren els espectres d'ESI-MS enregistrats en presència d'un excés important de Cd(II) , com per exemple per a 10 eq de Cd(II) , es generen espectres completament equivalents als enregistrats per a 6 eq (**Annex 7.1.1, Taula 1**). Un altre fet remarcable, que indica un cop més la rellevància d'aquesta espècie $\text{Cd}_6\text{-HpCdMT}$, és la formació del mateix tipus d'agregat, amb propietats espectroscòpiques pràcticament inalterades (**Fig. 14B**), després de la seva acidificació fins a pH 1.0 i posterior reconstitució a pH neutre (**Annex 7.1.1., làmina 7.1.1.2**).

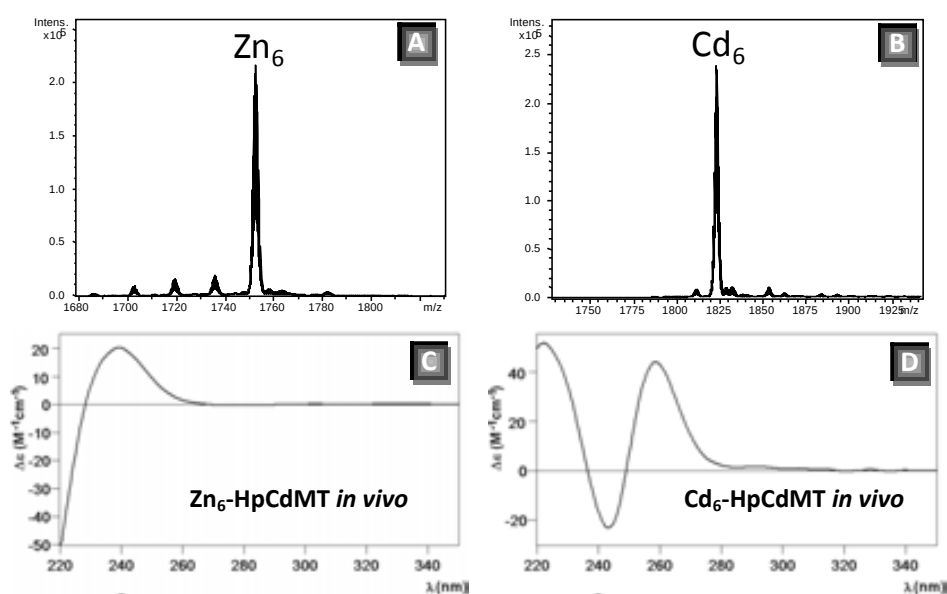


Fig. 13. Espectres de (A) ESI-MS i (C) DC corresponents a l'espècie $\text{Zn}_6\text{-HpCdMT in vivo}$. Les dades d'ICP-AES, amb una relació de Zn/MT de 5.8, confirmen el contingut metàl·lic observat per ESI-MS. Espectres de (B) ESI-MS i (D) DC de l'espècie $\text{Cd}_6\text{-HpCdMT}$ obtinguda de la preparació recombinant de HpCdMT en medis rics en Cd(II) . Les dades d'ICP-AES, amb una relació de Cd/MT de 6.2, confirmen el contingut metàl·lic observat per ESI-MS.

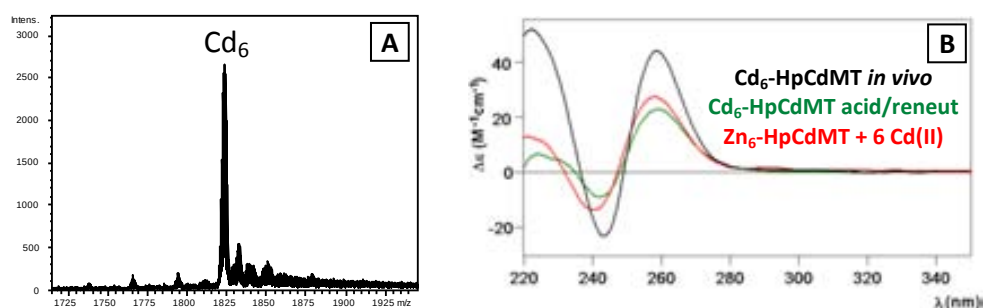


Fig. 14. (A) Espectre d'ESI-MS enregistrat després d'addicionar 6 eq de Cd(II) a una solució de $\text{Zn}_6\text{-HpCdMT}$. (B) Espectre de DC de l'espècie $\text{Cd}_6\text{-HpCdMT}$ biosintetitzada (negre), l'espectre resultant del procés d'acidificació i posterior reneutralització de la solució anterior (verd) i el corresponent a l'espècie $\text{Cd}_6\text{-HpCdMT}$ formada en addicionar 6 eq de Cd(II) a la solució de $\text{Zn}_6\text{-HpCdMT}$ (vermell).

Totes aquestes dades indiquen que el comportament de la isoforma HpCdMT és comparable a les MTs òptimes per enllaçar Cd(II) (**Apartat 3.1.4.**) més que no pas Zn(II).^[72] Aquesta observació és particular i contrasta amb altres MTs amb un caràcter de major preferència per zinc com la isoforma MeMT del músculo *M. edulis*.^[157] Així, tant *in vivo* com *in vitro*, la proteïna HpCdMT enllaça Cd(II) formant un complex especialment estable, suggerint clarament una possible participació d'aquesta proteïna en la protecció dels teixits de l'organisme enfront d'aquest metall extremadament tòxic.

3.1.1.2. Comportament de HpCdMT envers Cu(I)

La síntesi recombinant de la isoforma HpCdMT en medis rics en Cu(II) es va realitzar sota dues condicions d'oxigenació diferents (**1.3. Disseny experimental**), donat que en treballs anteriors es va demostrar com el grau d'oxigenació dels cultius d'*E.coli* és rellevant i afecta el contingut de Cu(I) dins la cèl·lula i, en certes ocasions, als complexos Cu-MT formats.^[158] Ambdós tipus de preparacions estan composades per una mescla de complexos heterometàl·lics Cu_xZn_y -HpCdMT (**Fig. 15**), amb una relació Zn^{II}/Cu^I que sembla dependre del grau d'oxigenació del cultiu (**Taula 3**). En els cultius a baixa oxigenació, els espectres d'ESI-MS revelen que l'estequiometria de les espècies majoritàries varia des de M_8 - a M_{12} -HpCdMT (**Fig. 15B**). En cultius a oxigenació normal s'obtenen complexos d'estequiometries més baixes dins el rang M_4 - a M_7 -HpCdMT (on $M=Zn+Cu$) (**Fig. 15A**). Les bioproduccions donen lloc a senyals de DC similars (**Fig. 16**) en forma i intensitat. Tot i així, l'empremta de DC de la producció a oxigenació normal presenta bandes menys definides i més amples en la regió de 230-270 nm que les corresponents als cultius a baixa oxigenació, fet atribuïble a una major proporció d'ions Zn(II) en el primer tipus de preparació. Aquest contingut en Zn(II) es confirma a partir dels espectres d'ESI-MS enregistrats a pH 2.4 (**Fig. 15C i D**) on, per una banda la preparació a nivells d'oxigenació normal, que a pH neutre conté com a espècie majoritària la M_5 -HpCdMT (heterometàl·lica), a pH àcid dóna lloc bàsicament a una barreja de Cu_4 - i apo-HpCdMT, indicant així la presència d'una certa quantitat d'agregats homometàl·lics de Zn. Mentre que per l'altra, en el cas dels cultius a baixa oxigenació, l'espectre d'ESI-MS a pH àcid (**Fig. 15D**) mostra pràcticament la mateixa especiació que a pH neutre però amb abundàncies relatives lleugerament diferents que, en concordança amb les dades d'ICP-AES (**Taula 3**), correspondria a una mescla de complexos homometàl·lics de Cu(I) i alguns altres heterometàl·lics de tipus Cu_xZn_y -HpCdMT amb un contingut molt baix en Zn(II).

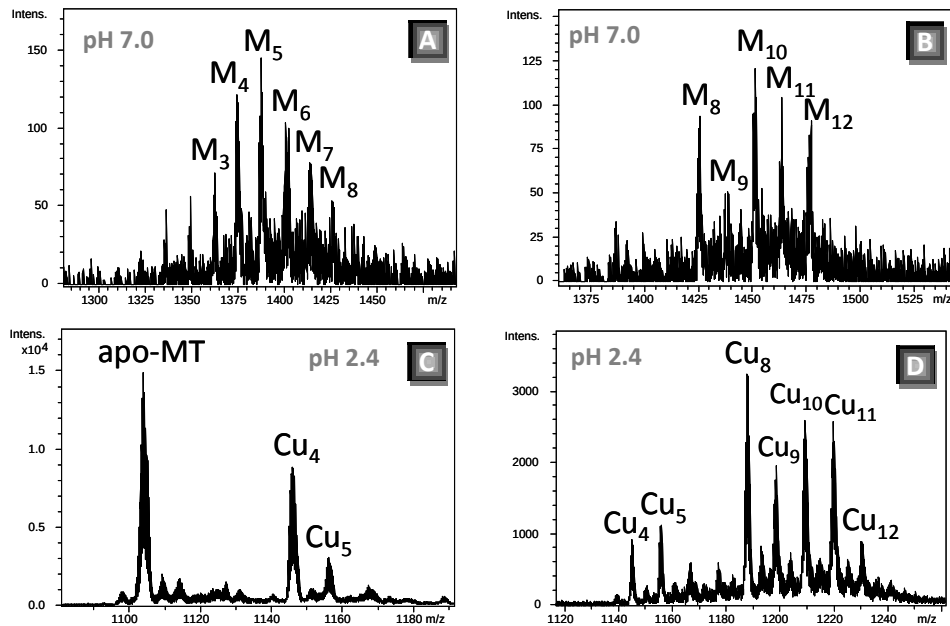


Fig. 15. Espectres d'ESI-MS enregistrats a pH 7.0 (A) i pH 2.4 (C) corresponents a la biosíntesi de HpCdMT en medis de cultiu rics en Cu(II) en condicions d'oxigenació normal. Espectres d'ESI-MS enregistrats a pH 7.0 (B) i pH 2.4 (D) corresponents a la biosíntesi de HpCuMT en medis de cultiu rics en Cu(II) sota condicions de baixa oxigenació.

Cu-HpCdMT			
		Oxigenació normal	Baixa oxigenació
ICP _{conv}	[prot] (M)	1.12x10 ⁻⁴	0.58x10 ⁻⁴
	Zn/MT	2.4	0.8
	Cu/MT	1.8	7.7

Taula 3. Resultats d'ICP-AES de les preparacions de HpCdMT obtingudes en medis rics en Cu(II) sota dues condicions d'oxigenació, normal i baixa. En aquesta taula es mostren només els resultats corresponents a l'ICP-AES convencional ja que no presenta diferència significativa amb els resultats obtinguts en condicions àcides.

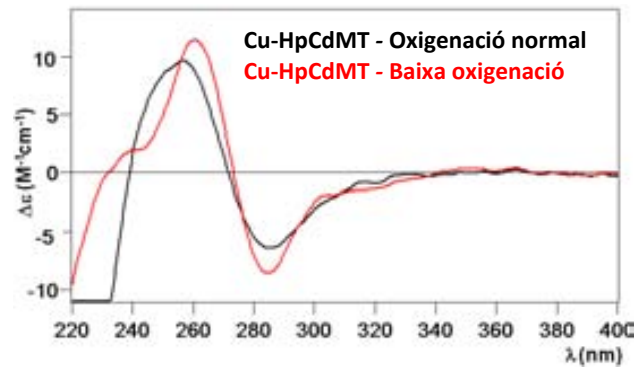


Fig. 16. Espectres de DC corresponents a les preparacions recombinants de HpCdMT en medis enriquits amb Cu(II) en condicions d'oxigenació normal (negre) i a baixa oxigenació (vermell).

De manera anàloga a l'experiment *in vitro* realitzat amb Cd(II), es va dur a terme la valoració de l'espècie Zn₆-HpCdMT amb Cu(I). Els resultats obtinguts (**Annex 7.1.1.**, **Làmina 7.1.1.3**) permeten observar que *in vitro* es reproduïx l'espectre de DC i l'especiació de la preparació obtinguda *in vivo* a baixa oxigenació (**Fig. 17D, E i F**). Contràriament, no ha estat possible reproduir completament els resultats obtinguts en el cas de la bioproducció a

oxigenació normal (espectres de DC i ESI-MS lleugerament diferents) (**Fig. 17A, B i C**). El desplaçament $\text{Zn}^{II}/\text{Cu}^I$ provoca un increment gradual de l'absorció centrada a 260 nm en els espectres d'UV-Vis, fins als 16 eq de Cu(I) agregats. A partir dels espectres de DC s'observa l'evolució dels senyals en un procés no cooperatiu, amb l'absència de punt isodicroic. Finalment, les dades d'ESI-MS recollides cada 2 eq de Cu(I) afegits a $\text{Zn}_6\text{-HpCdMT}$ i enregistrats a dos valors de pH, 7.0 i 2.4, indiquen que es necessiten 16 eq de Cu(I) per desplaçar tot el Zn(II) inicialment enllaçat a la proteïna. És en aquest punt de la valoració on l'especiació (nombre d'espècies, estequiometria i intensitat relativa dels pics d'ESI-MS) és idèntica per a tots dos valors de pH.

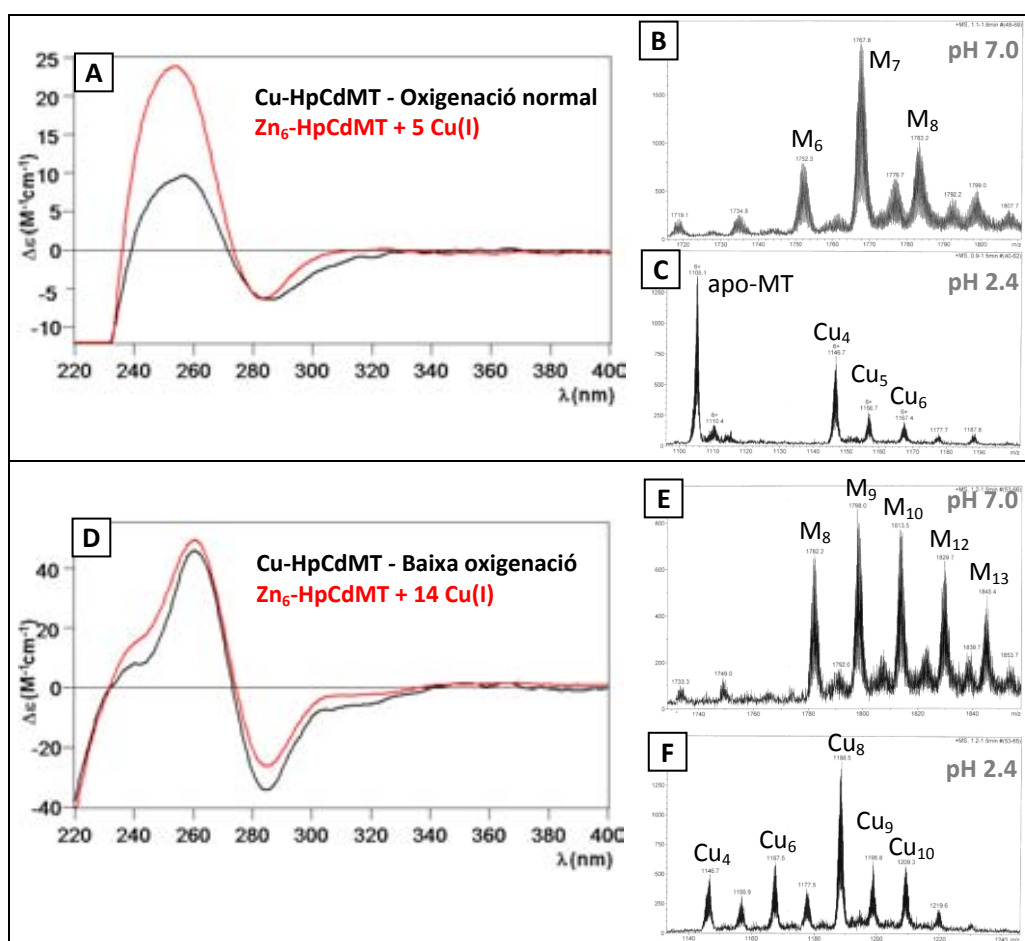


Fig. 17. (A) Espectres de DC corresponents a la biosíntesi de HpCdMT en medis de cultius rics en Cu(II) en condicions d'oxigenació normal (negre), i l'enregistrat després d'afegir 5 eq de Cu(I) a $\text{Zn}_6\text{-HpCdMT}$. Espectres d'ESI-MS enregistrats a pH 7.0 (B) i pH 2.4 (C) corresponents a la valoració de l'espècie $\text{Zn}_6\text{-HpCdMT}$ després d'afegir 4 eq de Cu(I). (D) Espectres de DC corresponents a la biosíntesi de HpCdMT en medis de cultiu rics en Cu(II) en condicions de baixa oxigenació (negre, multiplicat per 4), i l'enregistrat a la valoració de $\text{Zn}_6\text{-HpCdMT}$ *in vivo* en afegir 14 eq de Cu(I) (vermell). Espectres d'ESI-MS enregistrats a pH 7.0 (E) i 2.4 (F) corresponents a la valoració del complex $\text{Zn}_6\text{-HpCdMT}$ *in vivo* obtingut de forma recombinant després d'addicionar 10 eq de Cu(I).

En estadis inicials de la valoració s'enregistra un espectre de DC similar, però menys intens en la regió de 260 nm (**Fig. 17A**), i una especiació a pH 2.4 (**Fig. 17B**) propera a l'obtinguda en la preparació a oxigenació normal de Cu-HpCdMT. Per altra banda, és possible reproduir perfectament l'espectre de DC enregistrat en les bioproduccions de Cu-HpCdMT a baixa oxigenació (**Fig. 17D**) per a 14 eq de Cu(I) afegits a l'espècie $\text{Zn}_6\text{-HpCdMT}$. Finalment, per 10 eq

de Cu(I) afegits s'observa una especiació amb una barreja d'espècies homo i heteronuclears, Zn- i Zn,Cu-HpCdMT (**Fig. 17E i F**) semblant a les obtingudes *in vivo* a baixa oxigenació però amb diferents abundàncies relatives. D'aquesta manera, els resultats obtinguts evidencien la dificultat de desplaçar el Zn(II) pel Cu(I) en l'espècie inicial Zn₆-HpCdMT.

El conjunt de dades permet afirmar l'existència d'una preferència de la isoforma HpCdMT pels metalls divalents Zn(II) i Cd(II) i, a la vegada, la seva baixa preferència per Cu(I).

3.1.1.3. Comportament de HpCuMT envers Zn(II) i Cd(II)

A continuació es presenten els resultats obtinguts en la caracterització dels complexos Zn- i Cd-HpCuMT obtinguts *in vivo*, de forma recombinant, i els complexos Cd-HpCuMT constituïts *in vitro*, mitjançant experiments similars als descrits per HpCdMT.

Les múltiples síntesis de la isoforma HpCuMT en medis rics en Zn(II) donen lloc a tres tipus de preparacions Zn-HpCuMT. Totes elles presenten pràcticament el mateix espectre de DC (**Fig. 18**), amb una banda poc intensa *ca.* 240 nm. Tot i això, els tres tipus de produccions difereixen en l'especiació, detectant-se complexos amb estequiometries que varien de Zn₃- a Zn₇-HpCuMT, i també en l'abundància relativa de cada espècie en la mescla. Addicionalment, cal remarcar que en tots tres tipus de producció s'observa una divergència entre el valor obtingut de la quantificació de la proteïna per ICP-AES normal o àcid, en major o menor quantitat segons la preparació, indicant la presència de lligands sulfur extres.

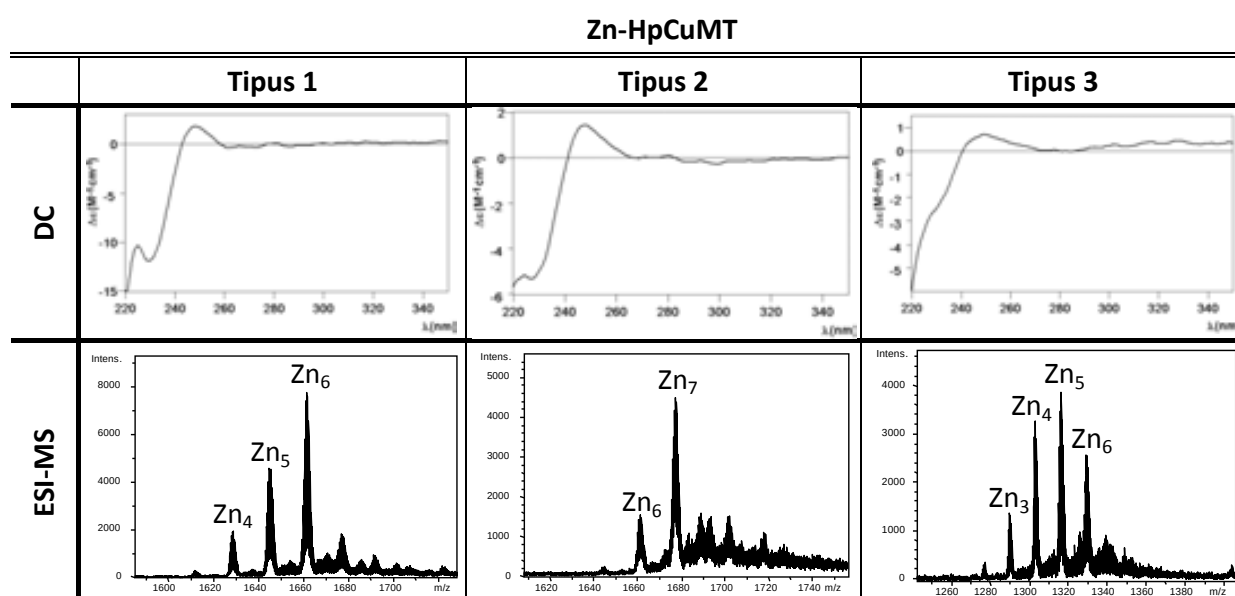


Fig. 18. Espectres de DC i d'ESI-MS corresponents als 3 tipus de produccions obtingudes de la síntesi recombinant de HpCuMT en medis de cultiu suplementats amb Zn(II).

Zn-HpCuMT

	Tipus 1		Tipus 2		Tipus 3	
ICP-AES	Normal	Àcid	Normal	Àcid	Normal	Àcid
[prot] (M)	1.35×10^{-4}	1.26×10^{-4}	1.32×10^{-4}	0.81×10^{-4}	0.61×10^{-4}	0.49×10^{-4}
Zn/MT	5.0	5.0	4.8	7.5	4.0	4.1
Cd/MT	<L.D.	<L.D.	<L.D.	<L.D.	<L.D.	<L.D.

Taula 4. Resultats d'ICP-AES corresponents als 3 tipus de produccions obtingudes de la síntesi recombinant de HpCuMT en medis de cultiu suplementats amb Zn(II). Les sigles <L.D. indiquen valors per sota del límit de detecció.

Anàlogament al que succeeix amb Zn(II), la biosíntesi de HpCuMT en medis rics en Cd(II) també ha donat lloc a tres tipus de preparacions (**Taula 5** i **Fig. 19**). Un tret comú en totes elles és la coexistència de diferents complexos Cd-HpCuMT amb un contingut en cadmi que va de 6 fins a 9 Cd(II) per proteïna. A més, en totes elles, es van detectar espècies $\text{Cd}_x\text{S-HpCuMT}$ que contenen sulfurs com a lligands addicionals, en bona concordança amb les diferències de concentració de proteïna observades per ICP normal i àcid, i que posen de manifest les dificultats d'aquesta isoforma per formar complexos Cd-MT estables. Les propietats espectropolarimètriques dels tres tipus de produccions mostren una absorció de forma gaussiana *ca.* 250 nm característica dels cromòfors Cd-SCys per les preparacions de tipus 1 i 2, i en forma d'*exciton coupling* per al tercer tipus. Presenten, a més, un senyal positiu per sobre dels 270 nm associat a la presència de lligands sulfur enllaçant Cd. El fet que aquest senyal sigui més intens en el cas de les preparacions de tipus 3 (**Fig. 19**) està en concordança amb un contingut significativament major de l'espècie $\text{Cd}_9\text{S-HpCuMT}$ en solució (**Taula 5**).

Cd-HpCuMT

	Tipus 1		Tipus 2		Tipus 3	
ICP-AES	Normal	Àcid	Normal	Àcid	Normal	Àcid
[prot] (M)	3.09×10^{-4}	1.90×10^{-4}	2.40×10^{-4}	0.93×10^{-4}	0.76×10^{-4}	0.45×10^{-4}
Zn/MT	<L.D.	<L.D.	<L.D.	<L.D.	<L.D.	<L.D.
Cd/MT	3.9	7.1	3.1	7.8	4.9	8.2

Taula 5. Resultats d'ICP-AES corresponents a les produccions de HpCuMT biosintetitzades en medis rics en Cd(II). Les sigles <L.D. indiquen valors per sota del límit de detecció.

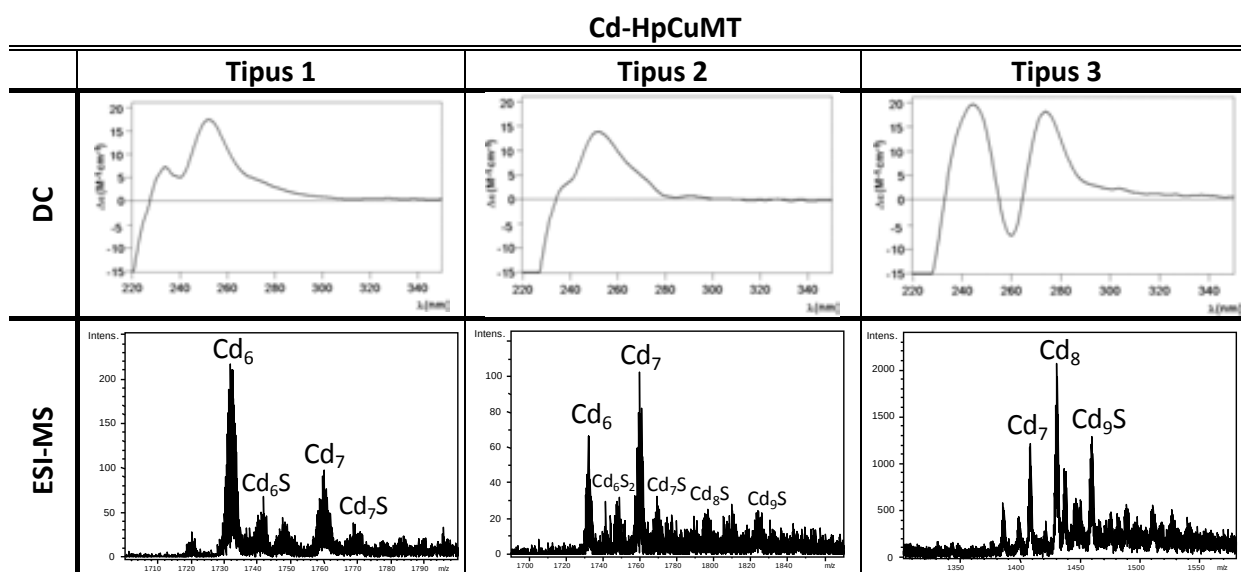


Fig. 19. Espectres de DC i ESI-MS corresponents als 3 tipus de produccions obtinguts de la síntesi recombinant de HpCuMT en medis de cultiu suplementats amb Cd(II).

A diferència del que succeeix en el cas de la síntesi de la isoforma HpCdMT en medis rics en metalls divalents (Zn(II) i Cd(II)), on només s'obté una única espècie, les preparacions de HpCuMT en medis rics en aquests metalls sempre donen lloc a una mescla d'espècies. Aquest fet, sumat a la presència d'un important contingut en espècies Cd_xS_y -HpCuMT (propietat característica de les proteïnes amb marcat caràcter de Cu-tioneïna), indica per tant, una baixa preferència *in vivo* de la proteïna (HpCuMT) pels metalls divalents Zn i Cd.

Es van dur a terme un conjunt d'experiments *in vitro*, tant a partir de les bioproduccions Zn-HpCuMT pel desplaçament del Zn(II) inicialment enllaçat per Cd(II) (**Annex 7.1.1., Làmina 7.1.1.4**), com l'estudi de l'estabilitat a partir de les produccions dels complexos Cd-HpCuMT mitjançant experiments d'acidificació i reneutralització (**Annex 7.1.1., Làmina 7.1.1.5**). En el cas concret dels experiments de desplaçament metàl·lic, i tot i que en tots els casos es partia d'una situació inicial amb mescla d'espècies, l'addició seqüencial de Cd(II) a qualsevol de les 3 produccions Zn-HpCuMT va permetre reproduir, en diferents punts de la valoració, la majoria d'espècies identificades en les diferents bioproduccions Cd-HpCuMT (**Fig. 20**). Es va aconseguir reproduir l'especiació i la distribució de les espècies Cd-HpCuMT obtingudes *in vivo*, però en canvi, no va ser possible observar la formació d'aquelles espècies que contenen sulfurs com a lligands addicionals, Cd_xS_y -HpCuMT. Probablement, la quantitat de sulfur present en les produccions en medis rics en Zn(II) és molt baixa, i per tant, no n'hi ha prou per reproduir les espècies sulfurades amb Cd(II) (**Fig. 20**). En canvi, en cap cas va ser possible enregistrar un espectre de DC similar al de les bioproduccions Cd-HpCuMT. És rellevant indicar com en tots els casos, l'addició de Cd(II) a qualsevol de les preparacions Zn-HpCuMT dóna lloc a una mescla d'espècies amb uns espectres de DC diferents i menys intensos i definits que els respectius dels agregats Cd-HpCuMT *in vivo*. Per tant, és aquest fenomen indicatiu d'un plegament de les

espècies Cd-MT *in vitro* diferent i probablement menys eficient que en l'entorn cel·lular, reforçant així la idea de la baixa afinitat d'aquesta isoforma per l'ió Cd(II).

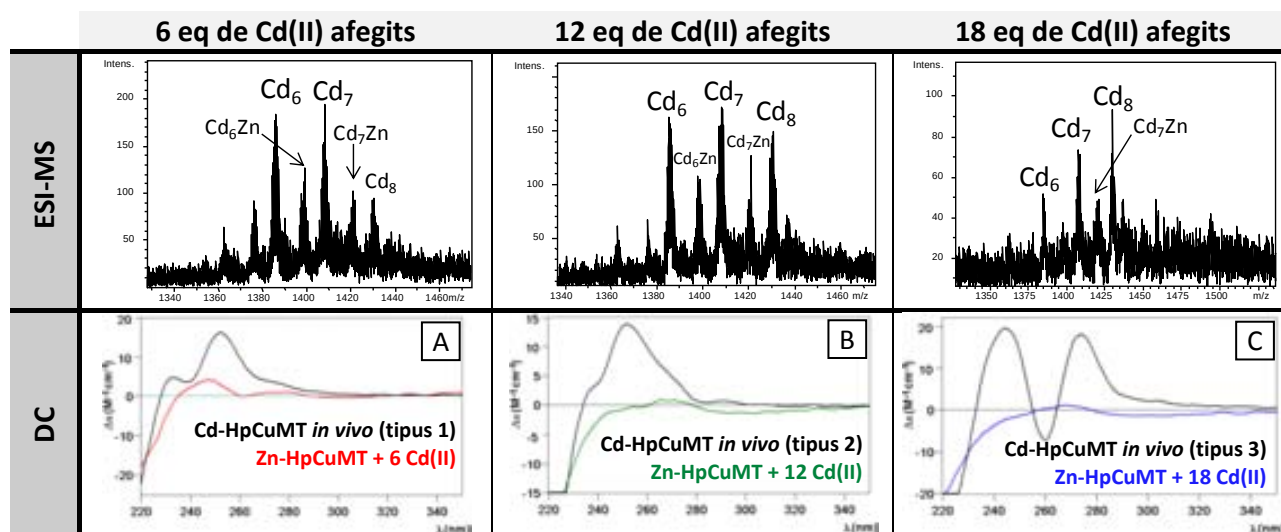


Fig. 20. Espectres de DC i ESI-MS corresponents a la valoració de la bioproducció de Zn-HpCuMT de tipus 1 amb Cd(II) després d'afegir 6 (vermell), 12 (verd) i 18 (blau) eq. Els espectres de DC de color negre corresponen a les produccions de **A**: tipus 1, **B**: tipus 2 i **C**: tipus 3 de la Cd-HpCuMT.

Per últim, per tal d'avaluar l'estabilitat dels complexos Cd- i Cd_xS_y-HpCuMT *in vivo* formats, es van dur a terme experiments d'acidificació i posterior reneutralització (**Annex 7.1.1., Làmina 7.1.1.5**) de les diferents preparacions obtingudes, així com també l'estudi de la seva evolució amb el temps. Els experiments d'estabilitat de la mostra de Cd-HpCuMT al llarg del temps es presenten de forma més extensa en el **Apartat 3.5** d'aquesta Tesi Doctoral. Cal recordar que els canvis en l'especiació i el plegament de les preparacions Cd-MT al llarg del temps, observat en aquestes tres bioproduccions, és un tret característic de les proteïnes que, com en el cas de HpCuMT, mostren una gran afinitat per enllaçar Cu(I).

L'acidificació de qualsevol de les 3 preparacions Cd-HpCuMT obtingudes fins a un valor de pH inferior a 1.0, de manera que s'aconsegueix protonar totalment les cisteïnes de la proteïna i que descoordini el Cd(II) inicialment enllaçat així com l'eliminació dels lligands sulfurs àcid/làbils en forma de H₂S,^[88] dona lloc en tots 3 casos a un espectre de DC resultant pràcticament idèntic. Aquesta empremta de DC obtinguda és homòloga a l'enregistrada per 8 eq de Cd(II) afegits a Zn-HpCuMT (**Fig. 21A**). L'especiació final és també propera a l'obtinguda tant en les preparacions recombinants de Cd-HpCuMT com en les valoracions, tot i que, d'igual manera que en les valoracions amb Cd(II), no aconsegueixen formar els complexos de Cd_xS_y-MT inicials (**Fig. 21B**), ni tan sols després d'afegir 3 eq de lligands S²⁻ a la mostra reneutralitzada. Tots aquests resultats indiquen la importància del medi fisiològic per a la formació d'aquests agregats Cd_xS_y-HpCuMT i la gran dificultat d'obtenir-los *in vitro*.

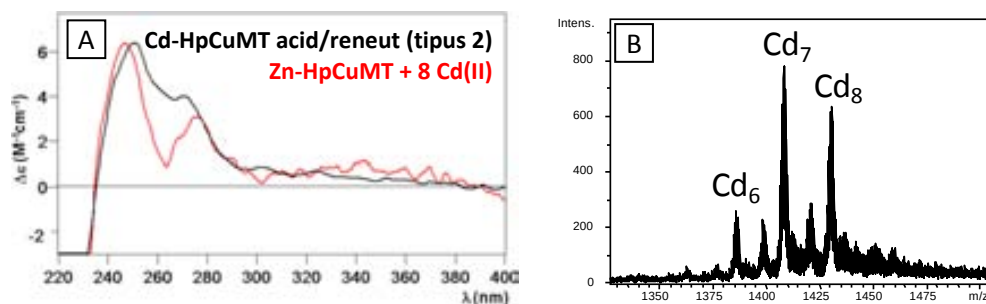


Fig. 21. (A) Espectre de DC resultat del procés d'acidificació i posterior reneutralització de la preparació de Cd-HpCuMT de tipus 2 (negre) i el corresponent després d'afegir 8 eq de Cd(II) en la valoració de Zn-HpCuMT (vermell). (B) Espectre d'ESI-MS obtingut en l'experiment *in vitro* d'acidificació i reneutralització de la producció de tipus 2 de la proteïna HpCuMT obtinguda en medis de cultiu rics en Cd(II).

Tots els resultats obtinguts van en la mateixa direcció, indicant una baixa preferència de la proteïna HpCuMT per enllaçar Cd(II), tant *in vivo* com *in vitro*, ja que no s'observa la formació de cap espècie Cd-HpCuMT preferent. D'aquesta manera, la proteïna HpCuMT actua simplement com a lligand multidentat que respon al increment de Cd(II) en el medi en ambdues condicions, *in vivo* i *in vitro*.

3.1.1.4. Comportament de HpCuMT envers Cu(I)

D'igual manera que en el cas de la biosíntesi de la isoforma HpCdMT, la síntesi de HpCuMT en medis de cultius rics en Cu(II) es va dur a terme sota dues condicions d'oxigenació diferents, normal i baixa, per tal d'observar la relació entre el contingut en Cu(I) intracel·lular i els agregats Cu-MT biosintetitzats.

En la biosíntesi de HpCuMT en medis rics en Cu(II) a oxigenació normal es va identificar, per ESI-MS, una mescla d'espècies estequiometries que varien de M_4 - a M_{12} -HpCuMT (on $M = Zn + Cu$) (**Fig. 22A**). Aquestes corresponen, segons les dades d'ICP-AES (**Taula 5**) i l'espectre d'ESI-MS enregistrat a pH 2.4 (**Fig. 22C**), a espècies heterometàl·liques Cu,Zn -HpCuMT i en menor proporció homometàl·liques de Zn(II) (detecció de la apo-MT). La preparació d'aquesta proteïna en medis enriquits amb Cu(II) i en condicions de baixa oxigenació permet observar un comportament molt diferent. S'obté essencialment una única espècie, Cu_{12} -HpCuMT (**Fig. 22B**) (en concordança amb els resultats obtinguts per la tècnica d'ICP-AES (**Taula 6**)), equivalent a l'espècie nativa aïllada del cargol terrestre *H. Pomatia*. L'anàlisi per ESI-MS a pH àcid (**Fig. 22D**) d'aquesta bioproducció mostra l'espècie Cu_{10} -HpCuMT com a majoritària, també observada en la preparació nativa, indicatiu de la labilitat de dos dels ions Cu(I) coordinats a la proteïna *in vivo*, la qual cosa facilita la seva degradació un cop purificada (**Annex 7.2., Article 1**).

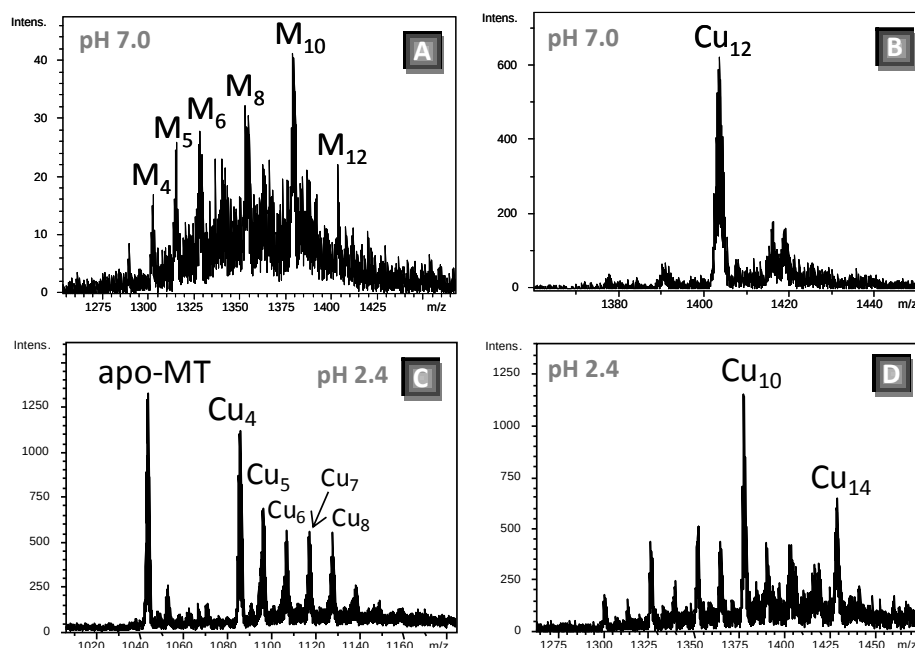


Fig. 22. Espectres d'ESI-MS corresponents a les preparacions recombinants de Cu-HpCuMT en condicions d'oxigenació normal a (A) pH 7.0 i a (C) pH 2.4, en condicions de baixa oxigenació a (B) pH 7.0 i a (D) pH 2.4

Cu-HpCuMT

		Oxigenació normal	Baixa oxigenació
ICP _{conv}	[prot] (M)	0.80×10^{-4}	0.57×10^{-4}
	Zn/MT	2.8	<L.D.
	Cu/MT	3.1	12.2

Taula 6. Resultats d'ICP-AES de la caracterització de les produccions de HpCuMT per enginyeria genètica en medis rics en Cu(II) en ambdues condicions d'oxigenació, normal i baixa. Les sigles <L.D. indiquen valors per sota del límit de detecció.

Finalment, pel que fa al replegament d'aquests complexos en medis fisiològics, en comparar els espectres de DC (**Fig. 23**) enregistrats per a les dues bioproduccions s'observa una empremta de DC amb unes bandes molt més intenses i definides per la producció a baixa oxigenació. Aquesta observació és coherent amb la presència de l'espècie única Cu₁₂-HpCuMT amb un elevat grau d'estructuració. En canvi, l'empremta enregistrada per la producció de Cu-HpCuMT a oxigenació normal, si bé mostra un espectre de DC amb una certa similitud al de la producció a baixa oxigenació, l'espectre és molt menys intens i definit, i a més a més, manquen les absorpcions a 230 nm i per sobre de 300 nm. Un espectre de DC amb aquestes particularitats s'explica i és conseqüència directa d'una preparació amb la presència d'un gran nombre d'espècies heterometal·liques de baixa estructuració.

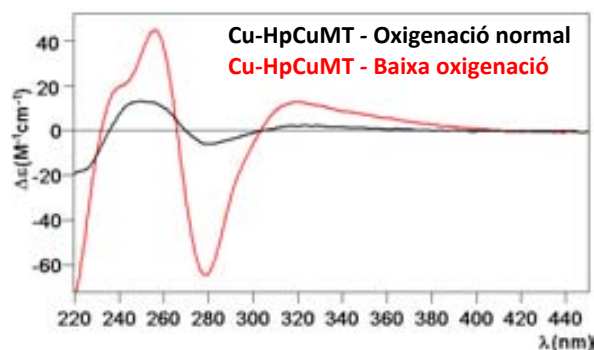


Fig. 23. Espectres de DC corresponents a les preparacions recombinants Cu-HpCuMT en condicions d'oxigenació normal (negre) i a baixa oxigenació (vermell).

També es van realitzar diversos experiments *in vitro*, consistents en valorar amb Cu(I) tant les diferents preparacions Zn-HpCuMT (**Annex 7.1.1., Làmina 7.1.1.6**) com de la preparació Cu-HpCuMT obtinguda en condicions d'oxigenació normal (**Annex 7.1.1., Làmina 7.1.1.7**), la qual té un important contingut en Zn(II). En cap d'aquests experiments no ha estat possible reproduir l'espècie Cu₁₂-HpCuMT formada *in vivo*. La valoració de les diferents bioproduccions de Zn-HpCuMT, encara que presenten una situació inicial diferent, exhibeixen en diverses etapes de les valoracions, espectres de DC comparables que corresponen sempre a una mescla d'espècies heterometàl·liques Zn,Cu-HpCuMT. Si bé en els punts finals de les valoracions les espècies majoritàries són homometàl·liques de Cu(I), sempre s'observa una mescla de diferents complexos metàl·lics on l'espècie d'estequiometria més gran és la Cu₁₀-HpCuMT. Durant la valoració va ser possible també reproduir els espectres de DC corresponents a les produccions de Cu-HpCuMT *in vivo* en dos condicions d'oxigenació (**Fig. 24A i B.**)

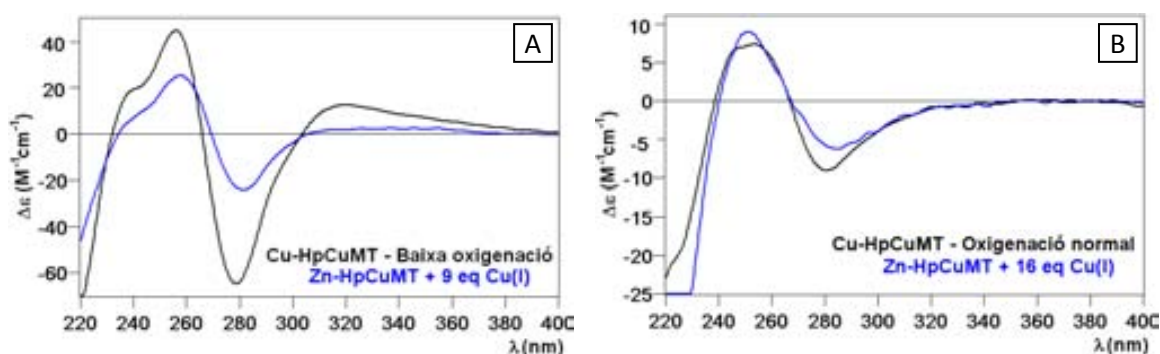


Fig. 24. Espectres de DC corresponents a la valoració de Zn-HpCuMT amb 9 (blau **A**) i 16 (blau **B**) eq de Cu(I) afegits i als complexos Cu-HpCuMT (negre) obtinguts *in vivo* a baixa (**A**) i oxigenació normal (**B**).

La valoració amb Cu(I) de la producció Cu-HpCuMT a oxigenació normal, que conté una certa quantitat de Zn(II) inicialment coordinat, permet reproduir alguns dels espectres de DC i l'especiació dels estadis finals de la valoració de Zn-HpCuMT (**Fig. 25**), però en cap cas, l'excés de Cu(I) dóna lloc a la formació de l'espècie única Cu₁₂-HpCuMT.

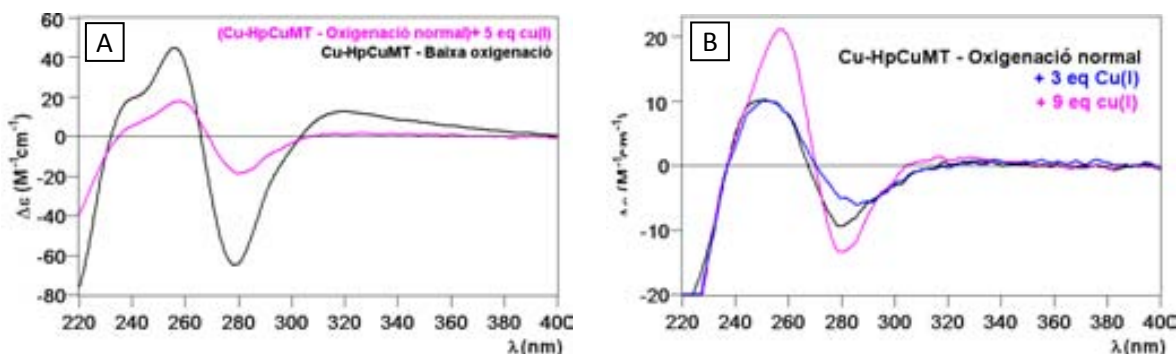


Fig. 25. Espectres de DC enregistrats en la valoració de Cu-HpCuMT obtinguts en la seva síntesi a oxigenació normal amb Cu(I).

Així, el conjunt de dades permeten postular que l'espècie $\text{Cu}_{12}\text{-HpCuMT}$, aïllada de forma nativa a partir de mostres del cargol *H.pomatia*, només s'ha pogut reproduir en la biosíntesi recombinant de HpCuMT en medis rics en Cu(II) a baixa oxigenació i, en cap cas, ha estat possible obtenir-la per desplaçament metàl·lic de l'ió Zn(II) inicialment enllaçat en les valoracions de les preparacions Zn-HpCuMT i Cu-HpCuMT (obtinguda a oxigenació normal) amb Cu(I). Aquests fets indiquen que, tot i la gran preferència *in vivo* de la isoforma HpCuMT per l'ió Cu(I), l'espècie $\text{Cu}_{12}\text{-HpCuMT}$ es deu formar probablement directament a partir de la forma apo de la proteïna en medis fisiològics, en comptes de ser el producte del desplaçament metàl·lic en la forma Zn-HpCuMT, com habitualment s'ha proposat per diverses MTs.

3.1.1.5. Estudi de la participació del residu d'His en l'enllaç metàl·lic de HpCuMT

És ben conegut que els residus d'His poden actuar com a lligands de certs ions metàl·lics en algunes metal·loproteïnes. En el cas de les MTs, la seva participació ha estat ignorada durant molts anys, probablement degut a que les primeres proteïnes d'aquesta família que van ser descobertes, i de fet les més àmpliament estudiades, no presenten cap residu d'histidina en la seva seqüència primària. A mesura que s'ha incrementat el número de seqüències d'MT conegudes també ho ha fet el número d'elles que mostren algun residu d'histidina, i en conseqüència es fa rellevant qüestionar-se la seva possible participació en l'enllaç a metalls.

Amb la finalitat d'estudiar la participació del residu d'His, present en la estructura primària de la isoforma HpCuMT i absent en la isoforma HpCdMT, es va preparar mitjançant tècniques d'enginyeria genètica una proteïna mutant on aquest residu d'His va ser substituït per un residu d'Ala, i va ser sintetitzada en *E. coli* en medis suplementats amb els ions metàl·lics Zn(II), Cd(II) i Cu(II). Les seves habilitats coordinants en front de Zn(II), Cd(II) i Cu(II) van ser estudiades de la mateixa manera que amb les dues isoformes anteriorment presentades, HpCdMT i HpCuMT.

In vivo, el pèptid mutant (HpCuMTmut) en medis rics en Zn(II) i Cd(II), mostra pràcticament el mateix comportament que en el cas de la proteïna no modificada, HpCuMT,

indicant així que aquest residu d'histidina no té un paper rellevant en la coordinació d'aquests ions divalents. En ambdós tipus de preparacions M-HpCuMTmut (M=Zn(II) o Cd(II)) obtingudes *in vivo* s'observa la formació d'una mescla d'espècies (**Fig. 26**) amb una especiació completament anàloga a les trobades en les preparacions Zn- i Cd-HpCuMT *in vivo*. També es pot afirmar que existeix un mateix tipus de plegament pels compostos Zn-MT de les dues proteïnes ja que ambdues presenten espectres de DC molt similars (**Fig. 27A**). En un primer moment, no va ser possible establir aquest tipus de relació en el cas dels complexos Cd-MT, ja que en contraposar els espectres de DC entre qualsevol de les tres produccions de Cd-HpCuMT (**Fig. 19**) i l'empremta de Cd-HpCuMTmut (**Fig. 26B**) no s'observa una gran similitud. Tot i així, en un experiment d'estabilitat de Cd-HpCuMTmut es va observar, **Fig. 27B**, com després de 2 dies a temperatura constant de 25 °C el plegament de la proteïna al voltant del centre metàl·lic (espectre de DC) canvia fins a reproduir amb gran similitud l'empremta de la tercera producció Cd-HpCuMT. Potser la major divergència de comportament entre la isoforma HpCuMT i la forma mutada, HpCuMTmut, la trobaríem en el fet que la producció Cd-HpCuMTmut presenta un major contingut en espècies de tipus Cd_xS_y -MT, essent Cd_9S - i Cd_8S -HpCuMTmut unes de les espècies principals en solució, en correspondència amb una gran divergència entre els dos valors d'ICP-AES (normal i àcid) mesurats (**Taula 7**). Aquest fet sembla indicar, probablement, un caràcter de Cu-tioneïna més marcat per HpCuMTmut que pel seu pèptid original no mutat.

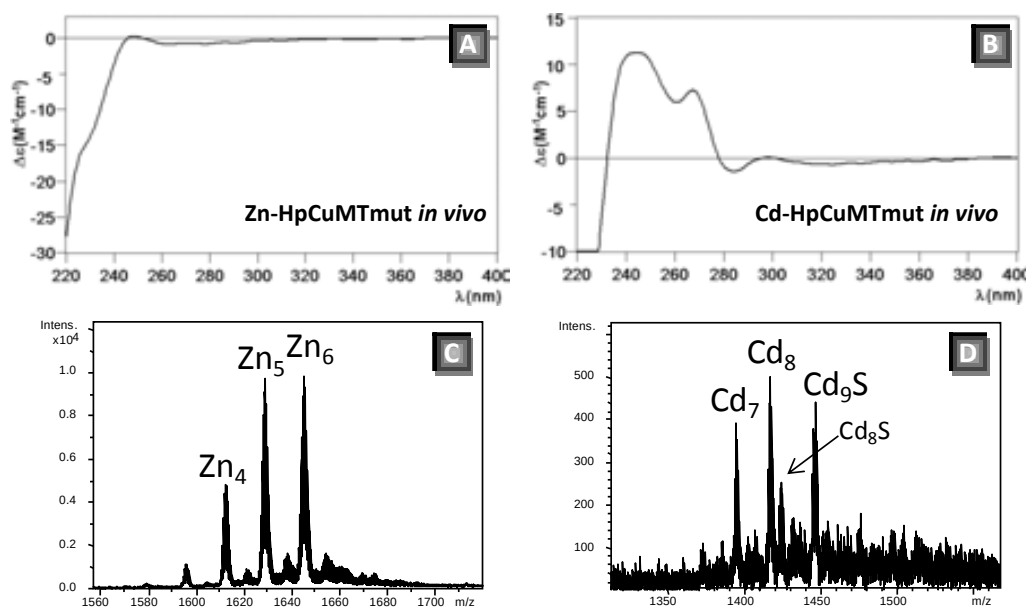


Fig. 26. Espectres de DC corresponents a la biosíntesi de HpCuMTmut en medis enrequis en Zn(II) (A) i Cd(II) (B) respectivament. Espectres d'ESI-MS corresponents a les anteriors preparacions recombinants de Zn- HpCuMTmut (C) i Cd-HpCuMTmut (D).

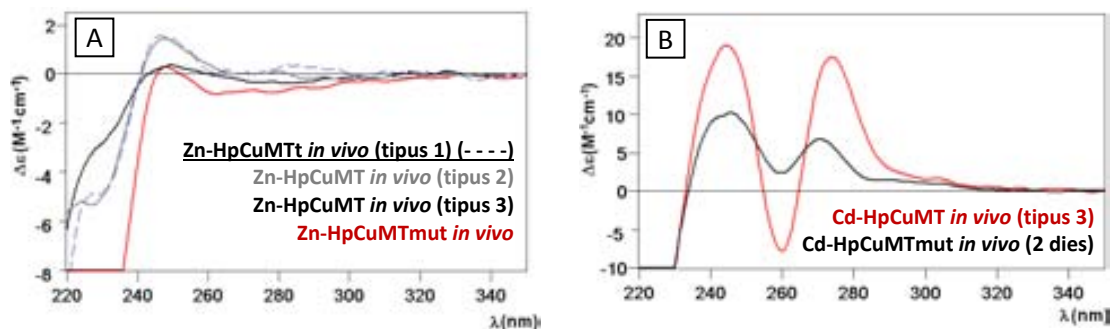


Fig. 27. (A) Espectre de DC corresponents als 3 tipus de preparacions recombinants de HpCuMT en medis rics en Zn(II) (tipus 1: negre ratlles, tipus 2: gris i tipus 3: negre) i l'enregistrat a partir de la biosíntesi de la isoforma mutada HpCuMTmut també en medis rics en Zn(II) (vermell). (B) Espectres de DC de la 3era bioproducció de Cd-HpCuMT (vermell) i l'obtingut a partir de la preparació de Cd-HpCuMTmut en medis rics en Cd(II) després de dos dies d'evolució a 25 °C en atmosfera inert.

	Zn-HpCuMTmut		Cd-HpCuMTmut	
ICP-AES	Normal	Àcid	Normal	Àcid
[prot] (M)	2.00×10^{-4}	1.97×10^{-4}	1.69×10^{-4}	0.60×10^{-4}
Zn/MT	4.9	5.0	<L.D.	<L.D.
Cd/MT	<L.D.	<L.D.	3.1	8.6

Taula 7. Resultats d'ICP-AES de la biosíntesi de la proteïna HpCuMTmut en medis rics en Zn(II) i Cd(II). Les sigles <L.D. indiquen valors per sota del límit de detecció.

Per conèixer el comportament *in vitro* d'aquest polipèptid mutant es van dur a terme experiments de desplaçament metàl·lic $\text{Zn}^{II}/\text{Cd}^{II}$ a partir de la preparació Zn-HpCuMTmut (**Annex 7.1.1., Làmina 7.1.1.8**), així com l'acidificació/reneutralització dels complexos Cd-HpCuMTmut *in vivo* (**Annex 7.1.1., Làmina 7.1.1.9**). En tots els casos la principal característica és l'obtenció d'una mescla d'espècies amb un contingut metàl·lic molt similar a les preparacions Cd-HpCuMTmut inicials, indicant una baixa preferència d'aquesta proteïna per a formar espècies estables i estructurades quan coordina Cd(II). Així, les dades obtingudes en l'estudi de la coordinació d'ions divalents de HpCuMTmut, a les mateixes condicions que per la proteïna HpCuMT, indiquen una gran similitud entre les dues proteïnes, remarcant així la no participació del residu d'His en la coordinació dels ions metàl·lics Cd(II) i Zn(II).

La gran preferència metàl·lica de la proteïna mutant de HpCuMT, HpCuMTmut, per Cu(I) queda clarament reflectida en la formació d'espècies Cu-HpCuMT homometàl·liques en la seva biosíntesi recombinant en medis rics en Cu(I) en ambdues condicions d'oxigenació, a diferència de la no mutada que només dóna lloc a espècies homometàl·liques en condicions de baixa oxigenació. A més, cal remarcar que en les produccions en Cu(II) a oxigenació normal es possible detectar l'espècie Cu_{12} -HpCuMTmut (**Fig. 28E**), molt minoritària, acompanyada d'altres agregats heterometàl·lics (contingut en Zn(II) confirmat per les dades d'ICP-AES, **Taula 8**). A diferència del que passa per la HpCuMT on sota les mateixes condicions es van formar, principalment, complexos Zn,Cu-HpCuMT de menor estequiometria. En el cas de baixa oxigenació es forma

pràcticament una única espècie, Cu₁₂-HpCuMTmut, acompanyada d'una petita quantitat de Cu₁₀-HpCuMTmut.

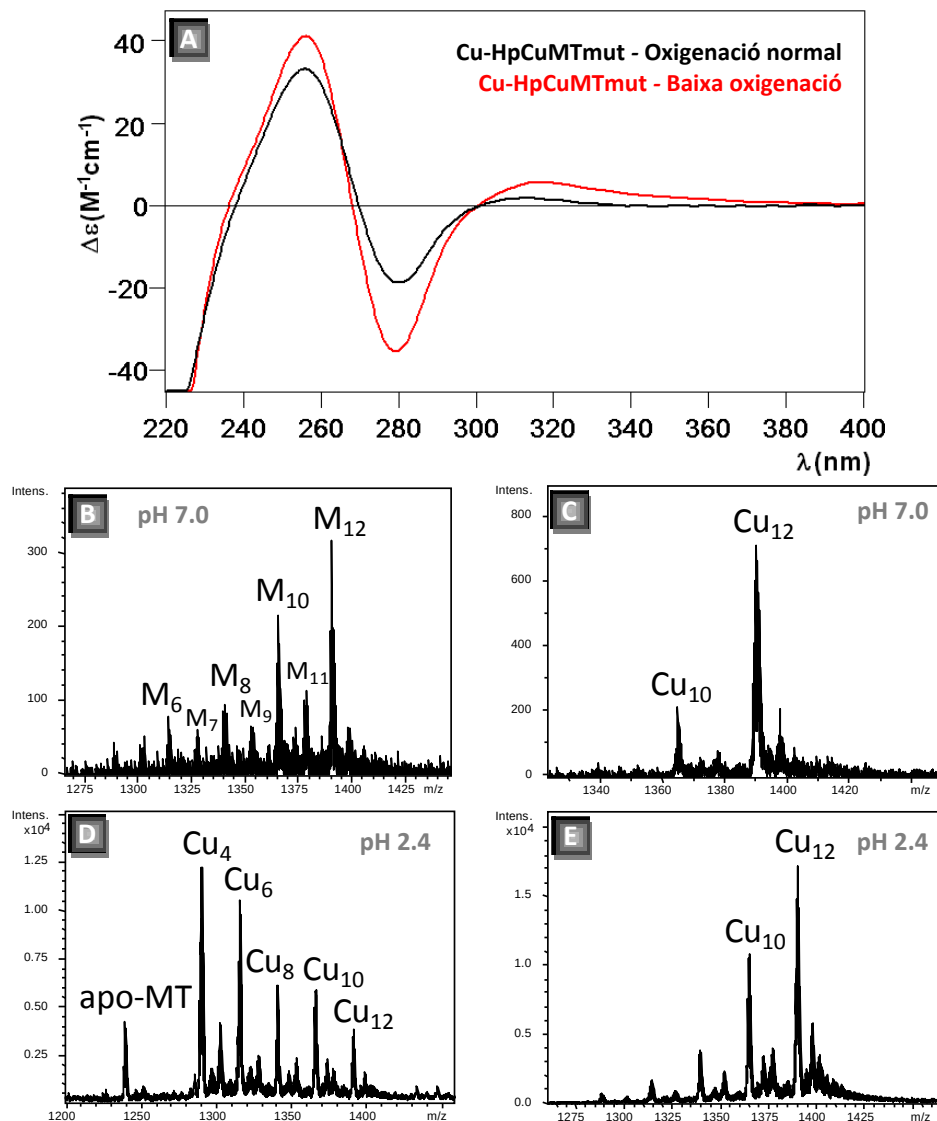


Fig. 28. (A) Espectres de DC corresponents a la biosíntesi de HpCuMTmut mitjançant tècniques d'enginyeria genètica en medis rics en Cu(II) en condicions d'oxigenació normal (negre) i de baixa oxigenació (vermell). Espectres d'ESI-MS corresponents a les preparacions recombinants de Cu-HpCuMTmut en condicions d'oxigenació normal a (B) pH 7.0 i a (D) pH 2.4, en condicions de baixa oxigenació a (C) pH 7.0 i a (E) pH 2.4

Cu-HpCuMTmut			
		Oxigenació normal	Baixa oxigenació
ICP _{conv}	[prot] (M)	0.75x10 ⁻⁴	0.64x10 ⁻⁴
	Zn/MT	1.9	<L.D.
	Cu/MT	6.5	10.6

Taula 8. Resultats de la caracterització per ICP-AES de les bioproduccions de HpCuMTmut en medis rics en Cu(II) en dues condicions d'oxigenació diferents, normal i baixa. Les sigles <L.D. indiquen valors per sota del límit de detecció. En aquesta taula es mostren només els resultats corresponents a l'ICP-AES convencional ja que no presenta diferència significativa amb els resultats obtinguts en condicions àcides.

Les dades obtingudes en la valoració de Zn-HpCuMTmut *in vivo* amb Cu(I) mostren la reproducció de les característiques espectroscòpiques del dos tipus de produccions recombinants de Cu-HpCuMTmut (oxigenació normal i baixa) en diferents etapes de la valoració.

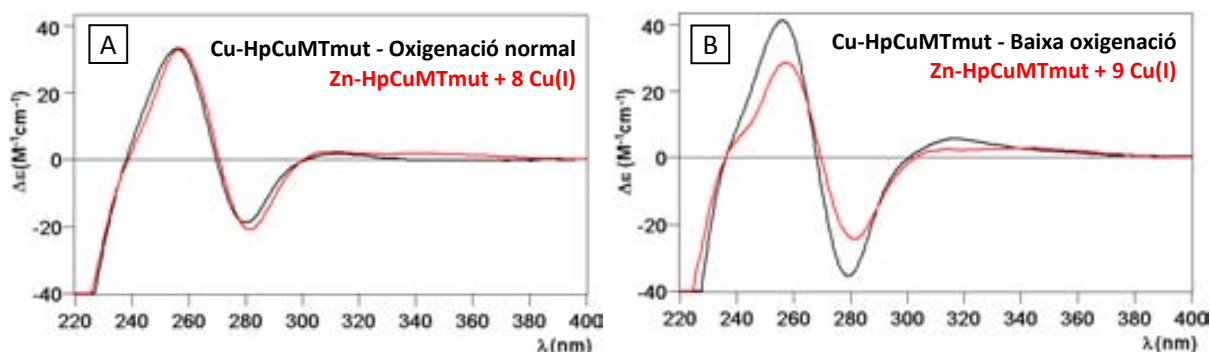


Fig. 29. Espectres de (A) DC de la producció de Cu-HpCuMTmut sota condicions d'oxigenació normal (negre) i el resultat de la valoració de la preparació de Zn-HpCuMTmut després d'afegir 8 (vermell) eq de Cu(I). Espectres de (B) DC de la producció de Cu-HpCuMTmut en condicions de baixa oxigenació (negre) i l'obtingut de valorar la preparació de Zn-HpCuMTmut amb 9 (vermell) eq de Cu(I).

Considerant el conjunt de resultats obtinguts, tant *in vivo* com *in vitro*, queda prou clar que l'absència del residu d'His en HpCuMTmut contribueix a augmentar el caràcter de Cu-tioneïna d'aquesta proteïna, en comparació amb la proteïna nativa, afavorint la formació de l'espècie homometàl·lica Cu₁₂-HpCuMTmut, molt més estable inclús en condicions d'oxigenació normal. Per tant, es pot concloure que la presència del residu d'His en el pèptid HpCuMT, que en conjunt té una gran habilitat per a enllaçar Cu(I), confereix a aquesta isoforma unes propietats que li faciliten l'alliberament de part del Cu(I) enllaçat, una propietat que pot ser essencial si es té en compte el putatiu rol de HpCuMT en la transferència de Cu(I) a altres biomolècules que requereixin aquest ió metàl·lic, com el cas de l'hemocianina, que també s'expressa de manera única en els rogovits. Tanmateix, els resultats aquí mostrats demostren, un cop més, que les propietats enllaçants d'una proteïna poden variar significativament per la mutació d'un sol aminoàcid de la cadena polipeptídica, demostrant així la importància del conjunt d'aminoàcids de la proteïna, no només dels residus de Cys coordinants, en la determinació de les característiques de les MTs.

3.1.1.6. Estabilitat dels complexos Cd₆-HpCdMT i Cu₁₂-HpCuMT

Per tal d'estudiar l'estabilitat de les espècies Cd₆-HpCdMT i Cu₁₂-HpCuMT, obtingudes tant a partir de l'organisme natiu com en les produccions recombinants aquí mostrades, es va realitzar un experiment preparant una mescla equimolar d'ambdues espècies, mantenint la temperatura constant de 25 °C i sota atmosfera inert. La mescla es va analitzar per ESI-MS tant a l'inici de l'experiment, just després de fer la barreja de preparacions, com després de més de 20 hores (**Fig. 30**). Els resultats obtinguts confirmen que no hi ha hagut intercanvi metàl·lic entre les

espècies presents en solució, així com tampoc s'ha observat la pèrdua del contingut metàl·lic de cap dels complexos ni cap tipus de degradació dels mateixos.

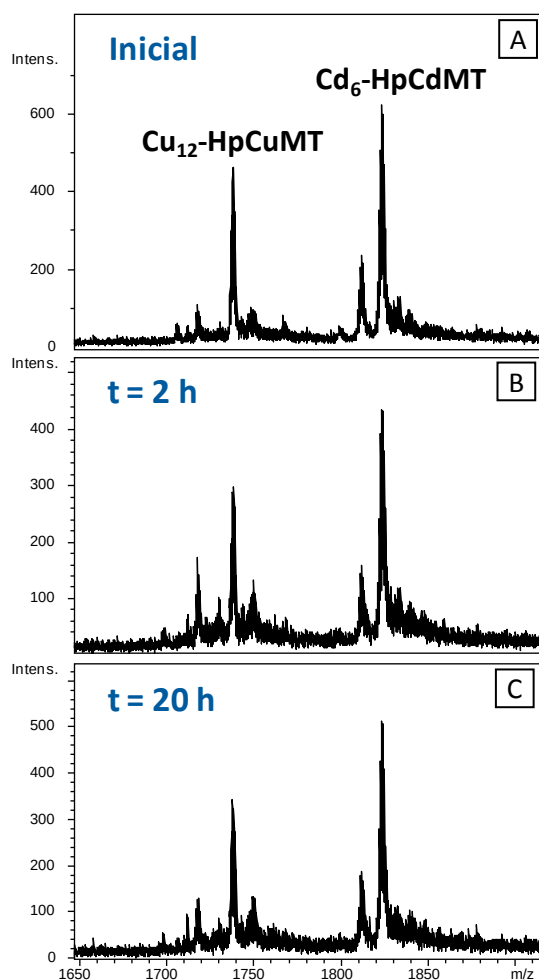


Fig. 30. Espectres d'ESI-MS d'una mescla equimolar dels complexos $\text{Cd}_6\text{-HpCdMT}$ i $\text{Cu}_{12}\text{-HpCuMT}$ biosintetitzats de forma recombinant en medis rics en Cd(II) corresponents a la mesura a temps inicial (A) i després de 2 (B) i 20 h (C).

La integritat dels dos tipus d'agregats en solució després de 20 h permet concloure que els dos complexos de HpMT posseeixen una excepcional estabilitat, alhora que una baixa labilitat dels ions coordinats, atribuïble a la gran preferència metàl·lica de HpCdMT i HpCuMT pels ions Cd(II) i Cu(I) , respectivament. Així la seva possible funció fisiològica en relació als metalls Cd(II) i Cu(I) no es veu únicament condicionada pel teixit on es sintetitzen, sinó també per la seva seqüència que marca una especificitat metàl·lica clarament diferenciada.

Els resultats mostrats i discutits en aquest capítol amb les dues isoformes d'*H.pomatia*, HpCdMT i HpCuMT, indiquen que, tot i que ambdues isoformes tenen el mateix nombre de Cys, responsables de la coordinació dels ions metàl·lics, en posicions anàlogues, cadascuna de les isoformes mostra una clara especificitat metàl·lica contraposada, la qual cosa indica que les seves diferències coordinants són també degudes a la resta d'aminoàcids de la seqüència. Així, les dades obtingudes permeten confirmar que la isoforma HpCdMT presenta unes característiques coordinants molt diferents de les de HpCuMT, amb una clara preferència pels

ions divalents, mentre que HpCuMT la presenta pel Cu(I), si bé, el residu d'His probablement facilita l'alliberament controlat de Cu(I) quan sigui necessari.

Finalment, les grans diferències per coordinar els ions metàl·lics Zn(II), Cd(II) i Cu(I) determinades per aquestes dues seqüències d'MTs que presenten el mateix nº de Cys i completament alineades permetria identificar els factors que determinen la seva especificitat metàl·lica (veure **apartat 3.1.4.**).

3.1.2. Estudi de la capacitat coordinant de les diferents isoformes d'MT del gastròpode terrestre *Cornu aspersum*: CaCdMT, CaCdCuMT i CaCuMT

En el cargol terrestre *Cornu aspersum* s'ha descrit l'existència d'un sistema d'MTs consistent en la síntesi de 3 isoformes diferents (**Introducció, Apartat 1.2.1.1.**). Dues de les isoformes presents en aquest organisme, que han estat anomenades CaCdMT i CaCuMT degut a que en forma nativa s'han aïllat enllaçant Cd(II) i Cu(I), respectivament, presenten una gran analogia seqüencial amb les isoformes aïllades del cargol terrestre *H.pomatia*, HpCdMT i HpCuMT (**Apartat 3.1.1.**). La tercera isoforma de *C.aspersum*, que aïllada de l'organisme es troba enllaçant tant Cd(II) com Cu(I), ha estat anomenada CaCdCuMT. Els principals resultats relatius a la caracterització de les 3 isoformes d'MT del cargol *C.aspersum* es troben recopilats en l'**Annex 7.1.2.**

3.1.2.1. Comportament de les isoformes CaMTs envers Zn(II)

Seguint l'estratègia experimental dissenyada per a l'estudi de les propietats coordinants *in vivo* (en medi fisiològic) de les diferents metal·lotioneïnes vers diversos ions metàl·lics (**Introducció, apartat 1.3.**), es va procedir a la biosíntesi recombinant de les corresponents CaMTs (CaCdMT, CaCuMT i CaCdCuMT) en medis rics en Zn(II). Els primers resultats obtinguts van permetre observar un comportament divergent entre la proteïna CaCdMT i les altres dues isoformes, CaCdCuMT i CaCuMT, enfront la coordinació d'aquest ió metàl·lic divalent. En la preparació recombinant de Zn-CaCdMT es forma preferentment, com a única espècie, el complex Zn_6 -CaCdMT (**Fig. 31**), mentre que en les bioproduccions de Zn-CaCuMT i Zn-CaCdCuMT s'obté una mescla d'espècies on coexisteixen complexos d'estequiometries Zn_6^- , Zn_5 -CaCuMT i Zn_6^- , Zn_5^- , Zn_4 -CaCdCuMT, respectivament (**Fig. 31**). Tot i així, en tots els casos el complex majoritari és l'espècie Zn_6 -CaMT, degut principalment a que totes les isoformes considerades tenen el mateix nombre de Cys. Aquesta diferència observada enfront la coordinació a Zn(II) també es fa evident quan es comparen els espectres de DC de les corresponents preparacions (**Fig. 31**). Mentre que les preparacions Zn-CaCuMT i Zn-CaCdCuMT, que són completament anàlogues, donen lloc a un espectre pràcticament pla per sobre de 230 nm, típic de les proteïnes

amb un marcat caràcter de Cu-tioneïnes, l'empremta de DC de l'espècie única Zn_6 -CaCdMT *in vivo* mostra una banda gaussiana molt intensa centrada a 240 nm, absorció típica dels cromòfors $Zn(Cys)_4$, que correspon a un complex molt més estructurat que els agregats Zn-CaMT obtinguts per a les altres dues isoformes. Aquest espectre de DC s'ha observat també per a l'espècie Zn_6 -HpCdMT obtinguda de forma recombinant (**Fig. 32**), indicant així una certa similitud en el plegament de les dues proteïnes al voltant dels ions $Zn(II)$. Finalment cal remarcar que, mentre que les preparacions Zn-CaCdMT i Zn-CaCdCuMT no presenten divergències significatives entre els resultats quantitatius mitjançant ICP-AES de manera convencional i àcida, sí que s'observa una certa divergència entre els dos valors d'ICP-AES de la preparació de Zn-CaCuMT (**Taula 9**). Aquesta divergència indica la possible presència de lligands sulfur a la mostra, encara que cap altra dada experimental ho confirmi (DC o ESI-MS), característica atribuïda a les metal·lotioneïnes amb un marcat caràcter de Cu-tioneïna.

Així, la formació preferent d'una única espècie Zn_6 -CaCdMT amb especial estabilitat és indicatiu d'una major preferència metàl·lica d'aquesta isoforma enfront $Zn(II)$. Clarament les altres dues isoformes, CaCdCuMT i CaCuMT, presenten una baixa afinitat per l'ió metàl·lic $Zn(II)$ essent més marcada per la proteïna CaCuMT per la presència d'ions sulfur a la mostra que és reflex de l'existència d'un caràcter de Cu-tioneïna significatiu.

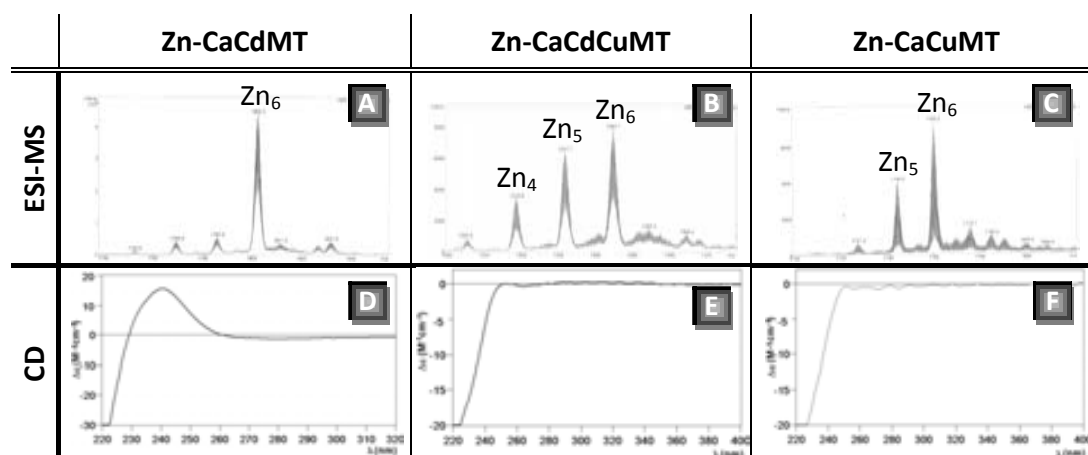


Fig. 31. Espectres (A, B, C) d'ESI-MS enregistrats a pH 7.0 i espectres (D, E i F) de DC corresponents a les respectives preparacions recombinants de les 3 isoformes d'MT provinents de l'organisme *C. aspersum* en medis de cultiu rics en $Zn(II)$.

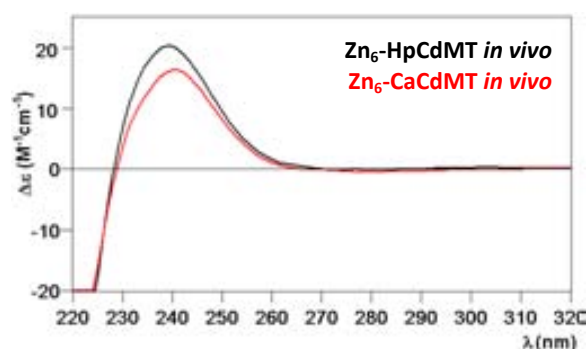


Fig. 32. Espectre de comparació de DC de les espècies úniques Zn_6 -HpCdMT (negre) i Zn_6 -CaCdMT (vermell) obtingudes respectivament de forma recombinant en medis de cultiu suplementats amb $Zn(II)$.

		Zn-CaCdMT	Zn-CaCdCuMT	Zn-CaCuMT
ICP _{conv}	[prot] (M)	2.67×10^{-4}	2.46×10^{-4} M	3.13×10^{-4}
	Zn/MT	5.5	5.0	4.9
	Cd/MT	<L.D.	<L.D.	<L.D.
	Cu/MT	<L.D.	<L.D.	<L.D.
ICP _{àcid}	[prot] (M)	2.70×10^{-4}	2.52×10^{-4}	2.46×10^{-4}
	Zn/MT	5.3	4.9	6.2
	Cd/MT	<L.D.	<L.D.	<L.D.
	Cu/MT	<L.D.	<L.D.	<L.D.

Taula 9. Dades d'ICP-AES en condicions convencionals i àcides corresponents a la caracterització de les bioproduccions en medis rics en Zn(II) de les tres isoformes d'MT de l'organisme *C. aspersum*, CaCdMT, CaCdCuMT i CaCuMT. Les sigles <L.D. signifiquen que la mesura es troba per sota del límit de detecció.

3.1.2.2. Comportament de les isoformes CaMTs envers Cd(II)

Es va estudiar la coordinació de l'ió divalent Cd(II) a les 3 isoformes d'MT presents en els teixits de l'organisme *C. aspersum* de dues maneres diferents: **i)** a partir de la caracterització de les espècies Cd-CaMTs formades *in vivo* en la síntesi de les diferents proteïnes en *E. coli* en medis suplementats amb Cd(II); **ii)** mitjançant la caracterització dels complexos Cd-CaMTs obtinguts *in vivo* després d'un procés d'acidificació i posterior reneutralització de les respectives preparacions Cd-CaMTs; **iii)** a partir del desplaçament metàl·lic de Zn(II) per Cd(II) a partir de les corresponents formes Zn-CaMTs recombinants.

La informació extreta de la caracterització de les preparacions recombinants Cd-CaMTs en medis de cultiu rics en Cd(II) indica, tal i com era d'esperar, una major especificitat metàl·lica de CaCdMT per l'ió divalent Cd(II) en medis fisiològics que les altres dues isoformes, CaCdCuMT i CaCuMT. *In vivo*, s'obté com a única espècie el complex Cd₆-CaCdMT (**Fig. 33**), que mostra una empremta de DC amb una absorció centrada a 220(+) nm, corresponent a la cadena polipeptídica, i una senyal de tipus exciton coupling (forma de derivada) a 250 nm característica dels cromòfors Cd(Cys)₄ ben estructurats.

Per altra banda, en la caracterització de les preparacions Cd-CaCuMT i Cd-CaCdCuMT es va observar un comportament molt diferent a l'exhibit per la isoforma CaCdMT. Mostren la formació d'una mescla de varies espècies Cd-MT, algunes d'elles contenint S²⁻ com a lligands addicionals (**Fig. 33**). Les mesures quantitatives d'ICP-AES (**Taula 10**) indiquen la presència d'un gran contingut en sulfurs en ambdues preparacions (identificat per la divergència determinada entre la concentració de proteïna quan es mesura segons ICP_{conv} i ICP_{àcid}). Aquesta diferència resulta ser més important en la bioproducció de Cd-CaCdCuMT. Es confirma en observar, per una banda, les espècies identificades en els espectres de masses enregistrats (formació de Cd₈S i Cd₉S-CaCdCuMT vers la formació de Cd₈S-CaCuMT, **Fig. 33B i C**). Per l'altra, s'observa una absorció en els espectres de DC (**Fig. 33E i F**) en la regió de 280 nm (corresponent a enllaços Cd-

S^{2-}) més intensa, tot i que lleugerament, per la mostra de CaCdCuMT en comparació amb el de la preparació de Cd-CaCuMT. En vista dels resultats obtinguts es pot afirmar que les preparacions Cd-CaCdCuMT i Cd-CuMT mostren un major contingut metàl·lic que les respectives preparacions en medis rics en Zn(II), si bé cadascuna de les proteïnes conté diferents complexos com a espècies majoritàries: Cd_8- i Cd_7 -CaCdCuMT enfront de Cd_7- i Cd_6 -CaCuMT. En referència als espectres de DC enregistrats per Cd-CaCdCuMT i Cd-CuMT, clarament diferents de la preparació Cd-CaCdMT, mostren una certa similitud en les seves absorcions, amb una banda gaussiana a 250 nm (corresponent als cromòfors $Cd(S_{Cys})_4$) i una més ampla a 280 nm (característica de la presència de lligands S^{2-} a la mostra). La menor intensitat dels senyals corresponents a la preparació Cd-CaCdCuMT suggereixen un grau d'estructuració menor que el de la preparació Cd-CaCuMT.

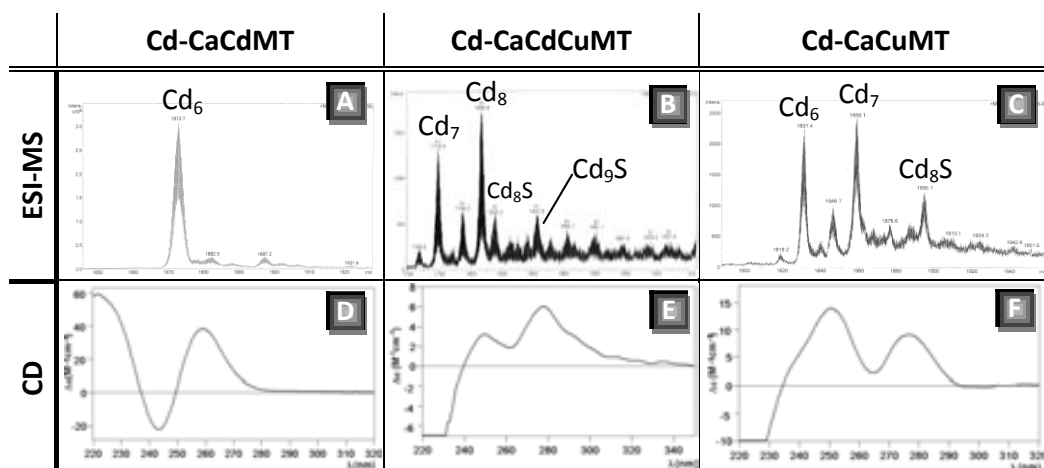


Fig. 33. Espectres (A, B, C) d'ESI-MS enregistrats a pH 7.0 i espectres de (D, E i F) DC corresponents a la caracterització de les respectives preparacions recombinants de les 3 isoformes de l'organisme *C. aspersum* en medis de cultiu rics en Cd(II).

És important remarcar com les preparacions que contenen sulfurs, Cd-CaCdCuMT i Cd-CaCuMT, pateixen variacions al llarg del temps a temperatura ambient, tant en l'especiació present en solució com en les característiques espectroscòpiques observades (ampliat a l'Apartat 3.1.4.). Aquest fenomen, prèviament descrit per altres MTs,^[159] i associat a aquelles amb un marcat caràcter de Cu-tioneïna, no afecta a l'espècie Cd_6 -CaCdMT obtinguda de forma recombinant, essent estable al llarg del temps i indicant així un major caràcter de Zn-tioneïna.

		Cd-CaCdMT	Cd-CaCdCuMT	Cd-CaCuMT
ICP _{conv}	[prot] (M)	1.82×10^{-4}	3.23×10^{-4}	2.10×10^{-4}
	Zn/MT	<L.D.	<L.D.	<L.D.
	Cd/MT	5.4	3.2	4.5
	Cu/MT	<L.D.	<L.D.	<L.D.
ICP _{àcid}	[prot] (M)	1.75×10^{-4}	1.21×10^{-4}	1.28×10^{-4}
	Zn/MT	<L.D.	<L.D.	<L.D.
	Cd/MT	6.5	8.3	7.4
	Cu/MT	<L.D.	<L.D.	<L.D.

Taula 10. Dades d'ICP-AES en condicions convencials i àcides corresponents a la caracterització de les bioproduccions en medis rics en Cd(II) de les tres isoformes d'MT de l'organisme *C. aspersum*, CaCdMT, CaCdCuMT i CaCuMT. Les sigles <L.D. signifiquen que la mesura es troba per sota del límit de detecció.

Per tal d'estudiar l'estabilitat dels complexos Cd-CaMT i el possible rol dels lligands S^{2-} en la seva estructuració, es va realitzar un experiment d'acidificació de les diferents preparacions Cd-CaMT *in vivo* des d'un pH inicial d'aproximadament 7.0 baixant fins a un pH inferior a 1.0 (per eliminar tots els lligands àcid-làbils S^{2-} en forma de H_2S gas). Els espectres de DC enregistrats durant les diferents addicions de HCl en el procés d'acidificació de les bioproduccions de les 3 isoformes CaMT en medis rics en Cd(II) revelen un comportament molt diferent de l'espècie única Cd_6 -CaCdMT obtinguda *in vivo* en comparació amb els agregats Cd-MT corresponents a les altres dues proteïnes, Cd-CaCdCuMT i Cd-CaCuMT. En concret, s'observa com l'empremta de DC de les preparacions Cd-CaCuMT i Cd-CaCdCuMT canvien des de les primeres addicions d'àcid (**Fig. 34**) a causa de l'eliminació progressiva dels anions S^{2-} . Per altra banda, les propietats espectroscòpiques de l'espècie Cd_6 -CaCdMT, obtinguda de forma recombinant, es veuen pràcticament inalterades fins a pH 5.0, en concordança amb l'absència d'ions sulfur en la mostra, indicant d'aquesta manera la gran estabilitat i estructuració d'aquest complex metall-MT. El diferent comportament de les isoformes CaCdCuMT i CaCuMT respecte la CaCdMT és reflexa també en el procés de reneutralització, on tan sols va ser possible recuperar l'espècie Cd_6 -CaCdMT (**Fig. 35A i B**) amb les propietats espectroscòpiques intactes, a diferència de les altres dues isoformes que mostren una degradació evident. Es confirma, un cop més, la presència i labilitat dels lligands sulfur en les preparacions recombinants Cd-CaCuMT i Cd-CaCdCuMT, a més d'indicar, a través dels canvis en les propietats espectroscòpiques observades en la seva acidificació, la influència i participació d'aquests lligands sulfur extres en l'estructuració dels citats complexos Cd-MT.

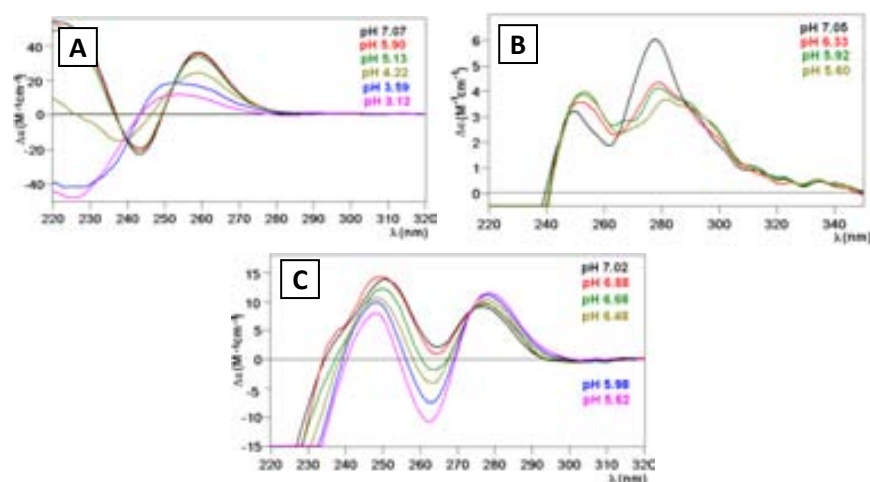


Fig. 34. Espectres de DC corresponents al procés d'acidificació lenta de les bioproduccions de les diferents isoformes d'MT, CaCdMT (A), CaCdCuMT (B) i CaCuMT (C), en medis de cultiu rics en l'ió metàl·lic divalent Cd(II).

Adicionalment, per tal de conèixer el comportament enllaçant en medis no fisiològics/cel·lulars, o sigui *in vitro*, de les tres isoformes d'MT presents en el cargol terrestre *C. aspersum* es va dur a terme la valoració de les corresponents preparacions Zn-CaMTs mitjançant addicions de volums coneguts d'una solució de Cd(II). Els resultats obtinguts en aquest desplaçament metàl·lic de Zn(II) per Cd(II) permeten diferenciar una vegada més el comportament de la isoforma CaCdMT vers l'observat per CaCuMT i CaCdCuMT. La característica essencial que marca aquest comportament diferent és l'obtenció del complex $\text{Cd}_6\text{-CaCdMT}$ en afegir 6 eq de Cd(II) a partir d'una solució que conté l'espècie $\text{Zn}_6\text{-CaCdMT}$ (**Fig. 35B**), mentre que en les isoformes CaCdCuMT i CaCuMT, com el punt de partida és una barreja d'espècies Zn-MT, és normal que en cap cas sigui possible obtenir una única espècie Cd-MT. A més de formar-se el complex $\text{Cd}_6\text{-CaCdMT}$ com a única espècie en solució, que presenta la mateixa estequiometria i les mateixes característiques espectroscòpiques (empremta de DC característica amb un *exciton coupled* centrat a 250 nm) que l'espècie $\text{Cd}_6\text{-CaCdMT}$, obtinguda mitjançant síntesi recombinant en medis de cultiu rics en Cd(II) (**Fig. 35A**). L'efecte d'afegir més equivalents un cop s'ha format l'espècie $\text{Cd}_6\text{-CaCdMT}$ és mínim (**Annex 7.1.2., Làmina 7.1.2.1**), formant-se una petita quantitat de l'espècie $\text{Cd}_7\text{-CaCdMT}$ i amb canvis poc significatius en els espectres de DC (mateix efecte observat en les valoracions de HpCdMT amb Cd(II) (**Secció 1.1.1.**)). Un fet molt rellevant que indica l'elevada especificitat d'aquesta isoforma per enllaçar Cd(II) és la seva gran similitud amb la proteïna HpCdMT, caracteritzada anteriorment com a Zn-tioneïna amb especial afinitat pel Cd(II) (s'amplia a l'**Apartat 3.1.4.**), tant en la formació de les seves espècies $\text{Zn}_6\text{-MT}$ i $\text{Cd}_6\text{-MT}$ *in vivo*, com de la $\text{Cd}_6\text{-MT}$ *in vitro*, reproduint-se al mateix temps exactament l'empremta de DC d'ambdós complexos (**Fig. 35A**). L'absència de sulfur inorgànic en la preparació recombinant de $\text{Cd}_6\text{-CaCdMT}$ (no hi ha divergència significativa en els valors d'ICP en les dues condicions), així com l'estabilitat de l'espècie $\text{Cd}_6\text{-CaCdMT}$ *in vivo* després del procés d'acidificació/reneutralització, en què es recupera el complex $\text{Cd}_6\text{-MT}$ amb les seves propietats

espectroscòpiques intactes (**Fig. 35A i C**), permet confirmar la seva extremadament marcada especificitat per enllaçar Cd(II), tant *in vivo* com *in vitro*.

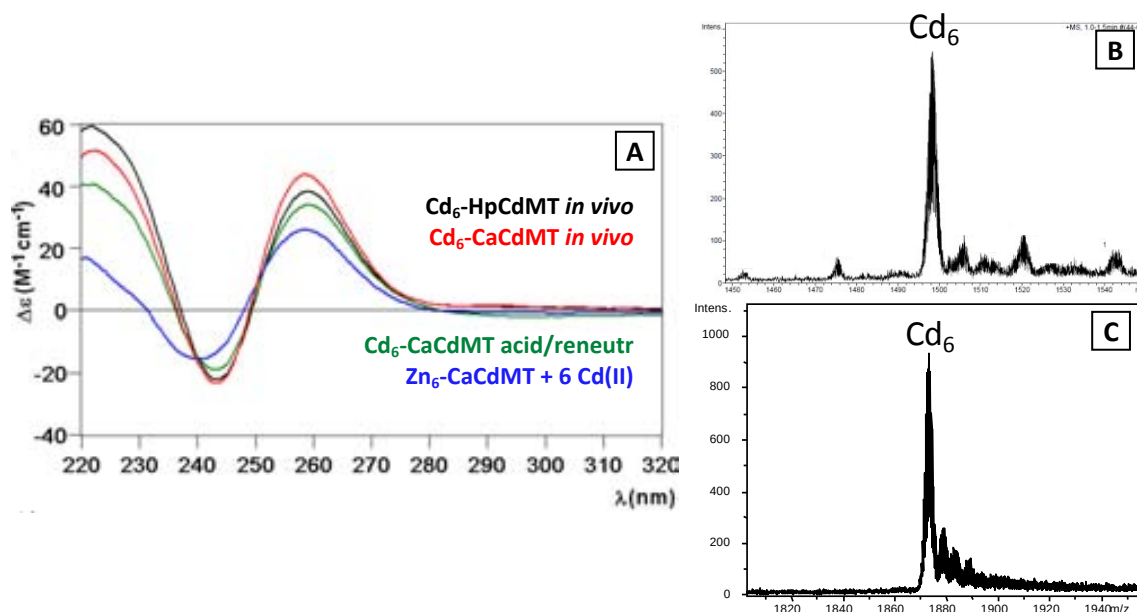


Fig. 35. (A) Espectres de DC de l'espècie única Cd₆-HpCdMT (negre) i Cd₆-CaCdMT (vermell) obtingudes a partir de la síntesi recombinant d'aquestes proteïnes en medis de cultiu rics en Cd(II), i els corresponents al procés d'acidificació i reneutralització del complex Cd₆-CaCdMT *in vivo* (verd) i de la valoració de l'espècie Zn₆-CaCdMT recombinant després d'afegir 6 eq de Cd(II) (blau). Espectres d'ESI-MS enregistrats per l'espècie Cd₆-CaCdMT *in vivo* acidificada i reneutralitzada a pH 7.0 (B) i de la valoració de l'espècie Zn₆-CaCdMT obtinguda de forma recombinant en afegir 6 eq de Cd(II) (C).

Per contra, l'estudi del bescanvi metàl·lic Zn^{II}/Cd^{II} en les isoformes CaCdCuMT i CaCuMT, a partir de les seves formes Zn-MT *in vivo* (**Annex 7.1.2., Làmina 7.1.2.2 i 7.1.2.3**), mostra que en addicionar Cd(II) no s'assoleix la saturació dels espectres de DC en cap de les dues valoracions. Tot i això, sí succeeix en els espectres d'UV-Vis per als 5 eq de Cd(II) afegits, on l'especiació de les mostres està representada per una mescla amb una gran varietat de complexos Cd-MT (**Fig. 36B i C**), la qual pateix lleugeres variacions en la intensitat de les espècies quan s'afegeix més Cd(II). Els espectres de DC enregistrats després de l'addició de 5 eq de Cd(II) (**Fig. 36A**) a ambdues isoformes presenten una banda gaussiana a 250 nm (positiva i molt poc intensa per CaCuMT i negativa per CaCdCuMT) corresponent als cromòfors Cd-Scys, juntament amb una segona banda a 270-280 nm present en totes dues empremtes, corresponent a la presència de cromòfors Cd-S²⁻, indicant d'aquesta manera la probable presència de S²⁻ inorgànic en les preparacions inicials Zn-CaMT, tot i que per a la preparació Zn-CaCdCuMT no hi havia altres evidències que ho confirmessin (no es van detectar ni per ICP-AES ni per ESI-MS). Pel que fa a la reproducció de les preparacions Cd-MT *in vivo* a partir del desplaçament Zn^{II}/Cd^{II}, tot i que durant la valoració de Zn-CaCuMT es van poder registrar espectres de DC semblants als de Cd-CaCuMT *in vivo* (**Fig. 37A**), fet no observat en la valoració de Zn-CaCdCuMT (**Fig. 37B**), la baixa especificitat per Cd(II) d'aquestes dues proteïnes es veu reflectida en l'enregistrament d'uns espectres de DC poc intensos i poc definits, un efecte més important en el cas de CaCuMT. Els espectres d'ESI-MS

enregistrats en tots els punts d'ambdues valoracions indiquen la presència d'una mescla de varis complexos metàl·lics de molt baixa intensitat, probablement degut a que les espècies presents són poc estables en les condicions d'ESI-MS assajades.

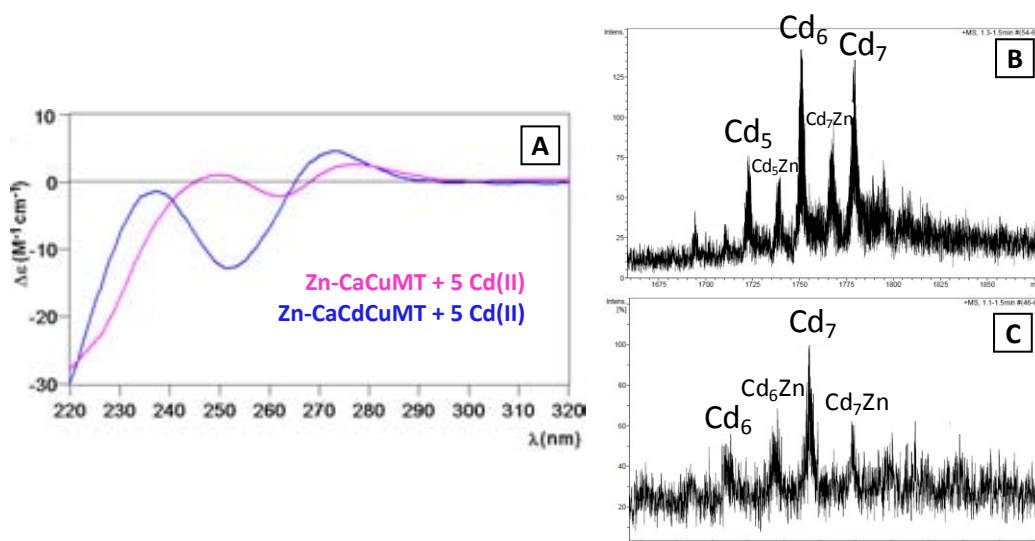


Fig. 36. (A) Espectres de DC corresponents a la valoració de les preparacions Zn-CaCuMT (rosa) i Zn-CaCdCuMT (blau) en afegir-hi 5 eq de Cd(II) a cadascuna. Espectres d'ESI-MS enregistrats després d'addicionar 6 eq de Cd(II) a una solució de les preparacions Zn-CaCuMT (B) i Zn-CaCdCuMT (C).

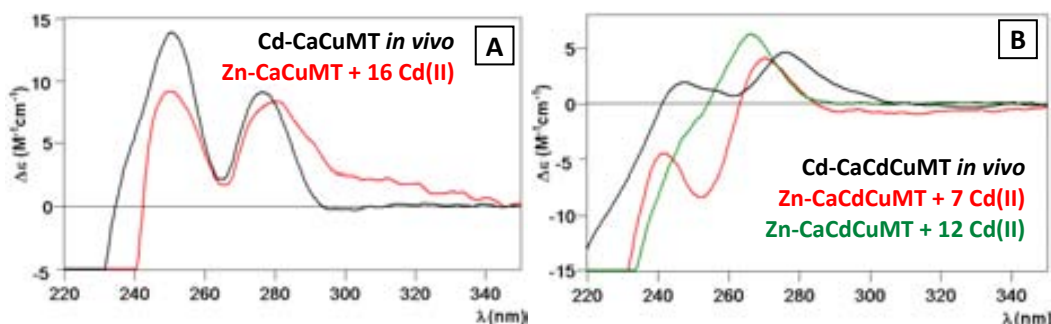


Fig. 37. (A) Espectres de DC corresponents a la preparació recombinant Cd-CaCuMT (negre) i el resultat de la valoració de la bioproducció de Zn-CaCuMT després d'afegir 16 eq de Cd(II) multiplicat per 2,5 (vermell). (B) Espectres de DC de la preparació de Cd-CaCdCuMT en un medi de cultiu ric en Cd(II) (negre) i els enregistrats en afegir 7 (vermell) i 12 eq de l'ió Cd(II) (verd) a una solució de la preparació Zn-CaCdCuMT recombinant.

3.1.2.3. Comportament de les isoformes CaMTs envers Cu(I)

Totes 3 isoformes d'MT de l'organisme *C. aspersum* van ser biosintetitzades en medis de cultiu rics en Cu(II) sota dues condicions d'oxigenació diferents, normal i baixa, per tal d'obtenir els corresponents complexos Cu-CaMTs *in vivo*. La caracterització química d'aquests aporta informació valuosa sobre la coordinació a l'ió Cu(I) en medis fisiològics de les diferents metal·lotioneïnes.

La bioproducció de la isoforma CaCdMT, que en base a les dades anteriors mostra una gran preferència pels ions metàl·lics divalents Zn(II) i Cd(II), presenta sota totes dues condicions d'oxigenació la formació d'una mescla d'espècies heterometàl·liques Zn_xCu_y -CaCdMT (on $x+y$ té un valor que varia de 8 a 12) (**Fig. 38B i E**). La principal diferència entre aquestes dues bioproduccions és que la síntesi a baixa oxigenació conté una major quantitat de Cu(I) i menor

de Zn(II) que en condicions d'oxigenació normal, segons les dades d'ICP-AES (**Taula 11**), donant lloc així a la formació de complexos de major contingut en Cu(I) (**Fig. 38E i F**). Quan es compararen els espectres de DC d'ambdues produccions (**Fig. 38A i D**) s'observa una gran similitud en les seves absorcions, mostrant una banda (un colze) a 240 nm i dues absorcions addicionals, una positiva *ca.* 260 nm i una altra negativa per sobre dels 280 nm, típiques de la coordinació a Cu(I) a les MTs. No obstant, aquestes dues empremtes de DC difereixen en la seva intensitat, essent més gran en el cas dels complexos *in vivo* biosintetitzats en condicions d'oxigenació normal, indicant així un major grau de replegament o estructuració. La raó de que es formin compostos més ben estructurats en condicions d'oxigenació normal podria trobar-se en un major contingut en Zn(II) a la mostra, que amb la seva coordinació tetraèdrica probablement provoqui la formació d'uns agregats metàl·lics més rígids.

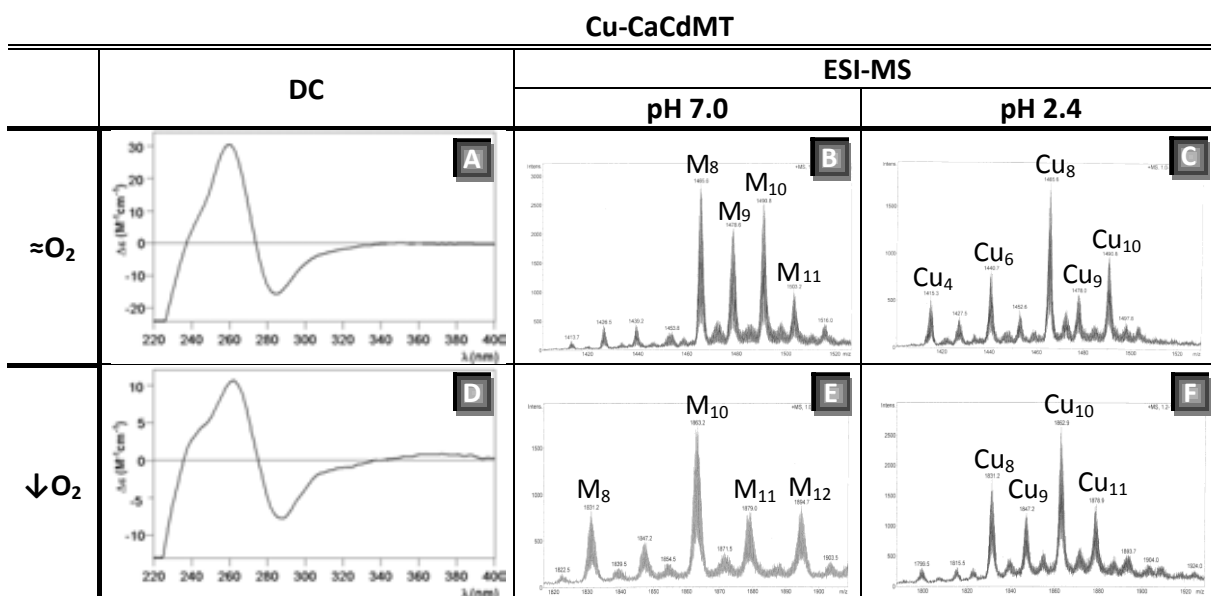


Fig. 38. Espectres de DC (**A i D**) i d'ESI-MS (**B, C, E i F**) enregistrats a pH 7.0 i 2.4 corresponents a la caracterització de les respectives preparacions recombinants de la isoforma CaCdMT en medis de cultiu rics en Cu(II) en dos condicions d'oxigenació, normal ($\approx O_2$) i baixa ($\downarrow O_2$).

			Cu-CaCdMT	Cu-CaCdCuMT	Cu-CaCuMT
$\approx O_2$	ICP _{conv}	[prot] (M)	0.90×10^{-4}	1.83×10^{-4}	1.51×10^{-4}
		Zn/MT	2.2	1.1	1.3
		Cd/MT	<L.D.	<L.D.	<L.D.
		Cu/MT	6.8	10.8	10.0
$\downarrow O_2$	ICP _{conv}	[prot] (M)	1.10×10^{-4}	0.45×10^{-4}	0.77×10^{-4}
		Zn/MT	1.2	<L.D.	<L.D.
		Cd/MT	<L.D.	<L.D.	<L.D.
		Cu/MT	8.8	12.3	13.5

Taula 11. Recull de les dades d'ICP-AES en condicions convencionals (les àcides no es mostren ja que no presenten diferències significatives) obtingudes en la caracterització de les bioproduccions recombinants en medis rics en Cu(II) en ambdós condicions d'oxigenació, normal ($\approx O_2$) i baixa ($\downarrow O_2$), de les tres isoformes d'MT, CaCdMT, CaCdCuMT i CaCuMT, de l'organisme *C. aspersum*. Les sigles <L.D. signifiquen que la mesura es troba per sota del límit de detecció.

En les preparacions recombinants de Cu-CaCdCuMT i Cu-CaCuMT es van obtenir resultats comparables, amb lleugeres diferències. Es detecta que en aquestes bioproduccions hi ha una gran dependència entre la formació dels complexos Cu-MT i el nivell d'oxigenació en els medis de cultiu emprats. Els complexos Cu-MT *in vivo* obtinguts en condicions d'oxigenació normal corresponen principalment a agregats homometàl·lics Cu₁₂⁻ i Cu₁₀⁻ per ambdues isoformes, i acompanyades per petites quantitats d'altres espècies heterometàl·liques de Zn(II) i Cu(I), segons la informació aportada pels espectres d'ESI-MS enregistrats a pH 2.4 i pH 7.0 (**Fig. 39, Fig. 40**). Per altra banda, a baixa oxigenació es formen complexos homometàl·lics, l'espècie única Cu₁₂-CaCuMT i la mescla de Cu₁₀⁻ a Cu₁₄-CaCdCuMT, amb una absència total de Zn(II) i una concentració de proteïna més baixa, segons les dades d'ICP-AES. En la comparació dels espectres de DC es pot observar una gran similitud en el número i la posició dels senyals (característics dels complexos Cu-MT) que presenten les empremtes de totes 4 produccions. Concretament, es pot apreciar una similitud molt més gran entre les produccions Cu-CaCdCuMT i Cu-CaCuMT obtingudes en les mateixes condicions d'oxigenació, indicant així que el grau d'oxigenació determina força l'estructuració dels agregats. D'aquesta manera els complexos formats a oxigenació normal presenten unes bandes més intenses i definides que les dutes a terme a baixa oxigenació, al igual que en la producció Cu-CaCdMT, probablement també degut a la presència de Zn(II) coordinat.

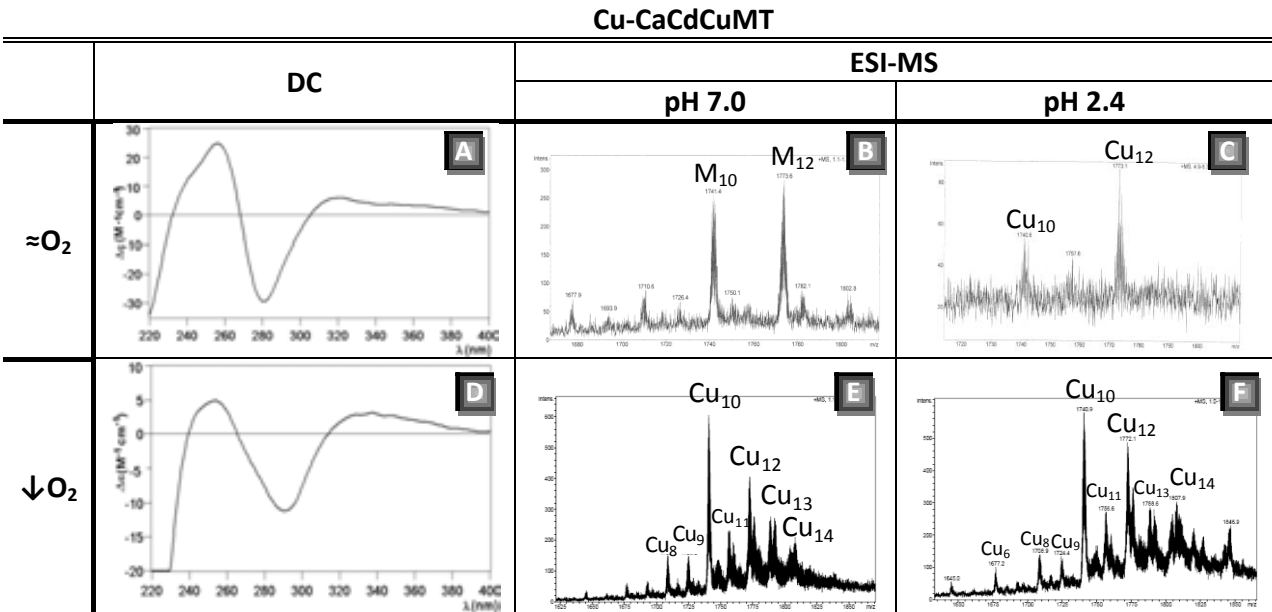


Fig. 39. Espectres de DC (**A** i **D**) i d'ESI-MS (**B**, **C**, **E** i **F**) enregistrats a pH 7.0 i 2.4 corresponents a la caracterització de les respectives preparacions recombinants de la isoforma CaCdCuMT en medis de cultiu rics en Cu(II) en dos condicions d'oxigenació, normal (≈O₂) i baixa (↓O₂).

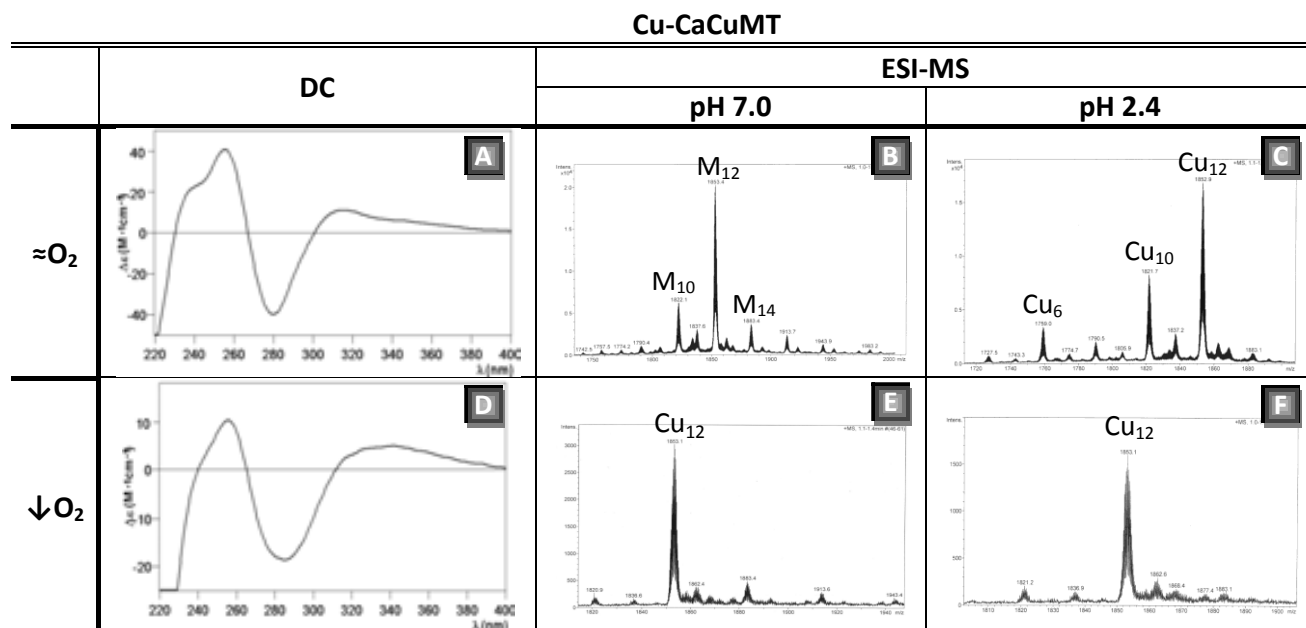


Fig. 40. Espectres de DC (A i D) i d'ESI-MS (B, C, E i F) enregistrats a pH 7.0 i 2.4 corresponents a la caracterització de les respectives preparacions recombinants de la isoforma CaCuMT en medis de cultiu rics en Cu(II) en dos condicions d'oxigenació, normal ($\approx O_2$) i baixa ($\downarrow O_2$).

Es van estudiar les propietats de coordinació *in vitro* a Cu(I) de les diferents isoformes d'MT de *C. aspersum* a través d'una valoració on es provoca el desplaçament metàl·lic de Zn(II), inicialment enllaçat a la proteïna, per addició de diferents equivalents d'un complex de Cu(I). Les dades experimentals obtingudes en la valoració de l'espècie Zn₆-CaCdMT *in vivo* amb Cu(I) (**Annex 7.1.2., làmina 7.1.2.4**) mostren una baixa preferència d'aquesta isoforma per a formar espècies estables quan enllaça Cu(I), en un procés molt similar a la valoració amb aquest metall de la Cd-MT del cargol terrestre *H. pomatia* descrit anteriorment (**Apartat 3.1.1.2.**). En cap cas es va observar la formació d'un complex Cu-CaCdMT amb especial estabilitat o rellevància, obtenint-se sempre una mescla de diverses espècies. Tot i que s'aconsegueix reproduir els espectres de DC i l'especiació obtinguda en les bioproduccions de Cu-CaCdMT (**Fig. 41**, on s'observa la reproducció dels espectres de DC de la producció Cu-CaCdMT a oxigenació normal quan s'addicionen 13 eq de Cu(I) a Zn-CaCdMT, i la reproducció de l'especiació dels complexos Cu-CaCdMT obtinguts *in vivo* a baixa oxigenació per 8 eq de Cu(I) afegits), els espectres d'ESI-MS mostren la dificultat de desplaçar el Zn(II) inicialment enllaçat, que no s'aconsegueix en cap cas, i la desestructuració dels complexos metàl·lics formats més enllà de l'addició de 14 eq de Cu(I), amb l'aparició de l'apo-proteïna.

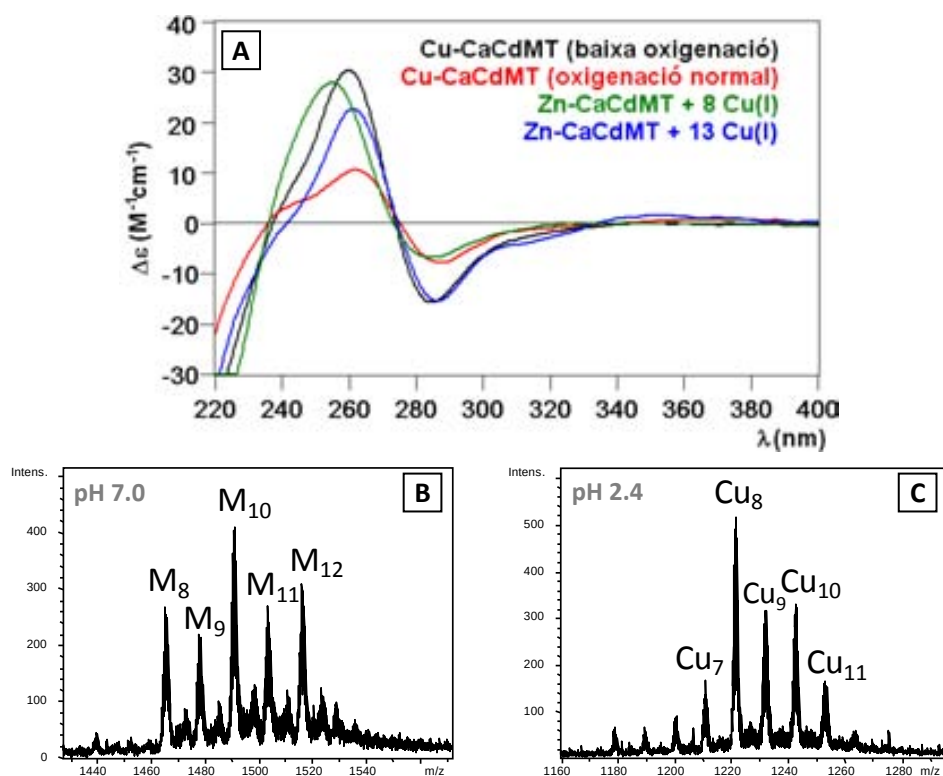


Fig. 41. (A) Espectres de DC corresponents a les produccions recombinants de CaCdMT en medis rics en Cu(I) a baixa oxigenació (negre) i oxigenació normal (vermell), així com els enregistrats en la valoració de l'espècie única Zn₆-CaCdMT amb Cu(I) en afegir 8 (verd) i 13 (blau) eq de Cu(I) afegits. Espectres de masses enregistrats a pH 7.0 (B) i a pH 2.4 (C) corresponents a l'addició de 8 eq de Cu(I) a una solució de Zn₆-CaCdMT *in vivo*.

En el cas de les altres dues isoformes, CaCdCuMT i CaCuMT, que ja presentaven amb Zn(II) i Cd(II) característiques atribuïbles a pèptids amb caràcter de Cu-tioneïna, es confirma la seva preferència per enllaçar Cu(I) amb els experiments de desplaçament metàl·lic Zn^{II}/Cu^I (Annex 7.1.2., làmina 7.1.2.5 i 7.1.2.6). Si bé cadascuna d'elles presenta trets característics i diferenciats, en tots dos casos s'observa la formació d'un primer senyal de DC característic i habitual quan Cu(I) s'enllaça a les MTs,^[91] després d'afegir el primer equivalent de Cu(I) a les respectives solucions de Zn-CaMT. Posteriors addicions de Cu(I), aproximadament fins a 10 eq per la isoforma CaCuMT i 7 eq per la CaCdCuMT, provoquen el creixement dels senyals prèviament formats conservant-se el mateix nombre de bandes i en les mateixes posicions observades per als primers equivalents. A partir d'aquests punts de la valoració, l'excés de Cu(I) provoca que les bandes de DC formades comencin a decreixer en intensitat i en tots dos casos comença a formar-se un colze a una longitud d'ona d'aproximadament 230 nm. Els espectres d'ESI-MS d'aquesta darrera fase de la valoració indiquen la desestructuració dels clústers formats, donant lloc en tots els casos a espècies amb menor contingut metàl·lic i fins i tot l'apo-forma. Finalment, en referència als senyals de DC observats, la similitud observada entre les enregistrades en ambdues valoracions és indicativa de la formació d'espècies amb un plegament en solució molt semblant.

En el cas concret de la valoració amb Cu(I) de la preparació Zn-CaCdCuMT, ha estat possible reproduir els espectres de DC dels complexos Cu-CaCdCuMT *in vivo* obtinguts en condicions de normal i baixa oxigenació, en concret, en l'addició de 8 i 11 eq de Cu(I), respectivament (**Fig. 42A**), tot i que l'especiació observada no correspongui amb la determinada *in vivo* (**Fig. 42B i D**). En l'anàlisi dels espectres de masses es detecta, després d'afegir a la solució 10 eq de Cu(I), per primera vegada l'espècie Cu₁₂-CaCdCuMT com a complex majoritari (juntament amb Cu₁₀-CaCdCuMT) d'una mescla de diferents espècies (**Fig. 42C i E**). L'estudi de les espècies identificades en solució per ESI-MS també mostra la necessitat d'addicionar fins a 12 eq de Cu(I) per desplaçar tot el Zn(II) inicialment enllaçat a la proteïna, a més de la presència en tots els estadis de la valoració d'una mescla de diferents espècies. El conjunt de dades indiquen la no existència d'una única espècie amb especial preferència i estabilitat.

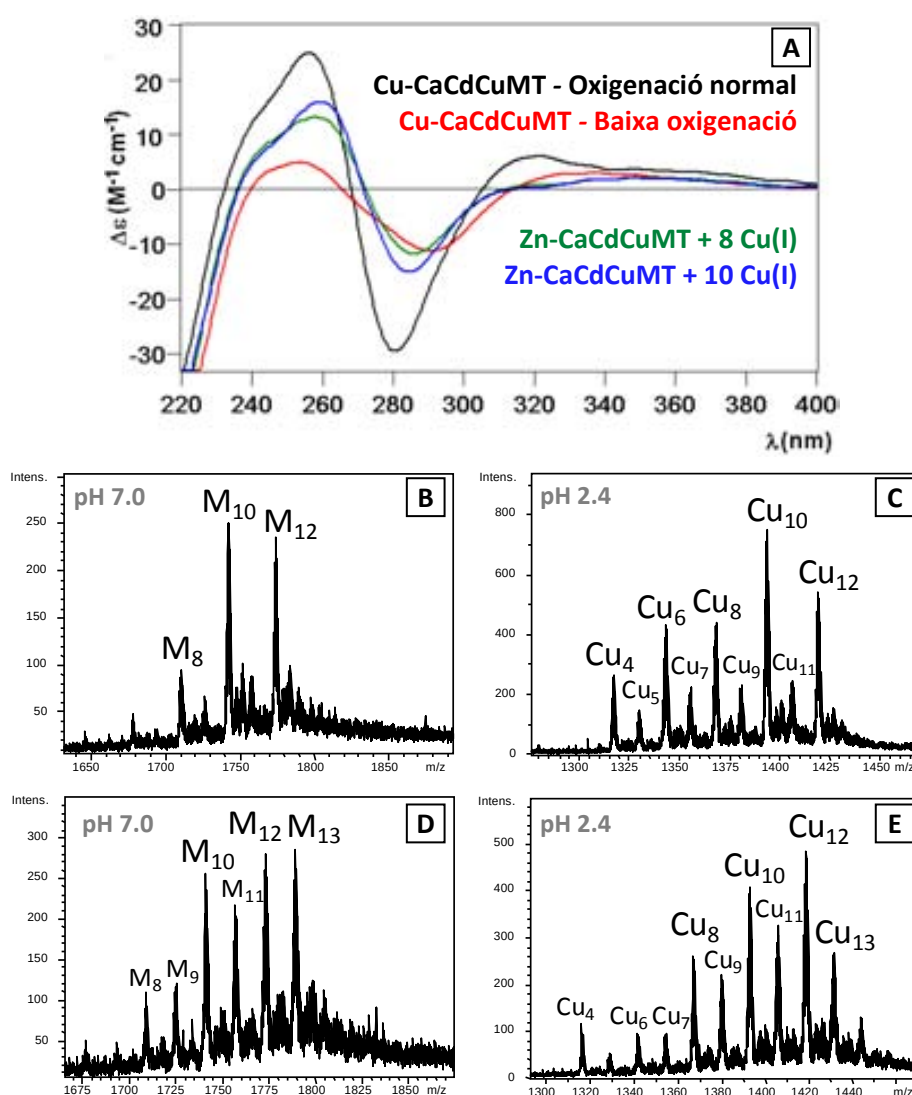


Fig. 42. (A) Espectres de DC corresponents a les produccions recombinants de CaCdCuMT en medis rics en Cu(I) a baixa oxigenació (vermell) i normal (negre), així com els enregistrats en la valoració de Zn-CaCdCuMT amb Cu(I) en afegir 8 (verd) i 10 (blau) eq de Cu(I). Espectres de masses enregistrats a pH 7.0 (B i D) i a pH 2.4 (C i E) corresponents a l'addició de 8 (B i D) i 10 eq (C i E) de Cu(I) a una solució de Zn-CaCdCuMT *in vivo*.

Per altra banda, mitjançant la valoració de Zn-CaCuMT amb Cu(I) va ser possible reproduir l'empremta de DC de l'espècie Cu_{12} -CaCuMT sintetitzada en condicions d'oxigenació normal, després d'afegir 11-12 eq de Cu(I) (**Fig. 43A**). Tot i així, la intensitat de l'espectre és menor que l'enregistrat per a la mostra *in vivo*, indicatiu d'un menor grau d'estructuració del clúster format *in vitro*. En aquest punt de la valoració tot el Zn(II) inicialment enllaçat ha estat desplaçat pel Cu(I), formant-se en solució pràcticament com a espècie única el complex Cu_{12} -CaCuMT (**Fig. 43B i C**). Les dades d'ESI-MS mostren com en addicions posteriors de Cu(I), si bé aquesta espècie Cu_{12} -MT sembla formar-se amb una especial preferència, no és estable en un medi amb excés de Cu(I). S'observa la desestructuració d'aquesta per donar lloc a una mescla de complexos de menor contingut metàl·lic. En base a les dades obtingudes, especialment l'obtenció de l'espècie Cu_{12} -CaCuMT en les preparacions recombinants en ambdues condicions d'oxigenació, i també el fet de reproduir l'espècie Cu_{12} -CaCuMT a partir de la preparació Zn-CaCuMT amb propietats similars a les de l'espècie sintetitzada *in vivo*, es pot afirmar que la proteïna CaCuMT presenta preferència per a enllaçar Cu(I), amb l'espècie Cu_{12} -CaCuMT com la més afavorida tant en medis fisiològics com *in vitro*, encara que aquesta només seria estable en excés de Cu(I) quan es trobés en un medi cel·lular i no extracel·lular, com indica la formació de dita espècie en les preparacions de Cu-CaCuMT recombinants en condicions de baixa oxigenació, on hi ha un nivell de Cu(I) disponible més elevat, i la no estabilitat d'aquesta espècie Cu_{12} -CaCuMT formada pel desplaçament de $\text{Zn}^{II}/\text{Cu}^I$ de forma *in vitro*.

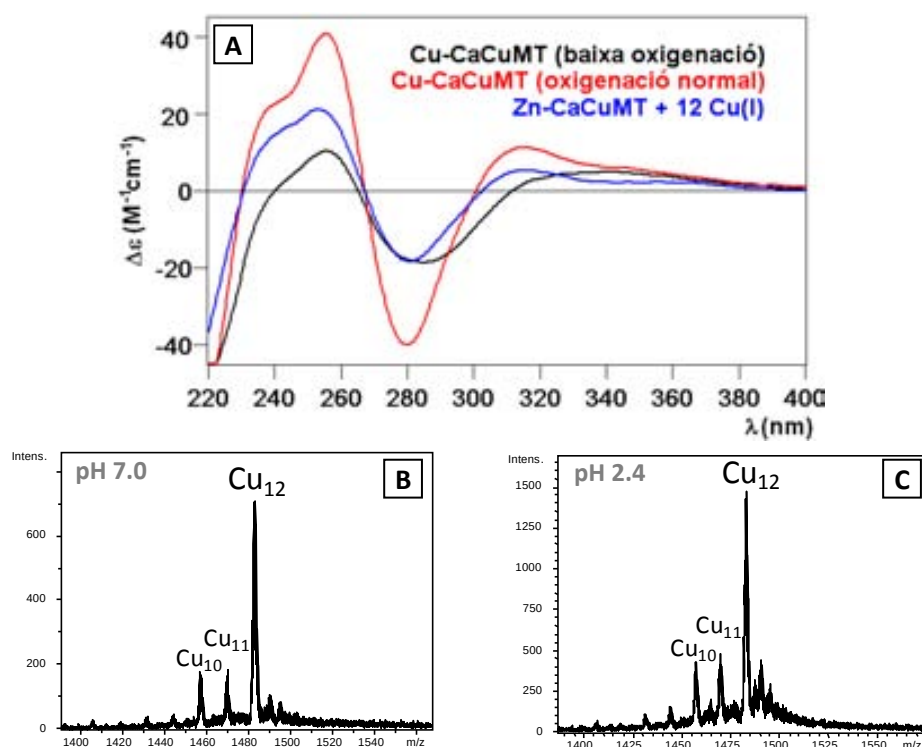


Fig. 43. Espectres de DC (A) corresponents a les produccions recombinants de CaCuMT en medis rics en Cu(I) a baixa oxigenació (negre) i normal (vermell), així com l'enregistrat en la valoració de la preparació recombinant de Zn-CaCuMT amb Cu(I) després d'afegir 12 (blau) eq de Cu(I). Espectres de masses enregistrats a pH 7.0 (B) i a pH 2.4 (C) corresponents a l'addició de 12 eq de Cu(I) a una solució de Zn-CaCuMT *in vivo*.

Finalment, el conjunt de resultats obtinguts en aquest estudi, tant pel que fa a les bioproduccions en medis enriquits amb els diferents ions metàl·lics estudiats com en les valoracions de les formes Zn-CaMT amb Cd(II) i Cu(I), permet concloure que, de les tres isoformes d'MT presents en els teixits del cargol terrestre *C. aspersum*, CaCdMT és la que presenta un major caràcter de Zn/Cd-tioneïna, donant lloc a les espècies M_6 -CaCdMT ($M = \text{Zn}$ o Cd) *in vivo* i l'espècie Cd_6 -CaCdMT per desplaçament de Zn(II). Per altra banda, la coordinació a Cu(I) sempre dóna lloc a la formació d'una mescla amb coexistència de diversos agregats Cu-MT, el contingut de les quals depèn fortament de la quantitat de Cu(I) present en el medi. En el cas de les altres dues isoformes, CaCuMT i CaCdCuMT, si bé és clar que tenen una baixa preferència pels ions divalents, és raonable concloure que presenten un marcat caràcter de Cu-tioneïna, ja que és possible obtenir preparacions de complexos Cu-MT en medis de cultiu amb diferents graus d'oxigenació corresponents a una mescla de poques espècies, o inclús, amb una espècie única de complexos homometàl·lics de Cu(I). No obstant, la major diferència entre elles és l'obtenció de l'espècie única Cu_{12} -CaCuMT, tant *in vivo* com *in vitro*, fet no observat en la isoforma CaCdCuMT, suggerint així un caràcter més marcat de Cu-tioneïna, pràcticament extrem, per a la isoforma CaCuMT.

Cal aquí considerar que l'anàlisi de les estructures primàries d'aquestes 3 isoformes d'MT del cargol terrestre *C. aspersum* indica, com ja s'ha comentat anteriorment, que tant el nombre de Cys com les posicions relatives dins la cadena són pràcticament idèntiques, per tant, les clares diferències observades entre aquestes proteïnes, especialment pel que fa al caràcter de Zn- i Cu-tioneïna, no poden ser degudes a res més que als aminoàcids no coordinants presents en la composició primària de les mateixes. Aquest fet, també observat en altres MTs, com en el cas de *H. pomatia*, posa un cop més de manifest la importància del conjunt d'aminoàcids que conformen la proteïna, no només els que tenen propietats coordinants.

3.1.3. Estudi de la capacitat coordinant de la metal·lotioneïna del gastròpode marí

Megathura crenulata: McMT

En aquest apartat es presenten els resultats obtinguts en l'estudi de les propietats coordinants de l'única isoforma d'MT trobada en el barretet marí *Megathura crenulata*, McMT (**Introducció, Apartat 1.2.1.2**). L'interès en estudiar l'MT d'aquest gastròpode marí rau en el fet que aquest no mostra cap tipus de polimorfisme, només una isoforma, a diferència del que s'ha observat en el sistema d'MTs d'altres mol·luscs, com són els gastròpodes pulmonats o terrestres *Helix pomatia* i *Cornu aspersum*.

3.1.3.1. Comportament de McMT envers Zn(II)

De forma anàloga a com s'ha fet en l'estudi de totes les altres isoformes d'MT presentades en aquesta Tesi Doctoral, es du a terme la síntesi recombinant de McMT en un medi suplementat amb Zn(II). Mitjançant ESI-MS es va determinar l'espècie majoritària $\text{Zn}_6\text{-McMT}$ acompanyada de les espècies minoritàries $\text{Zn}_5\text{-}$ i $\text{Zn}_4\text{-McMT}$ (**Fig. 44A**). És rellevant remarcar que l'especiació és semblant a la que s'ha obtingut en les bioproduccions en medis de cultiu rics en Zn(II) d'altres isoformes CdMT (com HpCdMT i CaCdMT) d'altres organismes estretament relacionats, com *H.pomatia* i *C.aspersum*. Per altra banda, aquesta similitud no es veu reflectida en el seu espectre de DC (**Fig. 44. B**), que mostra una empremta inusual, amb dues absorcions positives a 230 i 245 nm. Aquest màxim a 230 nm, que també va ser observat en la síntesi recombinants de Zn- β ckMT (**Fig. 3C de l'Article 5**), el domini β de l'MT de pollastre,^[109] no pot ser atribuïble a lligands Cl^- (absència de colzes a 240 nm als espectres d'UV-Vis^[87]) ni S^{2-} ^[88] i per tant, han de correspondre a contribucions dels aminoàcids de la seva seqüència a longituds d'ona més grans de les habituals.

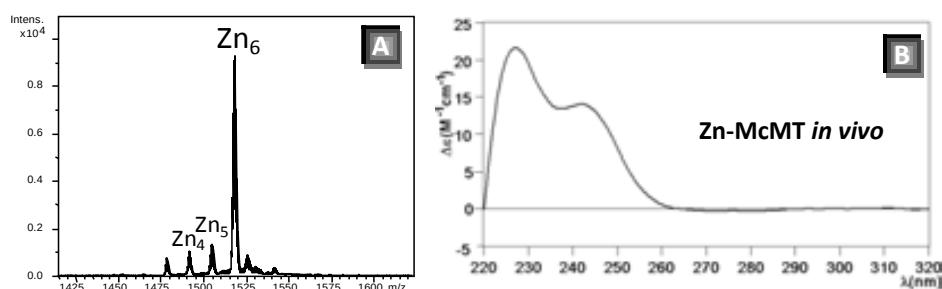


Fig. 44. Espectres de (B) ESI-MS i (A) DC de la preparació recombinant de McMT en medis rics en Zn(II). Les dades d'ICP-AES, amb una relació Zn/MT de 5.6, confirmen el contingut metàl·lic observat per ESI-MS.

3.1.3.2. Comportament de McMT envers Cd(II)

Anàlogament al que succeeix en les bioproduccions de les isoformes HpCdMT i CaCdMT dels cargols terrestres *H.pomatia* i *C.aspersum*, *in vivo* es va obtenir l'espècie $\text{Cd}_6\text{-McMT}$ com a complex majoritari en solució (**Fig. 45**). Tot i així, també s'observen certes diferències amb les proteïnes dels cargols esmentats, principalment la detecció, per ESI-MS, d'altres espècies minoritàries, algunes d'elles sulfurades, com $\text{Cd}_7\text{-}$, $\text{Cd}_6\text{S-}$ i $\text{Cd}_6\text{S}_2\text{-McMT}$. La presència d'una petita quantitat de lligands sulfur va ser confirmada tant per ICP-AES (**Taula 12**), amb la divergència entre els valors d'ICP en ambdues condicions (normal i àcid), com per la presència d'absorcions en els espectres de DC i UV-Vis a longituds d'ona superiors a 280 nm, i que corresponen a la presència de cromòfors Cd-S^{2-} . La presència de lligands sulfur addicionals, que és un tret característic del comportament de les Cu-tioneïnes, es veu novament confirmat per l'evolució que pateix la mostra, bàsicament canvis en la seva especiació i en el seu espectre de DC, al llarg del temps (**Fig. 3B de l'Article 5**). Aquesta evolució amb el temps, que ja havia estat descrita

prèviament per d'altres isoformes d'MT amb un caràcter extrem de Cu-tioneïna, com són la Cup1^[159] i les isoformes HpCuMT i la CaCuMT descrites anteriorment, confirma doncs un cert caràcter de Cu-tioneïna de McMT.

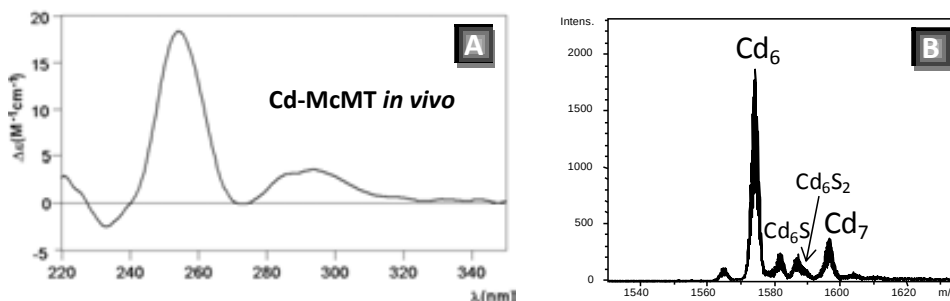


Fig. 45. Espectres de (A) DC i (B) ESI-MS de la preparació recombinant de la proteïna McMT obtinguda en medis rics en Cd(II).

Cd-McMT		
	Normal	Àcid
[prot] (M)	0.76×10^{-4}	0.72×10^{-4}
Zn/MT	<L.D.	<L.D.
Cd/MT	6.7	9.1

Taula 12. Resultats d'ICP-AES de la biosíntesi de la proteïna McMT en medis rics en Cd(II) mesurats en condicions normals i en condicions àcides. Les sigles <L.D. indiquen valors per sota del límit de detecció.

Quan s'estudia el bescanvi metàl·lic de Zn(II) per Cd(II) a partir de Zn₆-McMT obtinguda *in vivo* (**Annex 7.1.3., làmina 7.1.3.1**), els resultats obtinguts indiquen que es possible reproduir l'especiació observada en la bioproducció de Cd-McMT (**Fig. 46C**). Tot i així, l'espectre de DC no és anàleg a l'enregistrat per a les bioproduccions de Cd-McMT ja que tan sols es reproduïx lleugerament l'absorció en la regió *ca.* 250 nm (**Fig. 46A**). És rellevant comentar que l'addició de Na₂S just després de l'addició de 6 eq de Cd(II) (**Article 5, Fig. S1**) provoca canvis en l'espectre de DC, donant lloc a l'aparició d'una absorció a 290 nm, corresponent a la constitució d'algun dels cromòfors Cd-S²⁻-McMT també observats *in vivo*. Finalment, a diferència de l'observat en les valoracions de les isoformes CaCdMT i HpCdMT, l'addició d'un excés de Cd(II) dóna lloc a la formació de complexos Cd-McMT amb major contingut en Cd(II) (espècies Cd₇- i Cd₈-, (**Annex 7.1.3., làmina 7.1.3.1**), indicant així la menor estabilitat de l'espècie Cd₆-McMT formada, en comparació amb les Cd₆-HpCdMT i Cd₆-CaCdMT.

Així mateix i mitjançant el mateix procediment seguit per altres MTs (**Apartat 3.1.1 i 3.1.2**) es va procedir a l'acidificació i reneutralització dels complexos Cd-McMT formats *in vivo* (**Article 5, Fig. S2**). Els resultats així obtinguts permeten observar la formació d'una mescla d'espècies que van de Cd₃- a Cd₇-McMT, i que, ni tan sols després de l'addició d'anions S²⁻ a la solució, permeten reproduir l'empremta de DC inicial de la preparació Cd-McMT (**Fig. 46B**).

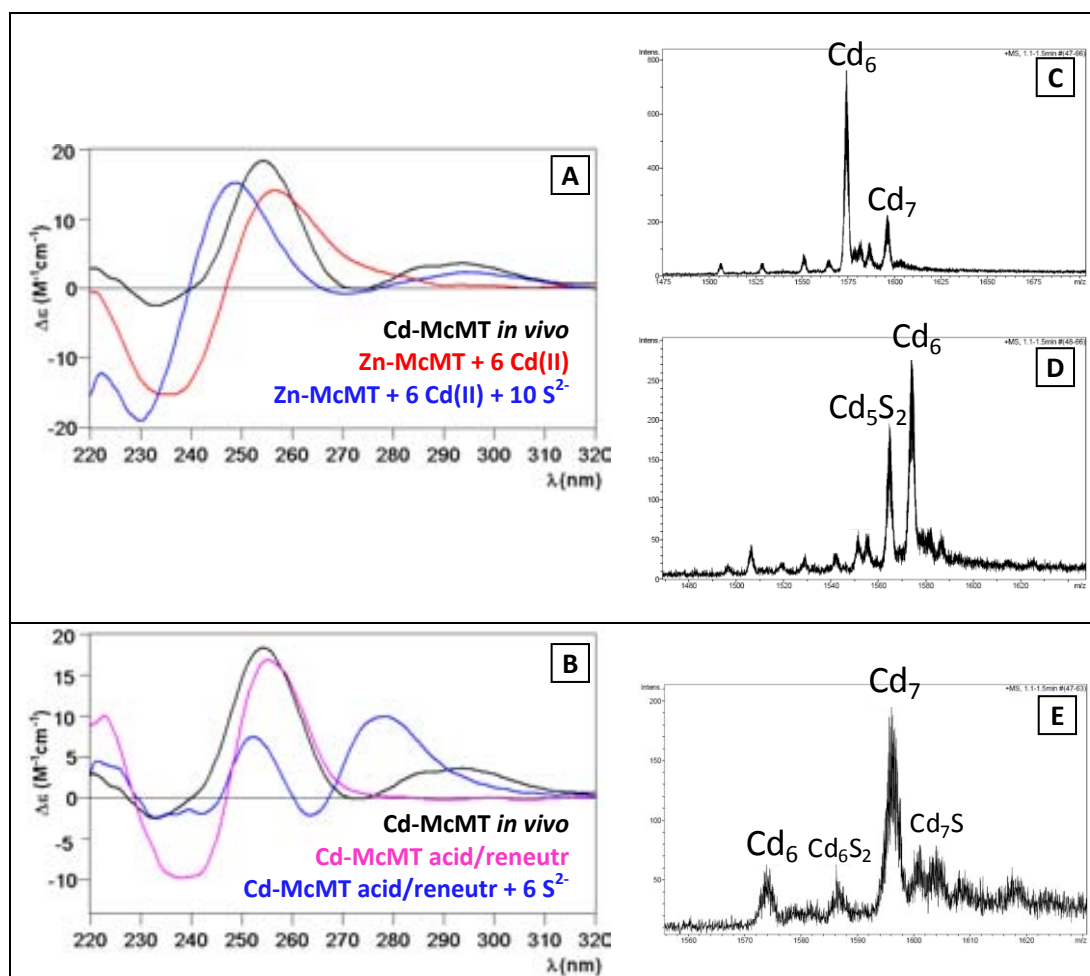


Fig. 46. (A) Espectres de DC de la preparació Cd-McMT *in vivo* (negre), de l'addició de 6 eq Cd(II) a Zn-McMT (vermell) i 10 eq (blau) de Na₂S. (B) Espectres de DC de la preparació Cd-McMT *in vivo* (negre), l'obtingut després d'acidificar i reneutralitzar aquesta mostra (rosa) i la mostra reneutralitzada després de l'addició de 6 eq de Na₂S (blau). (C) Espectre d'ESI-MS obtingut en l'addició de 6 eq Cd(II) a Zn-McMT i (D) l'espectre corresponent a l'addició de 2 eq de Na₂S a la solució anterior. (E) Espectre d'ESI-MS obtingut després de l'addició de 10 eq de Na₂S a la solució Cd-McMT *in vivo* acidificada i reneutralitzada.

3.1.3.3. Comportament de McMT envers Cu(I)

Seguint l'estratègia experimental habitual per a la caracterització de les habilitats coordinants de les diferents MTs presentades en aquesta Tesi (1.3. Disseny experimental), es va realitzar la biosíntesi de la proteïna McMT en medis enriquits en Cu(II) en dues condicions d'oxigenació, normal i baixa. Els espectres d'ESI-MS enregistrats per aquestes dues preparacions revelen la formació dels mateixos complexos Cu-McMT (Fig. 47B i C), així com espectres de DC completament equivalents (Fig. 47A). Aquests resultats permeten concloure que el grau d'oxigenació en les bioproduccions de McMT en medis rics en coure no afecta a l'especificació ni al plegament de les espècies obtingudes. Les dades indiquen que tots els complexos formats corresponen a espècies homometàl·liques de Cu(I), tant pel fet que els espectres de masses enregistrats a dos valors de pH (7.0 i 2.4) siguin completament anàlegs, així com per l'absència de Zn(II) confirmada per les dades d'ICP-AES (Taula 13). L'espècie majoritària correspon al complex Cu₈-McMT, si bé acompanyat d'altres agregats i fins i tot s'observa la presència de la

forma apo-McMT, indicant l'existència d'una petita quantitat de complexos homometàl·lics de Zn(II) en solució. El fet que es formin espècies homometàl·liques de Cu(I) en ambdós condicions, indica una certa preferència per enllaçar Cu(I) *in vivo* tot i que aquesta no és molt marcada, ja que no es forma una única espècie d'estabilitat especial.

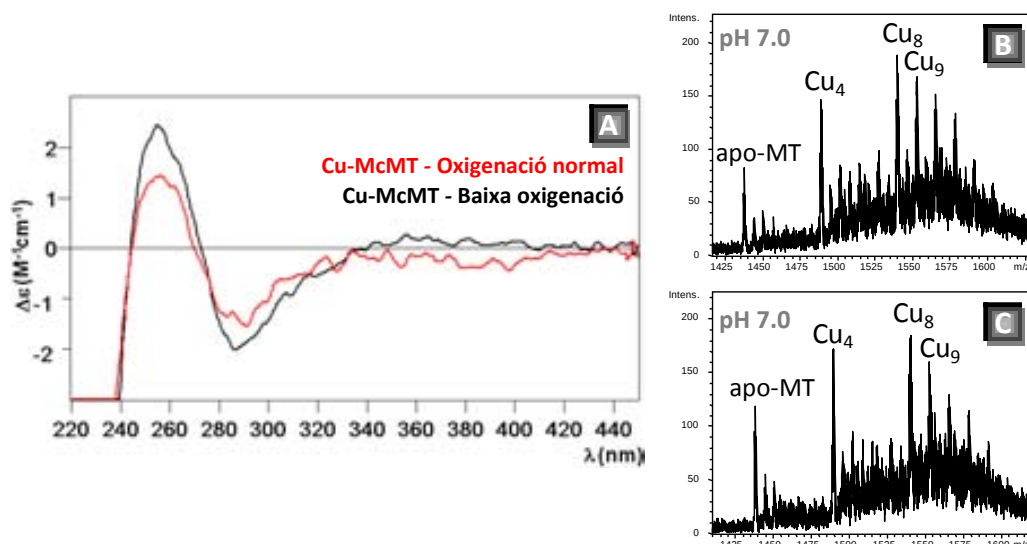


Fig. 47. Espectres de (A) DC i (B i C) d'ESI-MS de les preparacions recombinants de la proteïna McMT obtinguda en medis rics en Cu(II). L'empremta de DC de color vermell correspon a les produccions a oxigenació normal i la de color negre a baixa oxigenació. L'espectre d'ESI-MS a (B) oxigenació normal i el corresponent a la producció a (C) baixa oxigenació enregistrats a pH 7.0 que són completament equivalents als respectius enregistrats a pH 2.4.

Cu-McMT		
	Oxigenació normal	Baixa oxigenació
[prot] (M)	0.36×10^{-4}	0.23×10^{-4}
Zn/MT	<L.D.	<L.D.
Cu/MT	9.6	9.4

Taula 13. Resultats d'ICP-AES de la biosíntesi de la proteïna McMT en medis rics en Cu(II) en ambdós graus d'oxigenació, normal i baixa. Es presenten tan sols les dades obtingudes en l'anàlisi en condicions àcides les quals coincideixen amb les de condicions convencionals. Les sigles L.D. indiquen valors per sota del límit de detecció.

En la valoració de l'agregat Zn₆-McMT amb Cu(I) (**Article 5, Fig. S3**) va ser possible reproduir l'empremta de DC (**Fig. 48A**) i l'especiació (**Fig. 48B i C**) de les preparacions Cu-McMT obtingudes *in vivo* després d'addicionar entre 10 i 12 eq de Cu(I) a Zn-McMT. La necessitat d'afegir entre 8 i 10 eq de Cu(I) per desplaçar tot el Zn(II) inicialment enllaçat i la detecció d'una mescla d'espècies amb una gran varietat de complexos en tots els punts de la valoració són característiques que ens informen sobre la baixa especificitat d'aquesta isoforma pel ió Cu(I). Precisament, quan tot el Zn(II) dels complexos Zn-McMT ha estat desplaçat pel Cu(I) es quan es detecta per primera vegada la presència de la forma apo-MT a l'espectre d'ESI-MS de pH 7.0. Si comparem els espectres d'ESI-MS enregistrats als dos valors de pH, **Fig. 48B i C**, s'observen les mateixes espècies. Tanmateix s'observa que la intensitat de la apo-MT i dels agregats metàl·lics detectats en l'anàlisi de masses a pH 2.4 varia lleugerament, si bé aquest fet és atribuïble a

diferències en les condicions d'espray emprades en els dos tipus de determinació per espectrometria de masses. A partir d'aquest punt de la valoració, el fet d'afegir més equivalents de Cu(I) a la solució provoca una disminució de les absorcions en l'espectre de DC, acompanyada d'un procés de demetal·lació dels complexos formats, fins a l'aparició de la forma apo-MT com espècie majoritària en solució (12-14 eq de Cu(I) afegits), indicant que les espècies formades *in vitro* en estadis anteriors no són estables en condicions d'excés de Cu(I). Aquesta observació permet confirmar que la presència de la forma apo en les produccions recombinants Cu-McMT (en major proporció en condicions de baixa oxigenació on hi ha més ions Cu(I) disponibles intracel·lulars), és deguda a la inestabilitat de les espècies Cu-McMT formades en presència d'un excés de Cu(I).

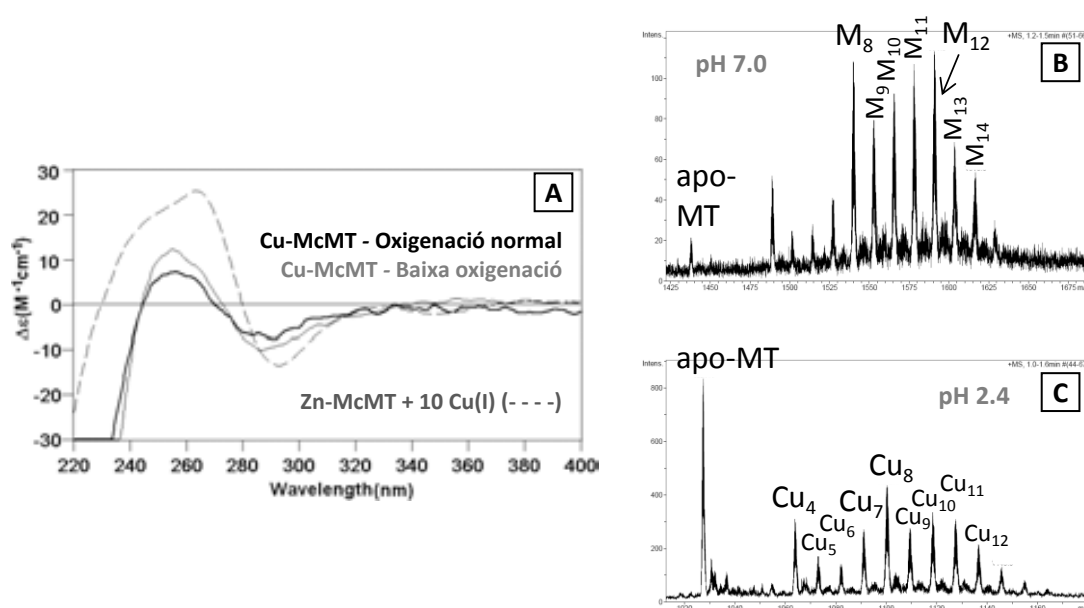


Fig. 48. (A) Espectres de DC corresponents a les preparacions *in vivo* de Cu-McMT en condicions de baixa oxigenació (gris), oxigenació normal (negre) i de l'addició de 10 eq de Cu(I) a Zn₆-McMT (ratllat). Espectres d'ESI-MS enregistrats a pH 7.0 (B) i pH 2.4 (C) corresponents a l'addició de 10 eq de Cu(I).

Considerant el conjunt de resultats anteriorment descrits en la caracterització de la capacitat de coordinació metàl·lica de McMT envers els ions Zn(II), Cd(II) i Cu(I), resulta difícil classificar-la de forma taxativa com a Zn- o Cu-tioneïna extrema. Enfront metalls divalents, Zn(II) i Cd(II), dóna lloc a espècies majoritàries M₆-McMT (M=Zn o Cd), indicant una estabilitat especial d'aquest complex si bé també es detecta la presència de complexos que contenen lligands S²⁻ en les bioproduccions Cd-McMT, comportament típic de les considerades Cu-tioneïnes. En l'estudi de la coordinació de la McMT a Cu(I) la situació és comparable, ja que tot i que les biosíntesis donen lloc a compostos homometàl·lics de Cu(I) (característic de les Cu-tioneïnes) i que es pot reproduir aquest escenari mitjançant la valoració de Zn-McMT amb Cu(I), no és menys cert ni rellevant que sempre s'obté una mescla d'espècies inestables en presència d'excés de Cu, fins i tot detectant-se la forma apo-MT, molt semblant al comportament mostrat per les MTs amb

caràcter de Zn-tioneïna. L'estudi global de McMT permet concloure que aquesta MT presenta una especificitat d'enllaç metàl·lic intermèdia entre Cu- i Zn-tioneïna, amb un comportament comparable al de la isoforma CaCdCuMT aïllada del cargol *C. aspersum* (**Apartat 3.1.2**).

3.1.4. Anàlisi comparativa de la capacitat de coordinació metàl·lica exhibida per les MTs de mol·luscs estudiades

Ja ha estat postulat i plantejat que l'existència de múltiples formes d'MTs al llarg dels diferents fílums de l'arbre de la vida pot ésser conseqüència directa d'un procés d'adaptació molecular evolutiva dels diferents organismes. Aquesta situació és especialment interessant en el cas dels gastròpodes terrestres, els quals van abandonar el medi marí per conquerir el món terrestre (**Introducció, apartat 1.2.1**), sofrint canvis fisiològics importants i imprescindibles per a la seva adaptació al nou hàbitat. Així el polimorfisme d'MT observat en els gastròpodes terrestres pulmonats, en concret *Helix pomatia* i *Cornu aspersum*, constitueix un cas perfecte per estudiar la diversificació evolutiva i la possible divergència funcional de les diferents isoformes d'MT. Aquest estudi adquireix major rellevància en comparar el seu comportament amb el dels gastròpodes marins, els quals han sofert menys pressions evolutives, i en concret, amb la isoforma d'MT del barretet marí *Megathura crenulata* (**Introducció, apartat 1.2.1.2**).

D'aquesta manera, l'estudi extens d'una àmplia gamma de metal·lotioneïnes de mol·luscs seguint el mateix mètode experimental, realitzat en aquesta Tesi Doctoral (**Apartats 3.1.1, 3.1.2 i 3.1.3**), proporciona les condicions òptimes per fer una imatge prou propera sobre el sistema d'MTs que existeix en aquests gastròpodes. L'anàlisi del comportament metàl·lic, *in vivo* i *in vitro*, de les 6 isoformes d'MT estudiades de *H. pomatia*, *C. aspersum* i *M. crenulata*, permet observar certes similituds i divergències. Aquestes observacions obren camí per establir possibles relacions entre les seves preferències de coordinació metàl·lica i la estructura primària, conseqüència dels canvis evolutius. Així, es podrien arribar a determinar els factors de la seqüència que determinen l'especificitat metàl·lica, i en definitiva, relacionar-los amb la funció biològica principal de les MTs.

La principal diferència observada, de gran rellevància des d'un punt de vista evolutiu, és la presència de polimorfisme en les MTs dels cargols terrestres estudiats a diferència del cas del gastròpode marí, *M. crenulata*, que presenta una única isoforma d'MT. Per altra banda, el comportament mostrat per aquestes metal·lotioneïnes permet dividir-les entre les que presenten un caràcter marcat de Zn-tioneïna o de Cu-tioneïna d'aquelles que presenten un comportament intermedi. A continuació es recullen i desgranen els trets comuns així com les divergències de comportament observades tot agrupant-les dins aquestes tres tendències de comportament.

1. Comportament de les isoformes HpCdMT i CaCdMT com a Zn-tioneïnes

Aquestes dues isoformes de mol·luscs són les que mostren una major similitud de comportament entre totes les estudiades, i aquest és tant similar que realment no existeix cap evidència significativa que permeti diferenciar-les, tant *in vivo* com *in vitro*. Totes dues mostren les següents característiques:

- *In vivo* donen lloc a la formació d'una única espècie d'estequiometria M_6 -MT (on M equival a Zn(II) o Cd(II) respectivament). Les dues espècies Zn_6 -MT i Cd_6 -MT de HpCdMT i CaCdMT presenten el mateix espectre de DC (**Fig. 1**). Addicionalment Cd_6 -HpCdMT i Cd_6 -CaCdMT són espectroscòpicament anàlogues a l'espècie Cd_6 -HpCdMT nativa (**Fig. 2 de l'article 1**).

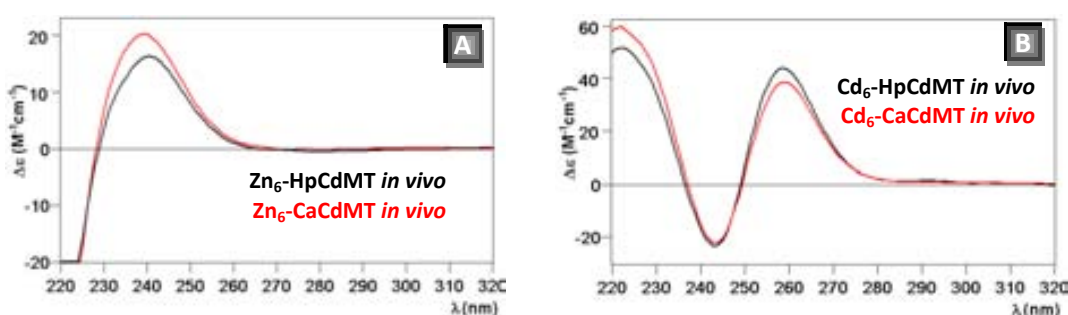


Fig. 1. Espectres de DC corresponents a les espècies (A) Zn_6 -MT i B) Cd_6 -MT de les isoformes HpCdMT (negre) i CaCdMT (vermell) obtingudes *in vivo*.

- L'elevada estabilitat dels complexos Cd_6 -MT *in vivo* es fa evident en l'estudi de la seva evolució amb el temps, ja que aquestes espècies inicials es mantenen inalterables després de més de 20 dies d'evolució (**Apartat 3.5.**).

- *In vitro* es poden reproduir els complexos Cd_6 -MT tant per addició de Cd(II) a l'espècie Zn_6 -MT com per acidificació/reneutralització de la Cd_6 -MT. És important remarcar com en la l'addició de Cd(II) a la Zn_6 -MT s'obté l'espècie Cd_6 -MT en una valoració que procedeix isodicroicament i en la que només és necessari afegir 6 eq de Cd(II) per donar lloc a espècies úniques Cd_6 -MT que es mantenen inalterables inclús en presència d'un excés de Cd(II). Com es pot observar en la **Fig. 2**, l'addició de Cd(II) a les dues espècies Zn_6 -MT dóna lloc en els mateixos punts de l'experiment a espectres de DC completament anàlegs.

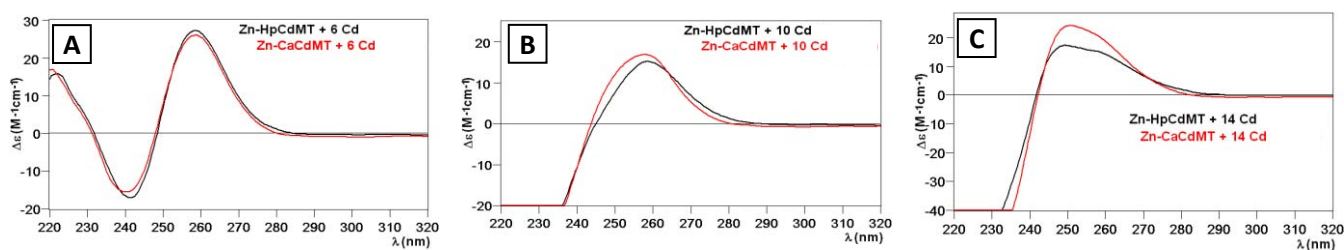


Fig. 2. Espectres de DC enregistrats després d'addicionar respectivament (A) 6, (B) 10 i (C) 14 eq de Cd(II) a les solucions de Zn_6 -HpCdMT (negre) i Zn_6 -CaCdMT (vermell).

- En les bioproduccions en medis rics en Cu(II) s'observa, invariablement en tots els casos, la formació d'una mescla d'espècies heterometàl·liques Zn,Cu-MT.
- De la mateixa manera que s'observa en la valoració amb Cd(II), el desplaçament metàl·lic Zn^{II}/Cu^I en les espècies inicials Zn₆-HpCdMT i Zn₆-CaCdMT dona lloc, per el mateix nombre d'equivalents afegits, a empremtes de DC molt similars (**Fig. 3**). La baixa especificitat per Cu(I) es fa palesa també en aquesta valoració amb Cu(I), per la manca de formació d'una espècie preferent i per la necessitat d'afegir un gran excés de Cu(I) (més de 12 eq de Cu(I)) per a desplaçar tot el Zn(II) inicialment enllaçat.

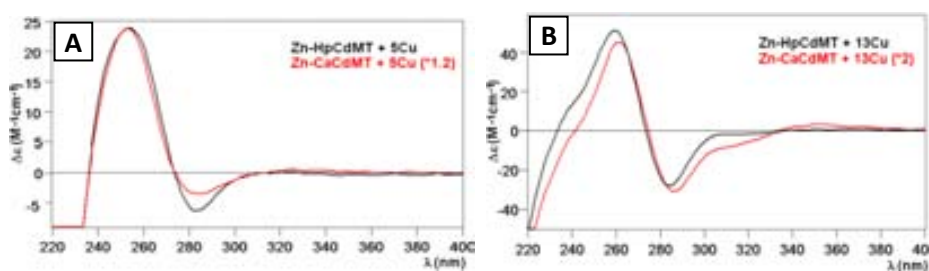


Fig. 3. Espectres de DC enregistrats després d'addicionar respectivament (A) 5 i (B) 13 eq de Cu(I) a les solucions de Zn₆-HpCdMT (negre) i Zn₆-CaCdMT (vermell).

Es conclou així, que HpCdMT i CaCdMT presenten una major especificitat d'enllaç pels metalls divalents Cd(II) i Zn(II), que per Cu(I). A més, de forma molt particular, mostren una preferència metàl·lica especial per enllaçar Cd(II) tal com posa de manifest el fet que s'aïllin del sistema gàstric dels cargols que han ingerit grans quantitats de Cd(II). Aquesta gran preferència per enllaçar Cd(II), en tots els medis assajats, formant un complex amb gran estabilitat i estructuració permet establir la destoxicació de l'ió Cd(II) com una possible funció biològica secundària per aquestes dues isoformes d'MT. Finalment, les dades recollides en l'estudi de les preferències de coordinació metàl·lica d'aquestes dues proteïnes permeten postular l'existència d'isoformes d'MT que, tot i presentar una elevada preferència metàl·lica per Zn(II) i estar classificades com a Zn-tioneïnes, presenten una reactivitat especial envers el Cd(II), i que fins i tot podrien desenvolupar una possible funció biològica en la protecció enfront aquest metall tòxic. Així, en un refinament de la classificació proposada per aquest grup de recerca (**Introducció, apartat 1.1.5.**) es podria tenir en compte l'existència de proteïnes que serien més properes a un comportament de Cd-tioneïna, per les seves propietats coordinants, que no pas al de Zn-tioneïna.

Finalment, és possible establir per HpCdMT i CaCdMT una correspondència perfecta entre l'extremada homologia en els seus respectius comportaments d'enllaç enfront Zn(II), Cd(II) i Cu(I) i la gran similitud observada entre les dues seqüències d'aminoàcids. En concret, l'alineament d'ambdues isoformes mostra una similitud del 95.5%, amb el solapament de 64

(dels 67 possibles) residus (**Fig. 4**). Cal dir que cap de les mínimes diferències observades no es correspon en cap cas amb aminoàcids enllaçants, Cys.

		Seqüència 1: HpCdMT , (67 residus), 18 Cys		
		Seqüència 2: CaCdMT , (69 residus); 18 Cys		
		95.5% d'identitat en 64 residus solapats; Puntuació: 397.0		
1,	GS	GKGKGEKCTSA	CRSEPCQCGSKCQC	GEGCTCAACKTCNCTSDGCKCKGEKTGPDSCKCGSSCSCK
2,	GSM	GKGKGEKCTAA	CRNEPCQCGSKCQC	GEGCTCAACKTCNCTSDGCKCKGEKTGPDSCKCGSSCSCK
**		*****	***	*****

Fig. 4. Alineació en base a la similitud de les seqüències d'aa de HpCdMT i CaCdMT, dels gastròpodes terrestres *H.pomatia* i *C.aspersum*, mitjançant l'aplicació CrustalW. En negreta i vermell s'observen els residus de cisteïna i en fons verd els aminoàcids diferents en ambdues seqüències. L'asterisc (*) indica que en aquella posició els residus són 100% idèntics.

A més del fet que tenen pràcticament el mateix nombre d'aminoàcids i les mateixes cisteïnes en exactament les mateixes posicions, només es poden observar 4 diferències entre els seus aminoàcids i totes elles en els extrems. Llavors, aquests aminoàcids no enllaçants que varien d'una isoforma a l'altre no marquen i no condicionen en cap cas ni *in vivo* ni *in vitro* una diferència en la coordinació metàl·lica envers els ions Zn(II), Cd(II) o Cu(I).

2. Comportament de les isoformes HpCuMT i CaCuMT com a Cu-tioneïnes

En un altre grup trobem aquelles isoformes d'MT que han mostrat una elevada preferència per coordinar Cu(I). S'inclouen en aquest les isoformes HpCuMT i CaCuMT dels cargols *H.pomatia* i *C.aspersum*. Prèviament, s'havia descrit per ambdues proteïnes una gran especificitat per enllaçar Cu(I) fisiològicament, obtenint-se de forma nativa com a complexos homometàl·lics de coure. L'estudi de les seves propietats coordinants envers Zn(II), Cd(II) i Cu(I) permet establir les següents similituds i diferències:

- La seva bioproducció en medis de cultiu rics en metalls divalents, Zn(II) i Cd(II), dóna lloc, en tots els casos, a la formació d'una mescla de varies espècies M-MT.
- Les mescles d'espècies Zn-MT obtingudes en la biosíntesi de HpCuMT i CaCuMT, tot i que contenen espècies d'estequiometria semblant, mostren uns espectres de DC lleugerament diferents. Mentre els tres tipus de bioproduccions de Zn-HpCuMT mostren una empremta de DC similar amb una banda poc intensa centrada *ca.* a 240 nm, la mescla de complexos Zn-CaCuMT mostra un espectre pràcticament pla (**Fig. 5.**). Això indica com tot i que totes dues proteïnes formen espècies de baixa estructuració, els complexos Zn-CaCuMT són els que presenten aquesta particularitat de forma més important. Aquesta lleugera diferència podria suggerir un major caràcter de Cu-tioneïna per CaCuMT vs. ZnHpCuMT.
- Una altra característica que indica el caràcter de Cu-tioneïna de les dues isoformes és la formació *in vivo* d'agregats de tipus Cd_xS_y -MT. Aquestes espècies a més van mostrar una evolució amb el temps (**Apartat 3.5.**), característica particular de les proteïnes definides com a Cu-tioneïnes.

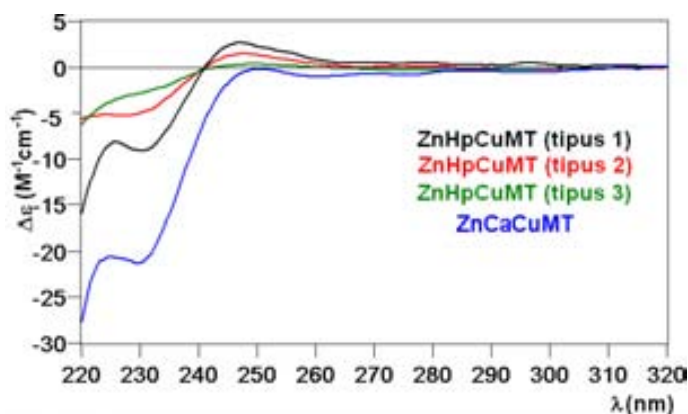


Fig. 5. Espectres de DC de les 3 bioproduccions, tipus 1 (negre), 2 (vermell) i 3 (verd), de Zn-HpCuMT i la corresponent a la biosíntesi de Zn-CaCuMT (blau).

- Pel que fa a la coordinació *in vitro* a Cd(II), en cap cas ha estat possible obtenir una espècie única Cd_x-MT, sinó que en tots els casos ha donat lloc a la formació d'una mescla de complexos d'estequiometries diverses. Aquesta observació indica, una vegada més, la baixa preferència metàl·lica de les dues isoformes de Cu estudiades per aquest ió divalent.

- La biosíntesi de HpCuMT i CaCuMT en medis de cultiu rics en Cu(II) sota les dues condicions d'oxigenació assajades, va permetre observar una gran especificitat metàl·lica d'aquestes dues metal·loproteïnes per Cu(I), de forma anàloga a l'observat per a les formes natives. Va ser possible reproduir *in vivo* en condicions de baixa oxigenació l'espècie Cu₁₂-MT nativa. Cal remarcar que per CaCuMT, es va observar també la formació d'aquesta espècie preferent sota condicions menys favorables, oxigenació normal dels cultius, indicant un major caràcter de Cu-tioneïna per dita isoforma.

- Finalment, va ser possible reproduir el complex Cu₁₂-CaCuMT obtinguts *in vivo* mitjançant la valoració de Zn-CaCuMT *in vivo* amb Cu(I). Tanmateix, això no és tant fàcil amb les produccions Zn-HpCuMT, indicant una menor preferència d'aquesta darrera per formar aquest complex homometàl·lic de coure, i a la vegada menor caràcter de Cu-tioneïna de la isoforma HpCuMT en comparació amb CaCuMT.

El conjunt de dades recollides en l'estudi de la coordinació metàl·lica, tant *in vivo* com *in vitro*, de HpCuMT i CaCuMT enfront els metalls Zn(II), Cd(II) i Cu(I) indiquen un comportament molt similar amb l'existència d'un marcat caràcter de Cu-tioneïna. Aquesta gran preferència metàl·lica per enllaçar a Cu(I) es troba en total concordança amb les observacions fetes en les formes natives i dóna validesa a la proposta d'una possible funció d'aquestes proteïnes en relació a l'ió Cu(I). Cal indicar però, que tot i la gran similitud en les habilitats coordinants observades en l'estudi de les dues isoformes, hi ha certes divergències entre elles. A la llum dels resultats obtinguts és possible afirmar l'existència d'un major caràcter de Cu-tioneïna per CaCuMT, sobretot en una major preferència per formar el complex Cu₁₂-CaCuMT, tant *in vivo* com *in vitro*.

Tot i la gran similitud i característiques comunes que presenten aquestes isoformes, HpCuMT i CaCuMT, aquesta no és tant elevada com l'observada entre les respectives isoformes de Cd (HpCdMT i CaCdMT) dels mateixos organismes. Aquesta menor homologia, amb petites diferències en la seva coordinació als diferents ions metàl·lics estudiats, es veu a la vegada reflectida en una identitat seqüencial menor (**Fig. 6**) determinada per aquestes (85.9%), en comparació amb les de les CdMTs (95.5%).

Seqüència 1: HpCuMT , (65 residus), 18 Cys i 1 His	
Seqüència 2: CaCuMT , (67 residus); 17 Cys i 1 His	
85.9% de identitat en 64 residus solapats; Puntuació: 360.0	
1,	GS GRGNCGGACNSNPCSCGNDCCGAGCNCDCSSCHCSNDDCKCGSQCTSGSGCKCGSACGCK
2,	GSMSGRGNCGGACNSNPCSCGNDCCGAGCNCDCSSARHCSNDDCKCGSQCTSGSGCKCGNACGCK
**	*** *

Fig. 6. Alineació en base a la similitud de les seqüències d'aa de les isoformes d'MT HpCuMT i CaCuMT recombinants, dels gastròpodes terrestres *H.pomatia* i *C.aspersum*, mitjançant l'aplicació CrustalW. En negreta i vermell s'observen els residus de cisteïna i en fons verd els aminoàcids diferents en ambdues seqüències. L'asterisc (*) indica que en aquella posició els residus són 100% idèntics

D'aquesta manera, sembla plausible que les petites diferències seqüencials són les causants del lleuger desviament en el comportament coordinant observat pels diferents ions metàl·lics, especialment enfront Cu(I), tant *in vivo* com *in vitro*.

En comparar les dues isoformes, s'observa com HpCuMT conté un residu de Cys més, que en el cas de CaCuMT. Els resultats obtinguts en l'estudi d'aquestes dues isoformes indiquen com tot i que CaCuMT contingui un residu enllaçant menys, no sembla afectar a l'estequiometria dels complexos formats. Per altra banda, el residu d'His es conserva en totes dues isoformes. Aquest, sembla tenir una funció primordial en la coordinació/descoordinació del Cu(I) en HpCuMT, com es va determinar en l'**apartat 3.1.1.5**. Aquest rol de la His seria per extensió atribuïble també a la isoforma CaCuMT.

3. Comportament com a Zn/Cu-tioneïnes intermèdies de les proteïnes CaCdCuMT i McMT

Finalment, en un tercer bloc es troben aquelles isoformes d'MT de mol·lusc, CaCdCuMT i McMT, que exhibeixen un comportament intermedi entre les Zn- i Cu-tioneïnes. Cal dir, que tot i que ambdues isoformes tenen un caràcter de Zn/Cu-tioneïna intermedi, aquest no és igual però si comparable. La isoforma CaCdCuMT correspon a la tercera metal·lotioneïna aïllada en el sistema polimòrfic d'MTs del cargol terrestre *C.aspersum* i en canvi, la McMT és l'única forma de metal·lotioneïna trobada al barretet marí *M.crenulata*. A continuació es presenten les principals similituds i diferències observades entre les isoformes que comprenen aquest bloc.

-Totes dues isoformes es diferencien en el seu comportament enfront els metalls divalents, tot i que a la vegada, presenten certes similituds. *In vivo* en medis de cultiu rics en

Zn(II) i Cd(II) donen lloc a una mescla d'espècies, característica típica de les Cu-tioneïnes. Cal remarcar, que tot i aquesta similitud en el seu comportament, la mescla resultant en el cas de la isoforma CaCdCuMT mostra la presència d'espècies amb abundàncies relatives prou similars, és a dir, sense la formació d'una espècie amb especial estabilitat. En canvi, en el cas de McMT, en tots dos medis de cultiu, s'obté com a espècie molt majoritària el complex M_6 -McMT, observació feta a la vegada en les isoformes de Cd dels cargols terrestres estudiats.

- Per altra banda, totes dues formen *in vivo* espècies del tipus Cd_xS_y -MT com s'ha detectat mitjançant les tècniques d'ESI-MS i per les absorcions per sobre de 280 nm detectades en els espectres de DC i UV-Vis. Addicionalment, s'ha observat com aquest contingut en lligands sulfur en la mostra, promou un fenomen d'evolució amb el temps de les espècies. Aquesta característica, com hem puntualitzat al llarg d'aquesta tesi, és particular i associat al caràcter de Cu-tioneïna.

- Una diferència addicional en el comportament enfront Cd(II) és l'observat en la formació dels complexos Cd-MT *in vitro* mitjançant el bescanvi metàl·lic Zn^{II}/Cd^{II} . Una vegada més, en aquest cas és possible discernir un comportament diferencial entre ambdues isoformes. Mentre la isoforma mixta CaCdCuMT no forma en cap moment una espècie preferent ni d'especial estabilitat, en el cas de la McMT és possible reproduir l'espècie Cd_6 -MT biosintetitzada. Aquesta observació s'ha realitzat també en el cas de les formes de Cd dels cargols terrestres, amb la diferència de que el complex Cd_6 -MT obtingut no és manté com a espècie única, però si com la més important, en afegir més equivalents de Cd(II) a la mostra, en un excés d'aquest metall. Finalment, pel que fa a la McMT destacar que a diferència del que passa amb les formes de Cd i que si és característic de les Cu-tioneïnes, presenta una especial habilitat per coordinar sulfurs, inclús *in vitro*.

- Pel que fa al comportament enfront Cu(I) totes dues presenten certes diferències. En la seva biosíntesi, CaCdCuMT, en diferents condicions d'oxigenació en medis de cultiu rics en Cu(II) s'obtenen majoritàriament complexos homometàl·lics de Cu(I) amb una elevada estructuració, com indiquen els seus espectres de DC. Aquesta propietat la relaciona i la fa propera a la isoforma específica de Cu del mateix organisme, CaCuMT. Pel que fa a McMT, la mescla de complexos obtinguts són de baixa estequiometria i estructuració, típic de les Cd-tioneïnes, però per altra banda, s'observa la formació de complexos homometàl·lics de Cu(I) en totes les condicions de síntesi, indicant una certa habilitat per enllaçar Cu(I).

- Finalment, el desplaçament metàl·lic Zn^{II}/Cu^{II} mostra en tots dos casos la formació d'una gran mescla d'espècies. El fet que cap d'elles sigui capaç de formar una espècie Cu-MT

amb gran preferència i estabilitat evidència, una vegada més, el caràcter Zn/Cu-tioneïna intermedi de McMT i CaCdCuMT.

El conjunt d'observacions fetes en l'estudi de les habilitats coordinants de CaCdCuMT i McMT permet establir en aquest cas de metal·lotioneïnes de mol·luscs, que tant en un sistema sense polimorfisme com en un polimòrfic d'MTs, és possible trobar proteïnes amb un caràcter de coordinació metàl·lica vers Zn(II), Cd(II) i Cu(I) completament intermedi. Val a dir, que tot i que ambdues isoformes presenten un caràcter intermedi aquest correspon a tendències diferents. En el cas de la CaCdCuMT ens trobem amb una MT amb un caràcter de Cu-tioneïna més marcat, en comparació al de la isoforma de Cu del corresponent organisme. Per altra banda, tot i que en l'organisme *M.crenulata* no presenta cap altra isoforma d'MT en els seus teixits, el seu comportament seria comparable més aviat amb l'observat en les CdMTs dels cargols terrestres, CaCdMT i HpCdMT, tot i que de forma menys específica.

L'estudi d'aquest gran conjunt de proteïnes i totes elles de sistemes d'MTs diferents però amb una relació filogenètica propera, han permès establir una relació molt clara entre la homologia seqüencial, de tots els aa, i el mateix comportament metàl·lic. Com s'observa en la **Taula 14** la major similitud en el comportament el trobem a la vegada entre aquelles dues isoformes que presenten pràcticament la mateixa seqüència d'aa, HpCdMT i CaCdMT amb 95.5% de similitud. En segon lloc tenim les CuMTs específiques, CaCuMT i HpCuMT, que tot i semblar-se moltíssim presenten lleugeres diferències d'enllaç metàl·lic, en completa concordança amb lleugeres diferències seqüencials, similitud del 85.9%. Finalment, en el tercer bloc es classificaven les MTs amb comportament intermedi, McMT i CaCdCuMT, que com podem observar (**Taula 14**) en cap cas presenten un % de similitud amb cap altra metal·lotioneïna analitzada per sobre del 75%. De forma molt interessant, la major similitud de la CaCdCuMT la trobem amb la corresponent isoforma de Cu del cargol terrestre *H.pomatia* i seguida per la isoforma també de Cu de *C.aspersum*, CaCuMT. Així, l'observació feta mitjançant l'estudi coordinant que mostrava un caràcter intermedi però més proper a Cu-tioneïna per a aquesta isoforma té la seva correspondència amb la seva similitud seqüencial. En el cas de la McMT, aquesta presenta al voltant d'un 50% d'homologia amb les altres isoformes d'MT, però en especial amb un 61% amb la isoforma mixta CaCdCuMT. Tot i haver-se determinat que tenia un caràcter intermedi, un valor lleugerament superior d'alineament amb les formes específiques de Cd (52-54%) enfront a les de Cu (48-19%), indiquen una vegada més un major caràcter de Cd-tioneïna.

L'anàlisi seqüencial d'aquestes isoformes ha permès determinar com tot i presentar isoformes d'MT, en el cas dels cargols terrestres *H.pomatia* i *C.aspersum*, amb mateixa longitud i número d'aa coordinants, Cys, donen lloc a proteïnes amb especificitats metàl·liques molt

extremes i diferents. En el cas concret de les isoformes HpCdMT i HpCuMT amb el mateix número de residus de Cys i en exactament les mateixes posicions, dóna a fi a uns polipèptids amb capacitats i especificitats metàl·liques molt diferents, i alhora possiblement associades a funcions distintes. Així, es demostra com són els aa no coordinants els que marquen les especificitats metàl·liques exhibides per les diferents formes d'MTs, ja siguin del mateix o de diferents organismes.

	HpCdMT	HpCuMT	CaCdMT	CaCdCuMT	CaCuMT	McMT
HpCdMT	X	57.0%	95.5%	55.2%	52.0%	52.0%
HpCuMT	57.0%	X	57.0%	75.0%	85.9%	48.0 %
CaCdMT	95.5%	57.0%	X	54.5%	51.5%	54.0%
CaCdCuMT	55.2%	75.0%	54.5%	X	68.7%	61.0%
CaCuMT	52.0%	85.9%	51.5%	68.7%	X	49.0%
McMT	52.0%	48.0 %	54.0%	61.0%	49.0%	X

Taula 14. Presentació dels % de similitud seqüencial calculats per al conjunt d'isoformes d'MT estudiades. Es pot trobar el valor de similitud entre dos seqüències escollint dos MTs i traçant dues línies perpendiculars fins arribar a la cel·la on conflueixen. El valor en color **blau** identifiquen un grau d'homologia superior al 75%, en **verd** un valor de 60-75%, en **taronja** entre 50 i 60 % i finalment, en **vermell** aquest **valors inferiors al 50 %**.

3.1.4.1. Consideracions globals

El sistema de gen d'MT/proteïna dels gastròpodes proveeix un model molt valuós per estudiar els mecanismes de diversificació a través de l'evolució que han donat lloc i han fet possible que les MTs aconseguirien una especificitat metàl·lica d'enllaç molt particular. Molts gastròpodes pulmonats, particularment cargols terrestres, mostren l'existència de tres isogens d'MT que codifiquen tres isoformes d'MT amb preferències metàl·liques d'enllaç diferents: les isoformes CdMT i CuMT altament específiques, per Cd(II) i Cu(I) respectivament, i la isoforma inespecífica Cd/CuMT. *Megathura crenulata* és un gastròpode no pulmonat on únicament s'ha observat un isogen d'MT.

L'estudi dut a terme amb les isoformes d'MTs de diversos mol·lusc ha permès determinar les especificitats metàl·liques exclusivament produïdes per la seqüència primària dels polipèptids del sistema d'MTs dels cargols terrestres *H.pomatia* i *C.aspersum*. Així, es confirmen que les especificitats metàl·liques observades de forma nativa tenen la seva correspondència en el conjunt d'aa de la seva seqüència, i no només en base a l'entorn cel·lular en el que es produeixen. D'aquesta manera, els factors que determinen l'especificitat metàl·lica d'aquestes MTs corresponen als aa no enllaçants, ja que els enllaçants (Cys) es troben en les mateixes posicions i alineament perfecte. Així, les diferències seqüencials són les que han marcat l'especificitat metàl·lica, és a dir, els agents de pressió evolutiva que han modelat els pèptids per enllaçar amb preferència uns ions metàl·lics que determinaran la seva funció. Es postula que les isoformes de Cu, CuMTs, produïdes constitutivament, estan associades amb l'homeòstasi del

Cu(I) essencial, per assegurar-ho per a la síntesi de la hemocianina, mentre que les isoformes Cd-MT induïble juguen un rol en la destoxicació del ió no-essencial i tòxic Cd(II).

Des d'un punt de vista seqüencial s'ha proposat que McMT esta clarament relacionada amb la isoforma CuMT d'*Helix pomatia*, HpCuMT, però també exhibint certes característiques de la isoforma HpCdMT. Aquest mai havia estat analitzat a través de la caracterització de les propietats de coordinació metàl·lica del polipèptid McMT. L'anàlisi de les propietats coordinants de McMT duta a terme en aquest treball mostra com aquesta correspon a una isoforma d'MT inespecífica, similar a la isoforma Cd/CuMT dels pulmonats. Això està en completa concordança amb la distància de l'anàlisi seqüencial en relació amb les altres MTs de gastròpodes (**Fig. 49**), el qual esta enclustat amb la isoforma Cd/CuMT dels pulmonats. Des d'un punt de vista de la possible funció biològica, les particularitats descrites en l'enllaç metàl·lic suggereixen que McMT podria ser capaç de dur a terme diverses funcions biològiques que les MTs específiques duen a terme en els cargols pulmonats: la destoxicació del Cd com la CdMT, en el metabolisme basal de Zn i com a *scavenger* enfront condicions d'estrés (principalment estrés oxidatiu) com Zn-tioneïna, conjuntament amb una possible relació amb l'ió Cu(I) en la síntesi de l'hemocianina, com a Cu-tioneïna.

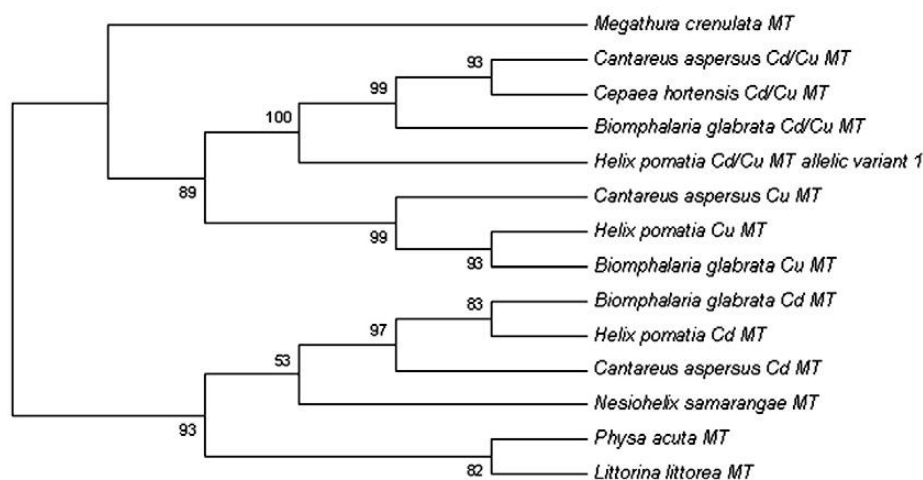


Fig. 49. Arbre filogenètic d'alineació de les seqüències d'aminoàcids de les isoformes d'MT de *Helix pomatia*, *Megathura crenulata*, *Cantareus aspersus*, *Cepaea hortensis*, *Biomphalaria glabrata*, *Nesiohelix samarangae*, *Physa acuta* i *Littorina littorea* (**Article 5, Annex 7.2**).

3.2. Estudi del sistema d'MTs de l'amfiox

3.2. Estudi del sistema d'MTs de l'amfiox

Dins el treball d'investigació que s'inclou en aquesta Tesi Doctoral i dut a terme pel grup de recerca en genètica amb el que mantenim una col·laboració permanent, es va poder identificar i caracteritzar per primera vegada dos gens/proteïnes diferents del sistema d'MTs d'amfiox (BfMT1 i BfMT2). D'aquesta manera, es va dur a terme l'estudi *in silico* del genoma complet disponible de les espècies de lancelets de Florida (*B. Floridae*) en la cerca de possibles gens que codifiquessin metal·lotioneïnes. A partir d'aquesta informació va ser possible la construcció de dos vectors d'expressió amb la informació genètica adequada per a l'expressió recombinant d'aquests dos ORFs que previsiblement codificaven dos isoformes d'MTs diferents. Així, la síntesi recombinant en *E.coli* va permetre determinar finalment que aquests pèptids obtinguts coincidien amb unes proteïnes riques en Cys, amb capacitat d'enllaçar un gran número d'ions metàl·liques, la seqüència dels quals es presenta a continuació (**Fig. 50**):

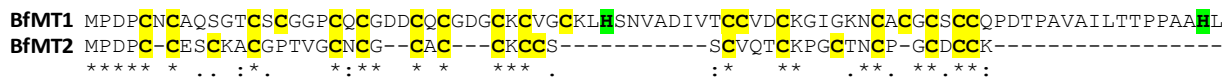


Fig. 50. Alineament en base a la similitud entre les seqüències de les dues isoformes BfMT1 i BfMT2 del amfiox *B. floridae* mitjançant l'aplicació ClustalW. En negreta i groc es presenten els residus de cisteïna i en verd els d'histidina. L'asterisc (*) indica que en aquella posició els residus són 100% idèntics, els dos punts (:) que les posicions en les que ha succeït una substitució conservativa i un punt (.) indica substitucions menys conservatives.

Les diferències seqüencials entre ambdós proteïnes són grans i evidents, presentant una homologia seqüencial baixa, 26.2 %. Tot i que totes dues presenten una longitud molt diferent, BfMT1 conté 35 aa més, el número de residus coordinants de Cys és pràcticament igual, i a més, BfMT1 presenta 2 His que podrien participar en l'enllaç metàl·lic.

Finalment, per tal de constatar si aquests 2 ORFs predits coincidien de fet a gens reals es va procedir a la determinació de la presència de la transcripció d'aquests (els respectius mRNAs) en els organismes d'amfioxos. Es va emprar per a aquest propòsit l'espècie *Branchiostoma lanceolatum*, disponibles en les costes del mar mediterrani. A partir d'aquesta anàlisi es va confirmar l'existència d'aquests cDNAs inicialment determinants de forma *in silico*, indicant que efectivament *BfMT1* i *BfMT2* corresponien a gens funcionals en l'amfiox. Addicionalment, la perfecta coincidència entre els cDNAs aïllats de *B.lanceolatum* i dels ORFs predits per a l'espècie *B.floridæ* permeten concloure indubtablement la identitat de les dues isoformes d'MT, BfMT1 i BfMT2, en les dues espècies d'amfiox estudiades.

3.2.1. Estudi de la capacitat coordinant de les isoformes d'MT de l'amfiox *Branchiostoma floridae*: BfMT1 i BfMT2

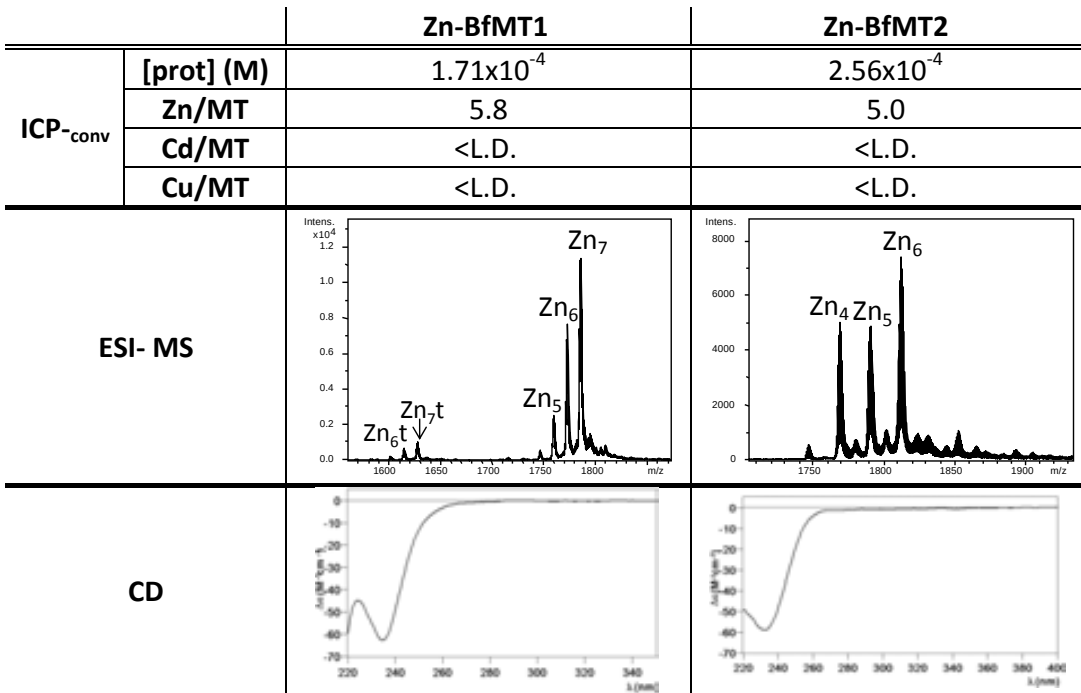
En aquest treball es presenta, per primera vegada, la caracterització de les propietats enllaçants les dues isoformes BfMT1 i BfMT2 del sistema d'MTs de l'amfiox, subfamília de

cefalocordats (**Introducció, apartat 1.2.2.1.**). Els principals resultats relatius a la caracterització d'aquests pèptids es troba inclosa en l'**Annex 7.1.4.**

3.2.1.1. Comportament de BfMT1 i BfMT2 envers Zn(II)

Seguint l'estratègia experimental duta a terme per a la caracterització de les habilitats coordinants de les diferents MTs presentades en aquesta Tesi, es va realitzar de forma anàloga la síntesi recombinant d'ambdues isoformes, BfMT1 i BfMT2, en medis de cultiu rics en Zn(II), obtenint-se els corresponents complexos Zn-MT *in vivo*.

En les dues produccions es va observar la formació d'una mescla d'espècies de diferents estequiometries (**Espectres d'ESI-MS de la Taula 15**). En la bioproducció de Zn-BfMT1 es va identificar com a espècie majoritària la Zn₇-BfMT1, acompanyada d'una presència significativa de Zn₆- i Zn₅-BfMT1. En les preparacions de Zn-BfMT2 s'observa una situació molt similar, on Zn₆-BfMT2 es va detectar com a complex majoritari acompanyat per les espècies de menor estequiometria Zn₅- i Zn₄-BfMT2. La menor estequiometria observada en els complexos formats en el cas de BfMT2 es confirma pels resultats d'ICP-AES obtinguts (**dades d'ICP-AES de la Taula 15**), on s'ha quantificat una menor quantitat de Zn. Aquesta diferència està en completa concordança amb el fet que ambdues isoformes continguin en la seva seqüència primària un número diferent de residus d'aminoàcids amb capacitat coordinant: BfMT1 conté 19 Cys i 1 His, si bé BfMT2 tan sols té 18 Cys (**Fig. 50**).



Taula 15. Resultats de la caracterització dels complexos Zn-MT obtinguts en la biosíntesi de les isoformes BfMT1 i BfMT2 en medis rics en Zn(II). En les anàlisis d'ICP-AES, les sigles <L.D. indiquen valors per sota del límit de detecció. En aquesta taula es mostren només els resultats corresponents a l'ICP-AES convencional ja que no presenta diferència significativa amb els resultats obtinguts en condicions àcides.

Una altra característica comuna en ambdós tipus de preparacions, Zn-BfMT1 i ZnBfMT2 *in vivo*, és el *fingerprint* observat en els seus espectres de DC, pràcticament pla excepte per les absorcions per sota de 240 nm, corresponents a l'enllaç peptídic. Aquests senyals espectrals suggereixen un baix grau d'estructuració dels clústers metàl·lics formats.

Un fet rellevant a tenir en compte és la detecció, en els espectres d'ESI-MS de les produccions de Zn-BfMT1, d'uns pics menors que han estat identificats com una forma truncada de dita proteïna. Aquest truncament correspon a la pèrdua dels últims 8 aa de la cadena en l'extrem C-terminal (*i.e.* TTPPAAHL). Curiosament, els complexos de Zn formats a partir de la forma truncada exhibeixen les mateixes estequiometries (Zn_{7-} , Zn_{6-} i Zn_{5-}) que les de la proteïna sencera, la qual cosa indica que aquest truncament no afecta a la capacitat coordinant de BfMT1, i indirectament suggereixen que el residu d'His de la penúltima posició de la cadena peptídica no participa en l'enllaç a Zn(II).

Amb l'objectiu de poder descartar o corroborar la participació dels residus d'His en la coordinació metàl·lica en BfMT1, així com en la seva forma truncada, ZnBfMT1_{trunc}, es va dur a terme un experiment seguit per ESI-MS, on es va fer reaccionar la preparació Zn-BfMT1 (que conté també la proteïna tallada, truncada) amb el reactiu DEPC (pirocarbonat de dietil). Aquest reactiu té la capacitat d'enllaçar-se amb gran especificitat als residus d'His lliures^[160] i permet determinar per ESI-MS el número de carboxietilacions formades (**Fig. 51**).

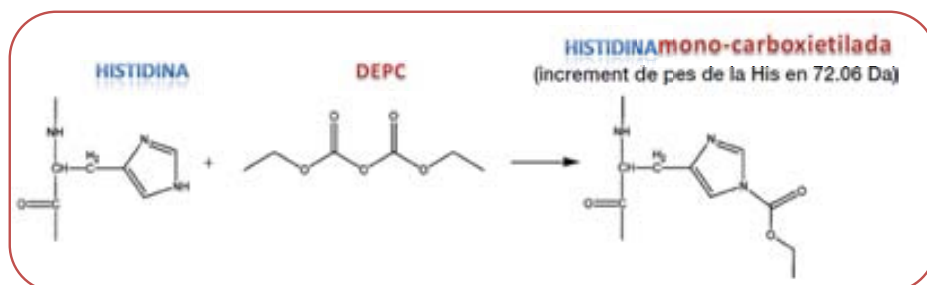


Fig. 51. Reacció entre el DEPC i un residu d'His accessibles per a formar la His mono-carboxietilada.

És important tenir present que el reactiu de DEPC és útil per conèixer el nombre d'His de la seqüència que no participen en la coordinació al metall, ja que aquelles His que, degut al plegament de la proteïna, són inaccessibles al reactiu no es veuen modificades. A l'hora d'analitzar les dades s'ha de tenir en compte la reactivitat del DEPC, tot i que amb molta menys afinitat també interacciona amb altres aminoàcids com la Cys, Tyr o l'extrem amino-terminal de les proteïnes.^[161] Es dissenya un experiment on es fa reaccionar aquesta solució Zn-BfMT1 i Zn-BfMT1_{trunc}, amb un excés de DEPC (7:1), i s'enregistra la mostra per ESI-MS a 5 i 25 minuts.

Els espectres d'ESI-MS enregistrats queden recollits en l'**Annex 7.1.4., Làmina 7.1.4.1**, i a continuació es presenten els principals resultats en forma de taula, **Taula 16**. Quan es fa reaccionar el DEPC amb la preparació Zn-BfMT1 s'observen com a pics majoritaris (tant a 5 com a 25 minuts de reacció) els corresponents a les espècies de Zn-BfMT1 amb l'addició de fins a 3 i 4

molècules de DEPC (increment de 72.06 unitats de massa per cada modificació per DEPC) en la proteïna sencera, mentre que en l'espècie truncada s'observa l'addició de 2-3 molècules de DEPC. Els perfils de masses són pràcticament idèntics en ambdues proteïnes, i tan sols divergeixen en la unió a una unitat de DEPC (una unitat de DEPC menys en BfMT1 truncada probablement perquè ha perdut la His terminal respecte la proteïna sencera).

Proteïna	Nº His	DEPC/MT ^(a)	Nº de modificacions ^(b)	Nº His modificades ^(c)
Zn-BfMT1	3	7	3-4	3
Zn-BfMT1 _{trunc}	2	7	2-3	2

Taula 16. Dades analítiques obtingudes en els experiments d'incubació de diverses MTs amb DEPC. a) Relació entre el número d'equivalents de DEPC/MT, b) nombre de carboxietilacions detectades per ESI-MS, c) nombre probable d'His carboxietilades.

Es parteix d'una solució amb la mateixa especiació (mateixes estequiometries i abundància relativa dels diferents complexos Zn-MT per a cada proteïna) i arribem a una situació on les espècies detectades tenen un número de modificacions per DEPC en les espècies truncades inferior en una unitat a les observades en l'espècie sencera. Així, aquests resultats indiquen que la His propera a l'extrem C-terminal, que li manca a la forma truncada, no participa en la coordinació metàl·lica. Així, es pot concloure, en base a aquests resultats, que cap dels 2 residus d'His presents en BfMT1 semblen estar involucrats en l'enllaç de Zn(II).

Finalment cal remarcar el fet que aquest truncament observat en la proteïna BfMT1 ha estat també detectat en la isoforma CeMT1 de l'organisme *C. elegans* biosintetitzada en condicions similars.^[162] El truncament dels 3 últims residus en CeMT1 es produeix també en la regió C-terminal on hi ha absència de residus de Cys. És possible suggerir la susceptibilitat d'aquests pèptids de ser tallats per endoproteolisis.

Així, el fet de que les bioproduccions de Zn-BfMT1 i Zn-BfMT2 donin lloc a la formació d'una mescla de compostos Zn-BfMT, en comptes d'una única espècie preferent, i donant lloc a espectres de DC pràcticament plans, és indicatiu d'una baixa estructuració dels complexos formats, suggerint una baixa preferència d'ambdues isoformes per a la coordinació a Zn(II).

3.2.1.2. Comportament de BfMT1 i BfMT2 envers Cd(II)

De manera similar al descrit a l'apartat anterior, es van biosintetitzar les proteïnes BfMT1 i BfMT2 en cultius bacterians suplementats amb Cd(II). Els resultats obtinguts de la bioproducció de les Cd-MTs en medis fisiològics revelen unes diferències molt més significatives entre les seves propietats enllaçants vers aquest catió Cd(II) que les descrites anteriorment per l'ió metàl·lic Zn(II).

Segons les dades d'ESI-MS enregistrades, BfMT1 forma una mescla de moltes espècies, essent Cd₈⁻, Cd₉S⁻ i Cd₇-BfMT1 les més abundants (**Espectre d'ESI-MS de la preparació de Cd-**

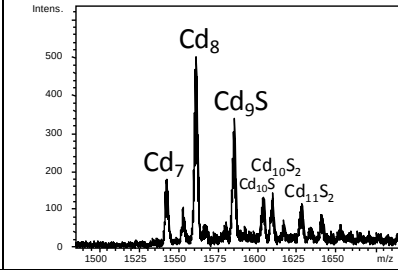
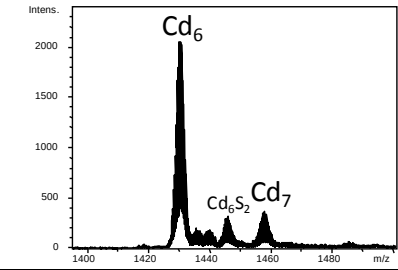
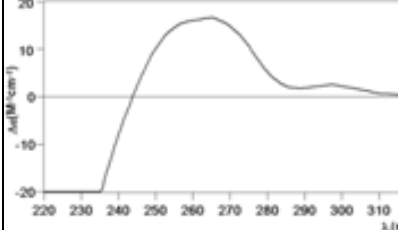
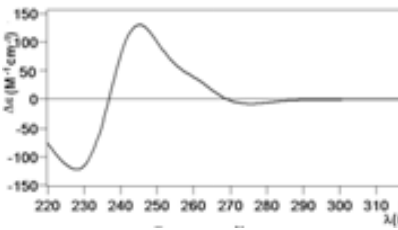
BfMT1, Taula 17). A més, s'han detectat altres espècies, amb una intensitat molt més petita, corresponents a complexos amb un elevat contingut en Cd i contenint, a més, ions sulfur com a lligands extres. La presència de complexos $\text{Cd-S}^{2-}\text{-MT}$ es va poder confirmar per dues dades independents: primer, la discrepància entre la quantificació de la proteïna per ICP-AES en condicions normals i àcides (**Taula 17**); i segon, per la presència d'absorcions a 300 nm en el seu espectre de DC, típiques dels enllaços Cd-S^{2-} , a més d'un senyal entre 250 i 260 nm deguda als cromòfors Cd(SCys)_4 .

La bioproducció de BfMT2 en les mateixes condicions presenta un comportament lleugerament diferent, formant-se majoritàriament l'espècie $\text{Cd}_6\text{-BfMT2}$, a més de petites quantitats de les espècies $\text{Cd}_7\text{-}$ i $\text{Cd}_6\text{S}_2\text{-BfMT2}$ (**Espectre d'ESI-MS de la preparació de Cd-BfMT2, Taula 17**). Una vegada més, la diferència entre els valors obtinguts en la quantificació de la proteïna per ICP-AES i els senyals a l'espectre de DC per sobre de 270 nm, tot i ser de molt baixa intensitat, confirmen la presència de lligands sulfur en alguns dels complexos formats, encara que val a dir que la proporció d'aquest complex $\text{Cd}_6\text{S}_2\text{-MT}$ és molt minoritària en comparació amb la gran abundància de l'espècie $\text{Cd}_9\text{S-BfMT1}$ detectada en les produccions de Cd-BfMT1. Existeixen altres diferències significatives entre els espectres de DC de les produccions de Cd-BfMT2 i Cd-BfMT1: una absorció dels cromòfors Cd(SCys)_4 tetraèdrics *ca.* 250 nm molt més intensa i definida per la producció Cd-BfMT2 que per als complexos de Cd-BfMT1, indicant així una major estructuració de l'espècie $\text{Cd}_6\text{-BfMT2}$ formada.

Les propietats coordinants *in vitro* de les isoformes BfMT enfront l'ió Cd(II) van ser assajades mitjançant dos tipus d'experiments: (i) desplaçament de Zn(II) per Cd(II) a partir de les preparacions Zn-BfMT (**Annex 7.1.4., Làmina 7.1.4.2**), i (ii) acidificació fins a pH inferior a 1 seguida d'una reneutralització de les preparacions recombinants de Cd-BfMT (**Annex 7.1.4., Làmina 7.1.4.3**).

La valoració de la preparació Zn-BfMT1 amb Cd(II) mostra en els espectres de UV-Vis, DC i ESI-MS un punt de saturació de la proteïna per a 8 eq de Cd(II) afegits (**Fig. 52A**). Tot i que l'addició de més Cd(II) provoca una disminució de la intensitat dels espectres de DC i UV-Vis, l'especiació obtinguda en aquest punt es manté constant. Els espectres de masses de la valoració mostren també com la petita proporció de BfMT1 truncada present, forma exactament els mateixos complexos i amb la mateixa intensitat relativa entre les diferents espècies que la proteïna sencera en cada etapa de la valoració (**Fig. 52B**). Aquest fet és una indicació més de que la His de la regió C-terminal no participa en la coordinació de Cd(II) . Cal indicar que mitjançant la valoració realitzada no ha estat possible reproduir els resultats de la preparació recombinant Cd-BfMT1, fet esperat si es té en compte les importants contribucions de les espècies que contenen sulfurs presents en la preparació *in vivo*. No obstant, l'addició de diversos equivalents de sulfur al final de la valoració resulta en la formació d'una mescla de complexos on es poden identificar les

espècies Cd_8S_2 i $\text{Cd}_9\text{S-BfMT1}$, que clarament indica la incorporació d'aquests lligands als complexos Cd-BfMT1 . Encara que s'aconsegueix reproduir algunes de les espècies formades en la producció *in vivo*, tampoc així és possible obtenir ni l'empremta de DC ni una especiació anàloga a la trobada en les preparacions recombinants.

		Cd-BfMT1	Cd-BfMT2
ICP _{conv}	[prot] (M)	2.65×10^{-4}	2.36×10^{-4}
	Zn/MT	<L.D.	<L.D.
	Cd/MT	4.4	3.26
	Cu/MT	<L.D.	<L.D.
ICP _{acid}	[prot] (M)	0.95×10^{-4}	0.91×10^{-4}
	Zn/MT	<L.D.	<L.D.
	Cd/MT	10.3	7.6
	Cu/MT	<L.D.	<L.D.
ESI-MS			
CD			

Taula 17. Resultats de la caracterització dels complexos Cd-MT obtinguts en la biosíntesi de les isoformes BfMT1 i BfMT2 en medis rics en Cd(II) . En les anàlisis d'ICP-AES, les sigles <L.D. indiquen valors per sota del límit de detecció.

En el cas dels experiments tipus (ii) sí va ser possible obtenir un espectre de DC i una especiació prou similar a l'enregistrat en la preparació Cd-BfMT1 *in vivo*, però únicament va ser possible després d'acidificar/reneutralitzar i addicionar alguns equivalents de sulfur (**Fig. 52E i F**). Tots aquests resultats remarquen la gran importància dels lligands sulfur en la formació de complexos Cd-BfMT1 en condicions *in vitro*.

La reacció de desplaçament de $\text{Zn}^{\text{II}}/\text{Cd}^{\text{II}}$ en les preparacions Zn-BfMT2 (**Annex 7.1.4., Làmina 7.1.4.4**), dona lloc, des de l'inici, a una especiació corresponent a la mescla de Cd_6^- , Cd_7^- i $\text{Cd}_8\text{-BfMT2}$ (**Fig. 53**). Els espectres de DC mostren una absorció a *ca.* 245 nm per 4 eq de Cd(II) afegits i després de l'addició de més equivalents aquest senyal es perd eventualment formant una absorció *ca.* (-) 250 nm. Cap dels espectres de DC o ESI-MS enregistrats en l'esmentada valoració aconseguixen assemblar-se als obtinguts pels complexos Cd-BfMT2 *in vivo*.

Al final del procés d'acidificació, reneutralització i addició de sulfur (**Annex 7.1.4., Làmina 7.1.4.5**) de la Cd-BfMT2, on es descoordinen els ions Cd(II) inicialment enllaçats i on els sulfurs àcid/làbils són eliminats de la mostra, és possible reproduir l'espectre de DC de les espècies *in vivo* (**Fig. 53C**), tot i que no va ser possible reproduir perfectament l'especiació detectada en la preparació de Cd-BfMT2 recombinant, però si l'agregat Cd₆-BfMT2 majoritari en les preparacions *in vivo*.

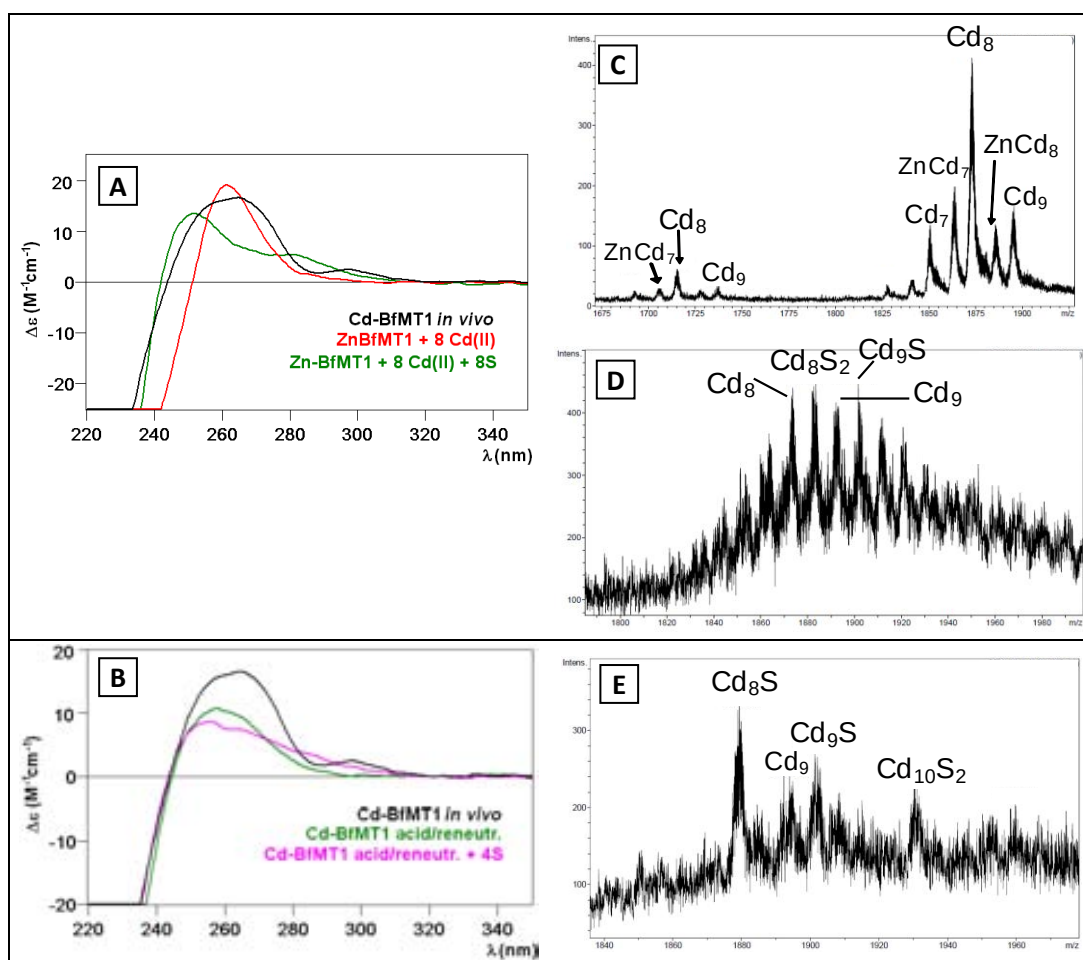


Fig. 52. (A): Espectres de DC de la preparació de Cd-BfMT1 *in vivo* (negre), de l'addició de 8 eq Cd(II) a Zn-BfMT1 (vermell), i sobre la solució anterior 8 eq de Na₂S (verd). (B) Espectres de DC de la preparació Cd-BfMT1MT *in vivo* (negre), l'obtingut després d'acidificar i reneutralitzar aquesta mostra (verd), i la mostra reneutralitzada després de l'addició de 4 eq de Na₂S (lila). (C) Espectre d'ESI-MS obtingut en l'addició de 8 eq Cd(II) a Zn-BfMT1 i (D) l'espectre corresponent a l'addició de 4 eq de Na₂S a la solució anterior. (E) Espectre d'ESI-MS obtingut després de l'addició de 4 eq de Na₂S a la solució Cd-BfMT1 *in vivo* acidificada i reneutralitzada.

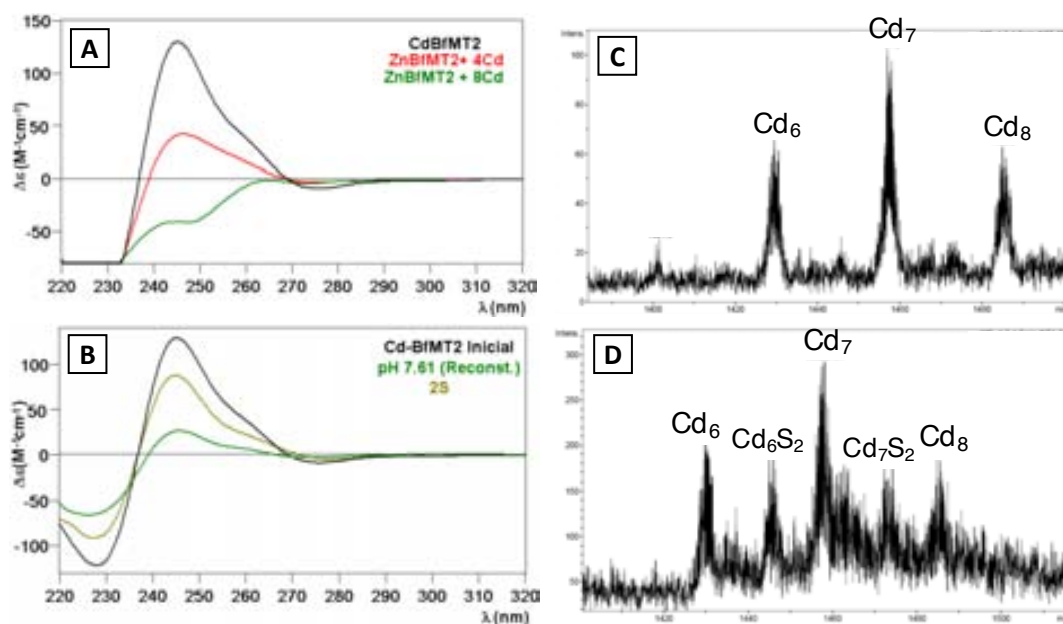


Fig. 53. (A): Espectres de DC de la preparació de Cd-BfMT2 *in vivo* (negre), de l'addició de 4 (vermell) i 8eq Cd(II) (verd) a Zn-BfMT2. (B) Espectres de DC de la preparació Cd-BfMT2 *in vivo* (negre), l'obtingut després d'acidificar i reneutralitzar aquesta mostra (verd), i la mostra reneutralitzada després de l'addició de 2 eq de Na₂S (kaki). (C) Espectre d'ESI-MS obtingut en l'addició de 8 eq Cd(II) a Zn-BfMT2. (D) Espectre d'ESI-MS obtingut després de l'addició de 4 eq de Na₂S a la solució Cd-BfMT2 *in vivo* acidificada i reneutralitzada.

Adicionalment, la presència de complexos que contenen lligands sulfur com a lligands extrems en ambdues preparacions de Cd-BfMT1 i Cd-BfMT2 va promoure la realització d'un estudi de les empremtes de DC i de l'especiació de la mostra en la seva evolució amb el temps. Aquest fenomen s'ha observat prèviament en altres preparacions de Cd-MT, com és el cas particular de la Cup1, una Cu-tioneïna genuïna.^[163] Els canvis més importants s'observen en l'empremta de DC de la Cd-BfMT1 on una absorció ampla inicial evoluciona per formar dues bandes estretes i ben definides centrades a 250 i 275 nm mentre que l'absorció a 300 nm, corresponent a la contribució dels agregats Cd-S²⁻, es manté constant (**Fig. 54A**). Pel contrari, els canvis més importants pel que respecta a l'especiació de la mostra es van observar a la preparació de Cd-BfMT2 (**Fig. 54D**), on l'espècie majoritària Cd₈-BfMT1 de la mescla d'agregats inicial resulta, amb el temps, en la formació del complex únic Cd₈S-BfMT1_{trunc} en la seva forma truncada (**Fig. 54C**). D'altra banda, l'espècie única Cd₆-BfMT2 *in vivo* evoluciona cap a la formació d'una mescla de complexos de Cd(II) contenint sulfurs com a lligands extrems, amb l'espècie majoritària Cd₇S₃-BfMT2.

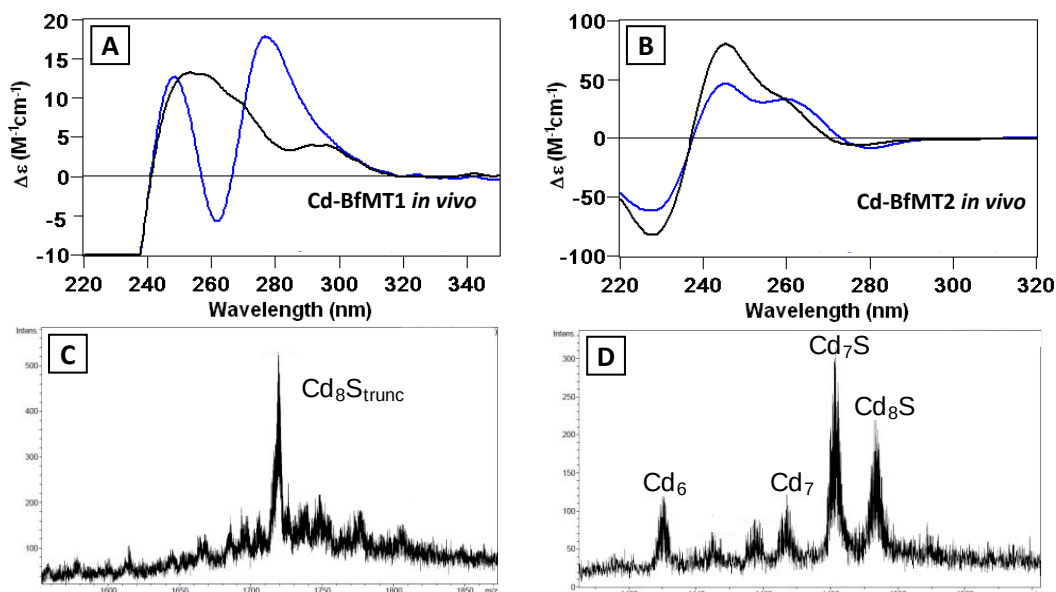


Fig. 54. Espectres de (A) DC de la preparació de Cd-BfMT1 a temps inicial (negre) i després de 28 dies (blau) d'evolució sota condicions d'atmosfera inert. Espectres de (B) DC la preparació de Cd-BfMT2 a temps inicial (negre) i després de 28 dies (blau) d'evolució sota condicions d'atmosfera inert. Espectres d'ESI-MS corresponents a l'evolució amb el temps de les preparacions de Cd-BfMT1 (C) i Cd-BfMT2 (D) després de 28 dies en atmosfera inert.

El conjunt de dades obtingudes en la caracterització dels complexos Cd-BfMT1 i Cd-BfMT2 *in vivo* i *in vitro* permeten concloure que la proteïna BfMT1 presenta una baixa especificitat per a enllaçar Cd(II) i que seria poc eficient per a la coordinació d'aquest ió. Aquesta isoforma mostra característiques relacionades amb les MTs classificades com a Cu-tioneïnes,^[4] com és un paper important dels lligands sulfur en la formació dels complexos Cd-MT, tant *in vivo* com *in vitro*, i la impossibilitat de reproduir les característiques espectroscòpiques ni la especiació de la preparació recombinant mitjançant el desplaçament metàl·lic Zn^{II}/Cd^{II} o després d'un procés d'acidificació i reneutralització. Tot i que la isoforma BfMT2, en coordinar Cd(II), també comparteix alguna d'aquestes característiques esmentades, com ara la presència d'espècies que contenen ions sulfur i la seva evolució amb el temps, considerablement menys importants que per BfMT1. El tret més rellevant que porta a concloure que la isoforma BfMT2 és molt més propera a una MT optimitzada per enllaçar ions divalents és l'obtenció, com a pràcticament espècie única, del complex Cd₆-BfMT2 en cultius suplementats amb Cd(II), mostrant un espectre de DC molt definit i intens corresponent a complexos M-MT amb una bona estructuració.

3.2.1.3. Comportament de BfMT1 i BfMT2 envers Cu(I)

Per tal d'obtenir els complexos Cu-BfMT *in vivo* es va procedir a la síntesi recombinant dels pèptids BfMT1 i BfMT2 en medis cel·lulars enriquits amb Cu(II) sota condicions d'aïreació normal i també a baixa oxigenació.

En el cas de les produccions recombinants dels complexos Cu-BfMT2, després de varis intents, va ser impossible obtenir cap producte d'aquesta biosíntesi, fet que indica que aquesta proteïna ha de tenir molt baixa preferència per l'ió Cu(I) en condicions fisiològiques. Pel que fa als complexos Cu-BfMT1 *in vivo* (**Taula 18**), la seva formació en ambdues condicions d'oxigenació va aportar informació molt valuosa referent a la seva coordinació i optimització per enllaçar Cu(I).

Cu-BfMT1				
		Oxygenació normal		Baixa oxigenació
		Tipus 1	Tipus2	
ICP _{conv}	[prot] (M)	0.55×10^{-4}	0.57×10^{-4}	0.19×10^{-4}
	Zn/MT	1.8	2.7	<L.D.
	Cd/MT	<L.D.	<L.D.	<L.D.
	Cu/MT	8.0	5.1	11.9
ICP _{acid}	[prot] (M)	0.59×10^{-4}	0.50×10^{-4}	0.12×10^{-4}
	Zn/MT	1.9	2.7	<L.D.
	Cd/MT	<L.D.	<L.D.	<L.D.
	Cu/MT	9.09	5.3	14.6

Taula 18. Resultats de la caracterització dels complexos Cu-MT obtinguts en la biosíntesi BfMT1 en medis rics en Cu(II). En les anàlisis d'ICP-AES, les sigles <L.D. indiquen valors per sota del límit de detecció.

En la biosíntesi de BfMT1 en condicions d'oxigenació normal es van obtenir dos tipus de preparacions, anomenades de tipus 1 i 2. En la caracterització per ESI-MS d'aquestes solucions es va identificar la presència d'una mescla d'espècies Cu,Zn-BfMT1 en les quals M₉-BfMT1 (tipus 1) i M₁₀-BfMT1 (tipus 2) (M = Zn + Cu) van ser les espècies majoritàries (**Fig. 55**). Gràcies als espectres d'ESI-MS a pH 2.4, condicions d'anàlisi on només l'ió Cu(I) es manté enllaçat, es va poder determinar com el complex M₁₀-BfMT1 de la preparació de tipus 1 correspon principalment a l'agregat Cu₈Zn₂-BfMT1 (**Fig. 55B**), en concordança amb els resultats d'ICP (**Taula 18**). Pel contrari, els agregats de la preparació de tipus 2 observats a pH àcid estan formats per una mescla de diversos complexos heterometàl·lics Cu_xZn_y-BfMT1, on x = 4, 5, 6 i x+y=9 (**Fig. 55D**).

En la bioproducció de BfMT1 en condicions de baixa oxigenació, els resultats d'ICP-AES i el fet que els espectres de masses siguin totalment anàlegs a pH 7.0 i 2.4 permeten identificar una mescla d'agregats homometàl·lics Cu-BfMT1 amb estequiometries que varien de Cu₉- fins a Cu₁₂-BfMT1 (**Fig. 55F**). Finalment, cal ressaltar la presència de la forma truncada en quantitat poc significativa en algunes de les produccions obtingudes. El que sí és rellevant és com aquesta forma truncada, al igual que succeïa amb les preparacions de Zn-BfMT1, mostra el mateix

comportament coordinant enfront Cu(I) que la seva forma sencera, suggerint la no participació dels aminoàcids truncats en la coordinació d'aquest metall.

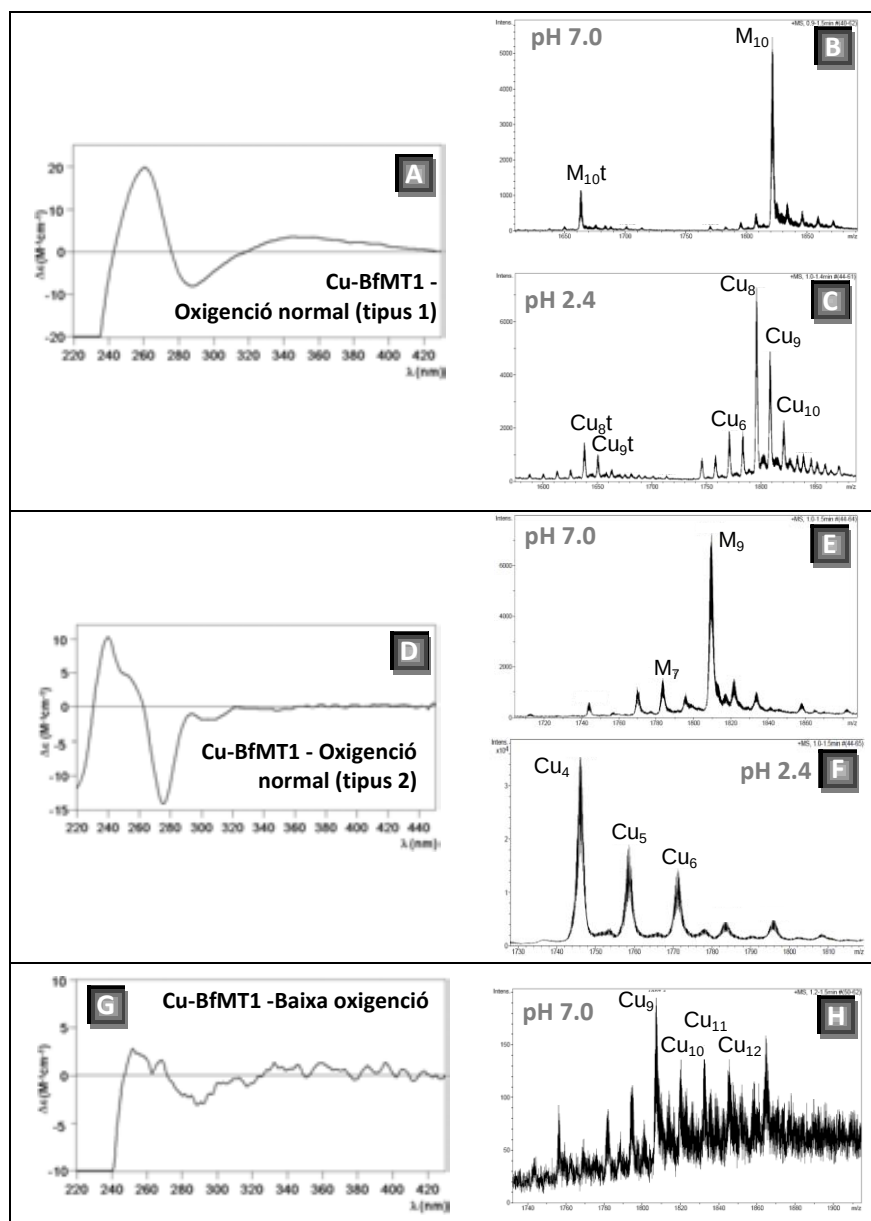


Fig. 55. Espectres de DC de les diferents preparacions de Cu-BfMT1 a oxigenació normal, on **A** correspon a la de tipus 1 i **D** a la tipus 2, i de la preparació a baixa oxigenació (**G**). Espectres de masses corresponents a les produccions a oxigenació normal de tipus 1 (enregistrats a pH 7.0 (**B**) i pH 2.4 (**C**)) i de tipus 2 (enregistrats a pH 7.0 (**E**) i pH 2.4 (**F**)). Espectre d'ESI-MS enregistrat a pH 7.0 (**H**) corresponent a la preparació a baixa oxigenació (espectres de masses on ambdós valors de pH són completament anàlegs).

Mirant les característiques espectroscòpiques de totes tres produccions de Cu-BfMT1 (**Fig. 55A i C**) s'observa que les preparacions de tipus 1 i 2 a oxigenació normal, tot i presentar una empremta de DC diferent, mostren uns espectres de DC intensos i ben definits, en contrast amb l'enregistrat per la producció de Cu-BfMT1 a baixa oxigenació (**Fig. 55E**), on es presenta un espectre de DC pràcticament pla. Això permet suggerir que la presència d'ions Zn(II) en les preparacions de tipus 1 i 2 és crucial i necessària per a la formació de complexos Cu,Zn-BfMT1 estables i ben estructurats.

Una vegada caracteritzat el comportament *in vivo* d'aquestes dues isoformes d'MT en front l'ió monovalent Cu(I), es van realitzar els estudis del desplaçament metàl·lic de Zn^{II}/Cu^I a partir de la producció recombinant Zn-BfMT1 (**Annex 7.1.4., Làmina 7.1.4.6**). En aquest procés s'obtenen uns espectres de DC amb uns senyals típics de la coordinació de Cu(I) a les metal·lotioneïnes^[163, 164] i, a més, va ser possible reproduir alguns dels espectres de DC i les especiacions trobades en les produccions Cu-BfMT1 *in vivo*. L'addició d'entre 4 i 6 eq de Cu(I) (**Fig. 56A**) dona lloc a una mescla d'espècies, on M₉-BfMT1 (M = Zn + Cu) apareix com a majoritària, anàlogament al que s'observa en les produccions de tipus 1, si bé ambdues mostres no comparteixen el mateix espectre de DC. En addicionar més equivalents de la solució metàl·lica, en concret 12 eq de Cu(I), el complex M₁₀-BfMT1 esdevé l'espècie majoritària d'una mescla que posseeix un espectre de DC molt similar al de la producció de tipus 1 (**Fig. 57**). Finalment, l'addició d'un excés de Cu(I) a aquesta solució provoca la formació d'una mescla de complexos homometàl·lics amb estequiometries que variaven de Cu₇- a Cu₁₅-BfMT1 i que recorden, en certa manera l'especiació resultant de la síntesi a baixa oxigenació (**Fig. 56C**). Al llarg de tota la valoració s'obtenen les mateixes especiacions per a les dues formes de la BfMT1 en solució (la sencera i la truncada), reafirmant la idea de que aquests aminoàcids de la proteïna finals que es trunquen no tenen un paper rellevant en la coordinació als ions metàl·lics estudiats. Així, es confirma la reproducció, en diferents estadis de la valoració amb Cu(I) de Zn-BfMT1, de l'especiació i els espectres de DC enregistrats per les diferents produccions recombinants Cu-BfMT1, les quals corresponen a diferents condicions de disponibilitat del Cu(I). Aquestes dades posen de manifest que el comportament observat quan la isoforma BfMT1 enllaça Cu(I) suggereix que aquesta proteïna pot enllaçar diferents quantitats de Cu(I) en una varietat de condicions fisiològiques i, a la vegada, donant lloc a complexos igualment estables.

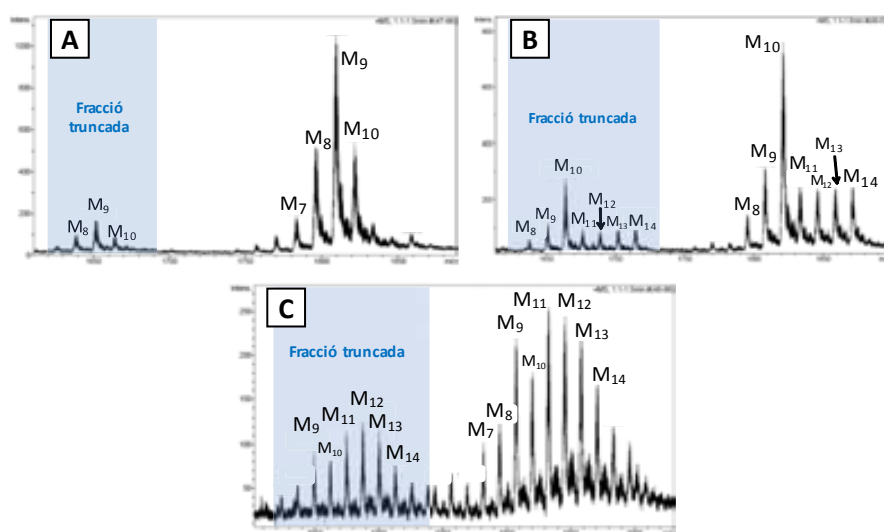


Fig. 56. Espectres d'ESI-MS corresponents a l'addició de 6(A), 12 (B) i 18 (C) eq de Cu(I) a les preparacions de Zn-BfMT1 enregistrats a pH 7.0.

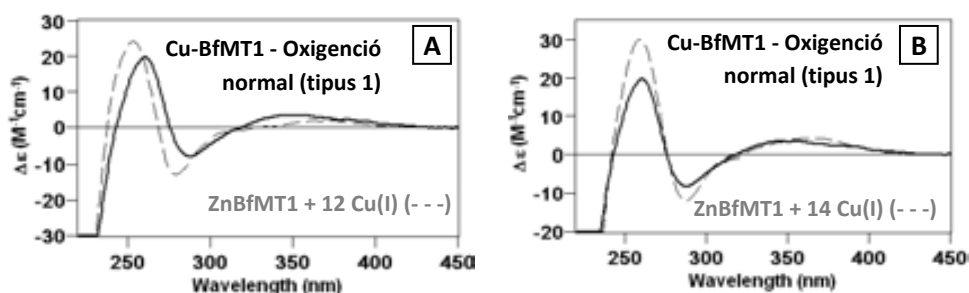


Fig. 57. Espectres de DC de la producció Cu-BfMT1 a oxigenació normal de tipus 1 (A i B línia negra) i els resultants de l'addició de 12 (A, puntejat) i 14 (B, puntejat) equivalents de Cu(I) a la preparació recombinant de Zn-BfMT1.

Per altra banda, l'estudi del desplaçament *in vitro* de Zn(II) per Cu(I) en la preparació recombinant Zn-BfMT2 ha proporcionat algunes evidències per poder entendre la dificultat d'obtenir complexos Cu-BfMT2 *in vivo* a partir de les corresponents cèl·lules d'*E.coli* quan s'han fet créixer en medis suplementats amb Cu(II). En les addicions successives d'equivalents de Cu(I) a una alíquota de la preparació Zn-BfMT2, els espectres d'UV-Vis i ESI-MS enregistrats mostren com el Cu(I) s'enllaçava al pèptid a mida que es va addicionant, però sorprenentment l'espectre de DC pràcticament no variava, mostrant uns senyals pràcticament plans, la qual cosa suggereix la formació d'uns complexos molt poc estructurats (**Fig. 58**). Els espectres de masses d'aquesta valoració, enregistrats en paral·lel, mostren com l'addició de Cu(I) provoca la formació d'una mescla d'espècies heteronuclears (Zn(II),Cu(I)) i homonuclears (Cu(I)), el contingut de les quals depèn directament de la quantitat de Cu(I) addicionat, donant lloc fins i tot a l'aparició de la forma apo-BfMT2 amb un excés de Cu(I) en el medi, esdevenint majoritària per 18 eq de Cu(I) afegits (**Fig. 58B i C**). Les dades descrites demostren la baixa disposició d'aquesta proteïna per enllaçar Cu(I), justificant així la impossibilitat de formar complexos Cu-BfMT2 *in vitro*.

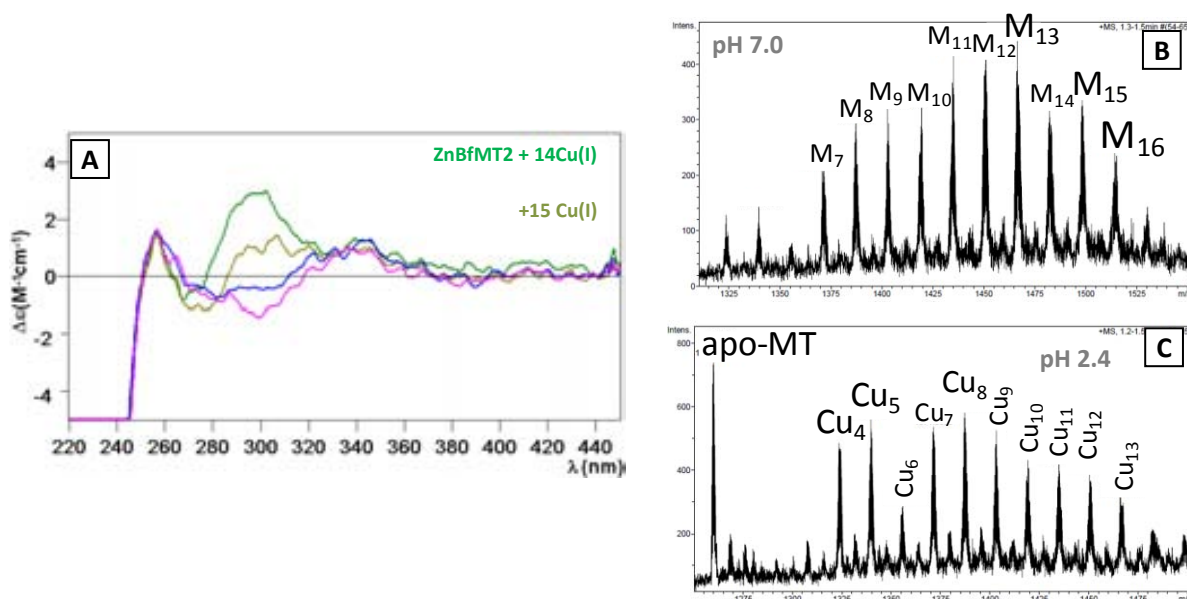


Fig. 58. (A) Espectres de DC obtinguts en els estadis finals de la valoració de Zn-BfMT2 després d'afegir 14 (verd), 15 (kaki), 16 (blau) i 17 (rosa) equivalents de Cu(I). Espectres de masses enregistrats a pH 7.0 (B) i pH 2.4 (C) en afegir 16 eq de Cu(I) a la preparació de Zn-BfMT2.

3.2.2. Consideracions globals

Tenint en compte el conjunt de dades obtingudes en la caracterització de les propietats coordinants de les isofomes BfMT1 i BfMT2 enfront de Zn(II), Cd(II) i Cu(I), tant *in vivo* com *in vitro*, es pot concloure que BfMT1, tot i que lluny de ser òptima per a la coordinació de Cu(I), presenta certes característiques típiques d'una Cu-tioneïna.^[72] BfMT1, *in vivo*, dóna lloc a la formació de complexos homometàl·lics de Cu(I) (*i.e.* cultius rics en Cu(II) a baixa oxigenació) a més de mostrar una baixa especificitat per la coordinació a Cd. De la mateixa manera, es pot concloure que BfMT2 té un cert caràcter de Zn-tioneïna, si bé dista molt de ser una Zn-tioneïna genuïna. En conjunt, es pot considerar doncs que l'amfiox *B.floridæ* (i per extensió el *B.lanceolatum*) conté dues isoformes d'MT amb propietats metàl·liques clarament diferenciades, la qual cosa li deu permetre controlar els nivells intracel·lulars tant de Zn(II) com de Cu(I), alhora de fer front a una possible contaminació del medi amb metalls tòxics, com Cd(II). El rol d'aquestes isoformes d'MT es veu reflectit, i presenta una gran correlació amb les observacions fetes i el comportament metàl·lic determinat per Zn(II), Cd(II) i Cu(I), també en els estudis a nivell de cDNA amb *B.lanceolatum*. Aquests postulen que *BfMT1* pot ser considerat com un gen essencialment constitutiu i *BfMT2* clarament induïble (**Annex 7.2, Article 6**).

3.3. Estudi del sistema d'MTs de la mosca ***Drosophila melanogaster***

3.3. Estudi del sistema d'MTs de la mosca *Drosophila melanogaster*

3.3.1. Estudi de la capacitat coordinant d'una cinquena isoforma d'MT de *Drosophila melanogaster*: *MtnE*

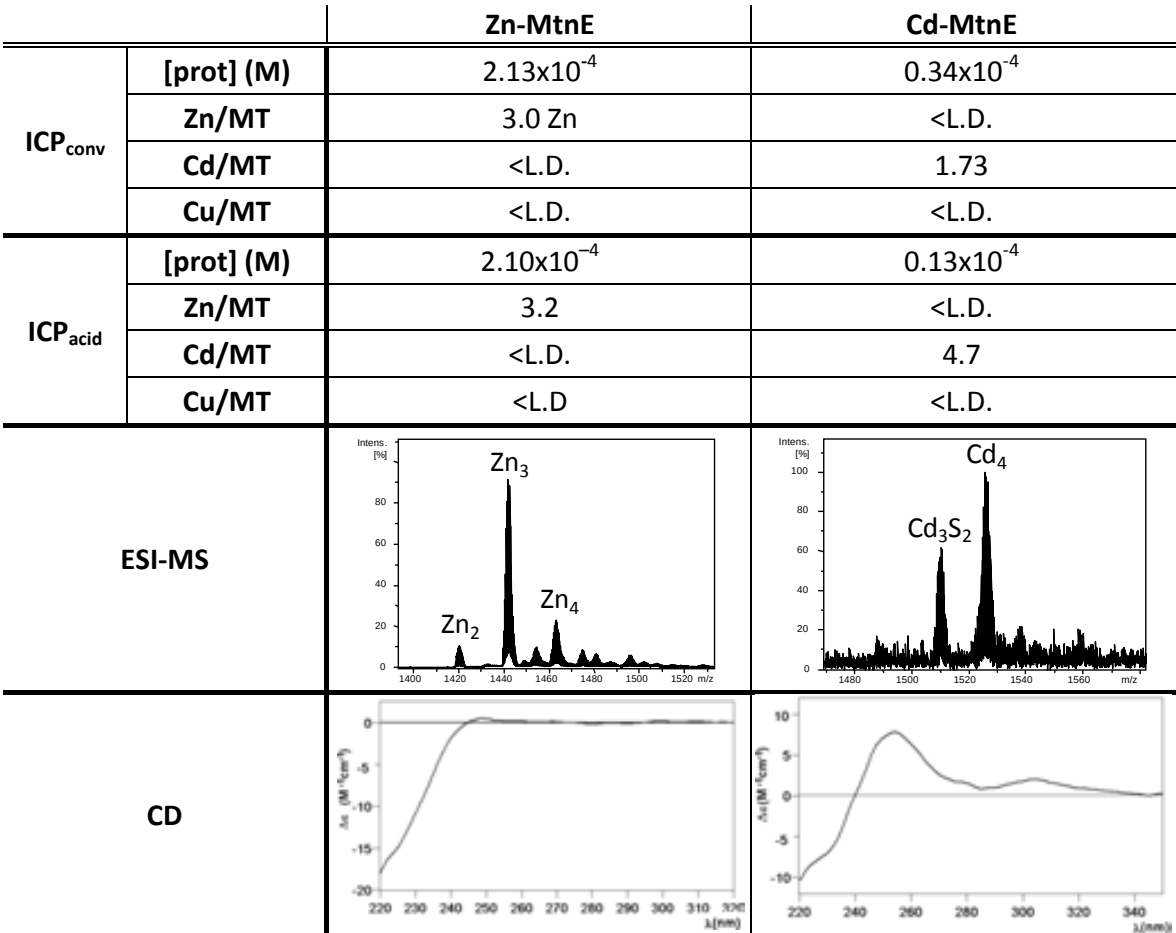
La mosca *Drosophila melanogaster* és un organisme àmpliament estudiat degut a que se'l considera model de diptera. Fins fa poc temps era acceptat que el sistema d'MTs de *D.melanogaster* estava compost per 4 isoformes (MtnA, MtnB, MtnC i MtnD), però ha estat recentment que es va descobrir la presència d'una cinquena isoforma, anomenada MtnE (**Introducció, apartat 1.2.2.2.**), a partir d'un estudi seqüencial del seu genoma.

A continuació es presenten els principals resultats obtinguts en l'estudi de les propietats coordinants de la isoforma MtnE enfront de Zn(II), Cd(II) i Cu(I) (**Article 6**), de manera anàloga a com es va fer anteriorment amb les altres 4 isoformes de *D.melanogaster*.

3.3.1.1. Comportament d'MtnE envers Zn(II) i Cd(II)

Amb la finalitat d'avaluar les propietats coordinants, enfront Zn(II) i Cd(II), de la proteïna MtnE en medis fisiològics, es va procedir a la seva síntesi de forma recombinant, en cultius d'*E.coli* suplementats amb un excés de Zn(II) i Cd(II), per a obtenir els corresponents complexos M-MtnE ($M = \text{Zn}^{2+}$ o Cd^{2+}) *in vivo*. La caracterització dels agregats així obtinguts s'ha realitzat mitjançant diverses tècniques, com ICP-AES, ESI-MS i DC. Els resultats obtinguts han permès identificar la presència de l'espècie $\text{Zn}_3\text{-MtnE}$ com a complex majoritari en la bioproducció en medis suplementats amb Zn(II), acompanyat de petites quantitats de $\text{Zn}_4\text{-}$ i $\text{Zn}_2\text{-MtnE}$ (**Espectre ESI-TOF de la preparació de Zn-MtnE, Taula 19**). Per altra banda, l'espectre de DC d'aquesta preparació és pràcticament pla, indicant un baix grau d'estructuració d'aquests agregats, tret característic de les MTs classificades com a Cu-tioneïnes.

Pel que fa als resultats en la producció recombinant d'MtnE en medis rics en Cd(II), aquests mostren la formació dels complexos $\text{Cd}_4\text{-}$ (majoritari) seguit per $\text{Cd}_3\text{S}_2\text{-MtnE}$, on la presència d'aquests ions S^{2-} ha estat corroborada per les dades d'ICP-AES (discrepància entre les mesures d'ICP àcid amb el convencional). L'espectre de DC d'aquesta preparació, no gaire intens ni definit, amb unes bandes força amples, mostra els senyals habituals tant dels enllaços Cd- S_{Cys} esperats com de Cd-S^{2-} , amb absorcions a 250 nm i 300 nm, respectivament (**Taula 19**).



Taula 19. Resultats de la caracterització dels complexos Zn-MtnE i Cd-MtnE obtinguts en la biosíntesi de l'MtnE en medis rics en Zn(II) i Cd(II) respectivament. En les anàlisis d'ICP-AES, les sigles <L.D. indiquen valors per sota del límit de detecció.

L'estudi *in vitro* del desplaçament metàl·lic de Zn(II) per Cd(II) de l'espècie Zn-MtnE *in vivo* (**Fig. 4, Article 6**), permet observar que al llarg de la valoració s'han reproduït lleugerament les característiques espectroscòpiques (empremta de DC) de la preparació Cd-MtnE *in vivo*, a excepció del senyal a 300 nm (**Fig. 59A**). Quan s'han addicionat 4 eq de Cd(II) s'observa una saturació dels senyals dels espectres, tant d'UV-Vis com de DC, presentant aquests darrers bandes a *ca.* 250 nm i 270 nm i no és fins a l'addició de 10 eq de Cd(II) que s'observa la disminució del senyal a 250 nm. El colze observable a 270 nm és indicatiu de la presència de lligands S^{2-} en la preparació de Zn-MtnE, però en concentració tan baixa que no van poder ser detectats en caracteritzar la bioproducció Zn-MtnE, ni van permetre la reproducció de la banda a 300 nm de l'espectre de DC dels complexos Cd-MtnE *in vivo* (corresponents a agregats $Cd-S^{2-}$ de mida gran) com tampoc la formació de l'espècie Cd_3S_2 -MtnE (observada en la producció en medis suplementats en Cd(II) (**Taula 19**)). Les dades d'ESI-MS de les mostres obtingudes en la valoració amb Cd(II) anteriorment descrita (**Fig. 59B i C**) mostren la formació de l'espècie Cd_4 -MtnE com a majoritària, semblant a la Cd-MtnE *in vivo*, però a més es detecta la presència del complex Cd_3Zn -MtnE, persistent fins i tot en presència d'un excés de Cd(II) en solució (10 eq de Cd(II) afegits (**Fig. 59C**)), indicant que aquest ió Zn(II) enllaçat és molt resistent a intercanviar-se

per Cd(II). El fet que la intensitat de les espècies es mantinguin pràcticament constants des de l'inici fins al final de la valoració indica l'especial estabilitat dels complexos Cd-MtnE formats *in vitro*.

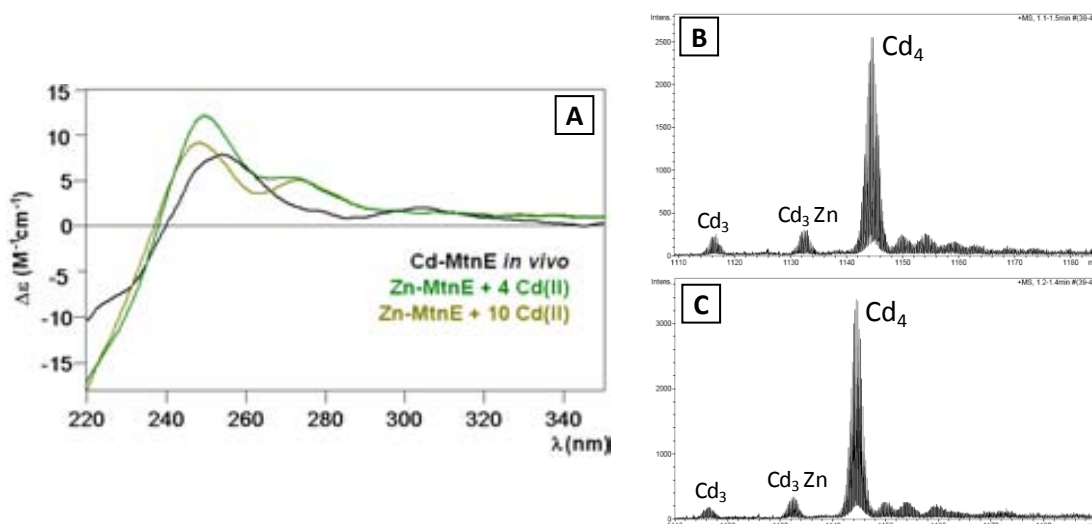


Fig. 59. Espectres de (A) DC obtinguts de la preparació de Cd-MtnE (negre), de l'addició de 4 (verd) i 10 (kaki) eq de Cd(II) a Zn-MtnE. Espectres de d'ESI-MS obtinguts en l'addició de 3 (B) i 10 (C) eq de Cd(II) a Zn-MtnE.

L'últim dels experiments realitzats per tal d'avaluar l'estabilitat dels complexos Cd-MtnE i la participació dels lligands S^{2-} , ha consistit en l'acidificació amb HCl de la preparació Cd-MtnE *in vivo* fins a un pH inferior a 1, on els ions S^{2-} s'alliberen en forma de H_2S (que és un gas volàtil), i la posterior reneutralització amb NaOH. L'espectre de DC obtingut finalment és molt semblant a l'enregistrat en addicionar 4 eq de Cd(II) a la solució de Zn-MtnE (**Fig. 60A**). En addicionar ions S^{2-} a la mostra es va aconseguir obtenir un espectre de DC on la banda inicialment situada cap a 275 nm es mou cap a longituds d'ona superiors, aproximadament a 285 nm, indicant la participació dels lligands S^{2-} addicionats en la coordinació de Cd(II) (**Fig. 60B**). Tot i el petit desplaçament de la banda descrit, no s'aconsegueix en cap cas reproduir perfectament l'empremta de DC de les preparacions de Cd-MtnE *in vivo*. Això demostra que els cromòfors Cd- S^{2-} tant característics de la producció recombinant Cd-MtnE només es poden obtenir i/o formar en els cultius cel·lulars, quan hi ha suficients ions S^{2-} disponibles en el medi.

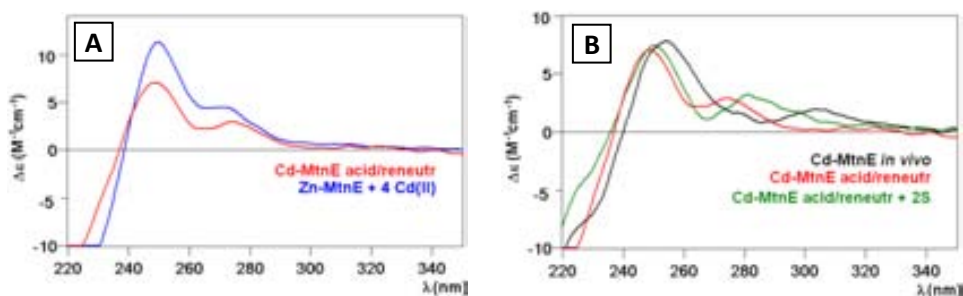


Fig. 60. Espectre de (A) DC de la preparació de Cd-MtnE després d'un procés d'acidificació i reneutralització (vermell) i d'afegir 4 eq de Cd(II) (blau) a la solució de Zn-MtnE. Espectres de (B) DC de la preparació Cd-MtnE *in vivo* (negre), després d'un procés d'acidificació i reneutralització (vermell), i afegint 2 eq de Na_2S a la solució anterior (verd).

3.3.1.2. Comportament d'MtnE envers Cu(I)

Per tal d'obtenir els complexos Cu-MtnE *in vivo* i, com es fa de forma rutinària en l'estudi presentat en aquesta Tesi Doctoral, es va dur a terme la síntesi d'MtnE en medis de cultiu cel·lulars rics en coure sota dues condicions d'oxigenació diferents, produccions a oxigenació normal i a baixa oxigenació. En la biosíntesi d'MtnE a baixa oxigenació, després de 3 intents infructuosos, no va ser possible obtenir cap informació sobre la formació dels complexos de Cu(I) *in vivo* en aquestes condicions, a diferència del que es va observar en la preparació de la mateixa proteïna a oxigenació normal, que sí que va poder ser caracteritzada. Aquest fenomen observat corrobora el que ja s'havia descrit anteriorment pel grup de recerca on s'emmarca aquesta Tesi i que va demostrar com el grau d'oxigenació en els medis de cultius cel·lulars d'*E.coli* rics en Cu(II) afecta i determina la formació i les característiques dels complexos Cu-MT *in vivo* obtinguts.

L'espectre de DC enregistrat corresponent a la producció d'MtnE a oxigenació normal presenta una empremta intensa i ben definida amb absorcions corresponents típicament a la coordinació de l'MT a l'ió Cu(I)^[91] (**Fig. 61A**). L'espectre de masses enregistrat a pH 7.0 (**Fig. 61B**) mostra l'existència d'un tipus d'agregats d'estequiometria M_5 -MT com a espècie majoritària, on M equivaldria a Zn(II) i/o Cu(I), indistingibles per aquesta tècnica a causa de la gran proximitat en els valors de les seves masses atòmiques. En l'espectre d'ESI-MS a pH 2.4 (en aquest valor de pH àcid només és manté enllaçat a la metal·lotioneïna els ions de Cu(I)) es va identificar la presència de complexos homonuclears Cu_5 -MtnE (majoritari) i de Cu_4 -MtnE presentant una abundància relativa d'aproximadament 1:2 (**Fig. 61C**). A partir de l'espectre a pH 2.4, així com amb els valors del contingut metàl·lic mesurats per ICP-AES (4.7 Cu/MT i 0.8 Zn(II)/MT, **Taula 20**) es confirma que l'especiació obtinguda en la biosíntesi, els agregats M_5 -MtnE detectats a pH 7.0, correspon a una mescla del complex homonuclear Cu_5 -MtnE i l'espècie heteronuclear Cu_4Zn -MtnE.

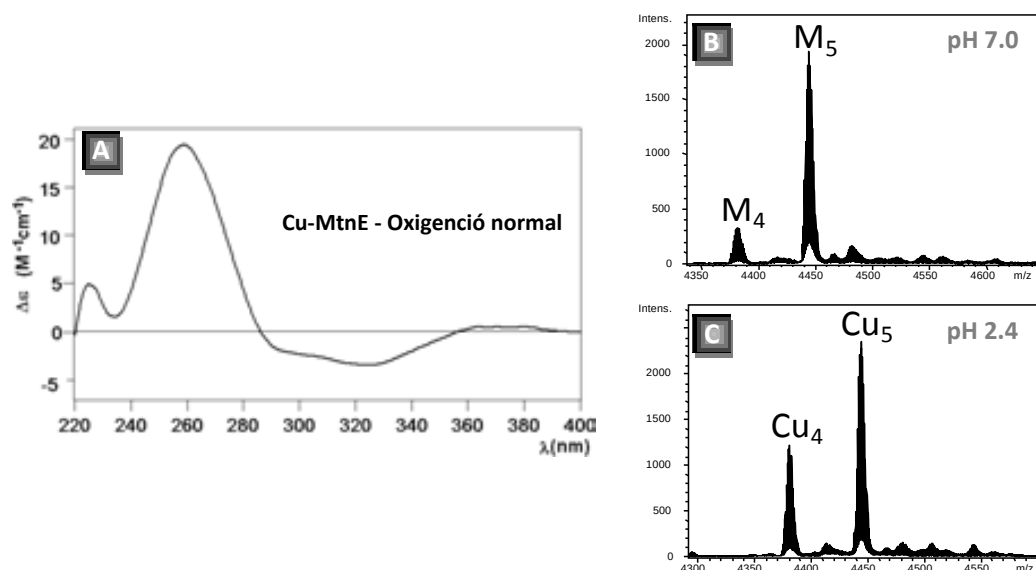


Fig. 61. Espectre de (A) DC de la preparació de Cu-MtnE en condicions d'oxigenació normal. Espectres d'ESI-MS de Cu-MtnE enregistrats a pH 7.0 (B) i 2.4 (C).

Cu-MtnE		
		Oxygenació normal
ICP _{conv}	[prot] (M)	0.90x10 ⁻⁴
	Zn/MT	0.8
	Cd/MT	<L.D.
	Cu/MT	4.7

Taula 20. Resultats de la caracterització dels complexos Cu-MtnE obtinguts en la biosíntesi de l'MtnE en medis rics en Cu(II) en condicions d'oxigenació normal mitjançant ICP-AES. Les sigles <L.D. indiquen valors per sota del límit de detecció. En aquesta taula es mostren només els resultats corresponents a l'ICP-AES convencional ja que no presenta diferència significativa amb els resultats obtinguts en condicions àcides.

Per tal d'avaluar la capacitat d'enllaç de la isoforma MtnE enfront Cu(I), es va realitzar la valoració de Zn-MtnE amb addicions seqüencials d'una solució de Cu(I) obtenint-se els corresponents complexos Cu-MtnE *in vitro* (**Fig. 5, Article 6**). Com a resultat d'afegir els 6 primers equivalents de Cu(I) a la mostra de Zn-MtnE es va observar el desplaçament metàl·lic Zn^{II}/Cu^I en un procés isosbètic i isodicroic, suggerint un intercanvi metàl·lic de tipus cooperatiu. L'existència del procés cooperatiu es va confirmar a partir dels espectres d'ESI-MS, a pH 7.0 i 2.4, enregistrats durant l'addició dels primers equivalents (fins a 6 eq de Cu(I)) on s'observa una especiació constant amb la formació dels complexos Cu₅⁻ i Cu₄-MtnE des de l'inici de la valoració, incrementant-se l'abundància en solució d'aquests complexos a mesura que s'afegien més equivalents de Cu(I) en detriment dels agregats Zn₃-MtnE inicials (espectres d'ESI-MS a pH 7.0) o de la forma apo-MtnE (espectres de masses enregistrats a pH 2.4) (**Article 6**). En aquest punt de la valoració, després de 6 eq de Cu(I) afegits, s'observa una saturació dels senyals de DC i UV-Vis i es reproduïx perfectament tant l'empremta de DC (**Fig. 62A**) com l'especiació detectada en la bioproducció de Cu-MtnE en condicions d'oxigenació normal, en produir-se la transformació complerta de l'espècie majoritària inicial Zn₃-MtnE en els complexos Cu₅⁻ i Cu₄Zn-MtnE (**Fig. 62B i C**).

Quan s'afegeixen més equivalents de Cu(I), entre 6 i 8, s'observa la disminució d'intensitat en les absorpcions de DC, indicant un possible procés de desestructuració dels complexos, acompanyat de la formació d'espècies amb major contingut metàl·lic (Cu₆⁻ a Cu₈-MtnE) (**Article 6**). En presència d'un excés de Cu(I) en solució, després d'afegir 10 eq, el procés de desestructuració s'accentua, observant-se la pèrdua pràcticament complerta dels senyals presents en els espectres de DC i l'aparició de la forma apo-MT en solució. La marcada inestabilitat dels complexos M₅-MT formats *in vitro* en presència d'un excés de Cu(I), completament anàlegs als obtinguts de forma recombinant en condicions d'oxigenació normal, dóna sentit a la impossibilitat observada d'obtenir qualsevol tipus d'agregats Cu-MtnE de forma recombinant en medis de cultius cel·lulars en condicions de baixa oxigenació, i per tant, a nivells

elevats de Cu(I) a l'interior de la cèl·lula. La baixa estabilitat de tots els compostos Cu-MtnE, tant *in vivo* com *in vitro*, en medis on existeixen elevats nivells de Cu(I) i la formació preferent d'una espècie heterometàl·lica M₅-MT, amb presència de l'ió Zn(II), suggereixen que, tot i que aquesta isoforma presenta moltes característiques de les Cu-tioneïnes, no es podria classificar com a tal, sinó més aviat com una Cu-tioneïna no genuïna, de caràcter intermedi.

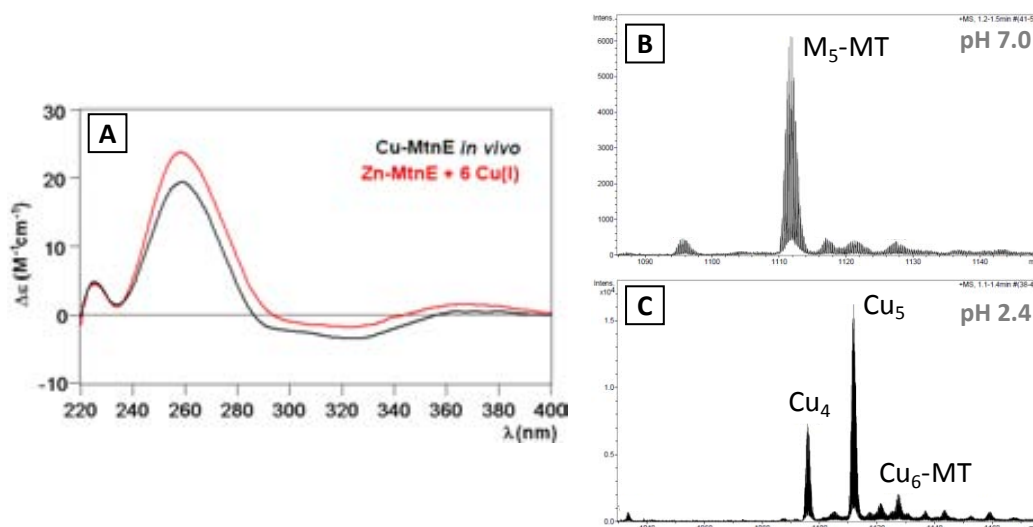


Fig. 62. Espectres de (A) DC obtinguts de la preparació de Cu-MtnE (negre) i de l'addició de 6 (vermell) eq de Cu(I) a Zn-MtnE. Espectres de d'ESI-MS obtinguts en l'addició de 6 eq de Cd(II) a Zn-MtnE enregistrats a pH 7.0 (B) i 2.4 (C).

3.3.1.3. Comparació de la capacitat d'enllaç d'MtnE en el sistema d'MTs de l'organisme de *Drosophila melanogaster*

El sistema MT existent en *Drosophila* (**Introducció, apartat 1.2.2.2.**) ha estat objecte d'un intensiu estudi per part de diferents grups de recerca. Concretament es van caracteritzar les propietats coordinants, tant *in vivo* com *in vitro*, de les primeres isoformes descobertes (MtnA, MtnB, MtnC i MtnD) per part del grup de recerca en el que s'emmarca aquesta Tesis doctoral. Com ja s'ha comentat en capítols anteriors, recentment es va descobrir una cinquena isoforma d'MT (MtnE) i s'ha caracteritzat la seva preferència metàl·lica seguint la mateixa metodologia que per a les altres isoformes. Així les dades aportades per aquest estudi permeten posar en relació les característiques coordinants enfront Zn(II), Cd(II) i Cu(I) d'MtnE amb la resta d'isoformes presents en aquest organisme. A continuació es presenta la discussió dels resultats obtinguts en l'anàlisi de les cinc isoformes d'MT presents en *D. melanogaster* per tal d'establir-hi relacions i divergències en el polimorfisme d'MTs observat.

L'estudi dut a terme amb la isoforma MtnE enfront els ions metàl·lics Zn(II), Cd(II) i Cu(I), recopilat i discutit en els apartats anteriors, permet classificar la proteïna com una Cu-tioneïna de caràcter intermig (no extrema o genuïna). Com ja s'ha comentat amb anterioritat, el sistema d'MTs en *Drosophila* comprèn 4 isoformes més, a part d'MtnE: MtnA, MtnB, MtnC i MtnD. A la **Taula 21** es presenten els resultats obtinguts sobre el contingut metàl·lic i les espècies metall-MT

aïllades en les diferents produccions en medis rics en Zn(II), Cd(II) i Cu(I) de cadascuna de les isoformes d'MT de l'organisme *D.melanogaster*, recollits dels diferents articles publicats.^[90, 113, 165] En aquesta taula s'observa, en general, un comportament diferenciat d'MtnE pel que respecta als complexos metall-MT *in vivo* formats.

Isoforma	Nº Cys	Medi de cultiu suplementat amb ^a					
		Zn (300 µM final)		Cd (300 µM final)		Cu (500 µM final)	
		Contingut metall/Mtn ^b	Espècies metall-Mtn ^c	Contingut metall/Mtn ^b	Espècies metall-Mtn ^c	Contingut metall/Mtn ^b	Espècies metall-Mtn ^c
MtnA	10	3.5 Zn	Zn ₄ > Zn ₃	3.8 Cd	Cd ₄ > Cd ₃ ≈ Cd ₄ S ₂	7.0 Cu	Cu ₈ > Cu ₇
MtnB	12	3.7 Zn	Zn ₄ > Zn ₅	4.1 Cd	Cd ₄ ≈ Cd ₄ S > Cd ₅ ≈ Cd ₅ S	8.9 Cu	Cu ₉ > Cu ₈
MtnC	12	3.9 Zn	Zn ₄ > Zn ₅	2.3 Cd	Cd ₄ > Cd ₅	4.2 Cu	Cu ₅ > Cu ₆
MtnD	12	3.8 Zn	Zn ₄ > Zn ₅	2.0 Cd	Cd ₅	5.3 Cu	Cu ₅ > Cu ₆
MtnE	10	3.3 Zn	Zn₃ >> Zn₄	4.7 Cd	Cd₄ > Cd₃S₂	4.7 Cu 0.8 Zn	Cu₅ > Cu₄Zn₁ > Cu₄

Taula 21. Comparació dels resultats obtinguts en les produccions recombinants de les cinc isoformes d'MT de *Drosophila* on es mostra el contingut metàl·lic i els complexos metall-MT d'MtnA, MtnB, MtnC, MtnD i MtnE recuperats de la síntesi recombinant en medis enriquits en Zn(II), Cd(II) i Cu(II) ^a. Les dades de totes isoformes, excepte MtnE, han estat extretes de publicacions anteriors: Valls et al., 2000 per MtnA; Domenech et al., 2003 per MtnB i Egli et al., 2006 per MtnC and MtnD. ^b Contingut metall/Mtn calculat a partir de les mesures d'ICP-AES de Zn, Cd, Cu i S. ^c Espècies metall-Mtn identificades a partir dels espectres d'ESI-MS corresponents.

En la producció d'MtnE en medis rics en Zn(II), on per la majoria de produccions de les diferents isoformes d'Mtn s'obté l'agregat Zn₄-Mtn corresponent com a espècie majoritària, es va detectar el complex Zn₃-MtnE majoritari, acompanyat d'una petita proporció de Zn₄-MtnE. Aquesta diferència de comportament *in vivo* no es veu reflexada en els espectres de DC de cada preparació Zn-Mtn, ja que totes mostren uns senyals pràcticament plans per sobre de 245 nm (**Fig. 63A**), característic d'espècies poc estructurades, tret relacionat amb proteïnes amb caràcter de Cu-tioneïna. Les dades obtingudes indiquen una menor capacitat d'enllaç *in vivo* d'MtnE per l'ió Zn(II) en comparació amb les altres isoformes Mtn, i en concret menor que les que s'anomenen MtnB-like (MtnB, MtnC i MtnD), la qual cosa és coherent amb el fet que MtnE conté 2 residus de Cys menys que aquests tipus d'isoformes. En canvi, la diferència amb MtnA, que té 10 residus de Cys igual que l'MtnE, no es pot atribuir al contingut en aminoàcids coordinants, confirmant una vegada més que el número de residus amb capacitat per enllaçar ions metàl·lics (bàsicament Cys i His) no és l'únic factor determinant en la coordinació metàl·lica, però si ho pot ser la disposició d'aquests aminoàcids en la seqüència primària de la proteïna. En la cerca de les

diferències seqüencials entre MtnA i MtnE per tal d'esbrinar les possibles raons que expliquin el diferent comportament d'aquestes dues isoformes, amb el mateix nombre de Cys, en coordinar Zn(II) *in vivo*, s'ha observat que 8 de les 10 Cys d'MtnA es troben situades en 4 motius del tipus Cys-X-Cys, mentre que aquest fenomen només succeeix 1 vegada en el cas de l'MtnE i, a més, dos d'aquest motius s'han perdut en la seqüència de la cinquena isoforma pel desplaçament de Cys/Gly (posició 22) i de Cys/Ala (posició 31) (**Fig. 12, Introducció**). Podrien ser aquestes diferències estructurals les relacionades amb la singularitat exhibida per aquest pèptid en enllaçar Zn(II) en medis fisiològics. Cal esmentar, però, que en acidificar i reneutralitzar la preparació Zn-MtnE (que conté principalment Zn₃-MtnE) es recupera Zn₄-MtnE com a espècie majoritària, la qual cosa indica l'existència del que s'ha anomenat "4t lloc d'enllaç a metall divalent" en MtnE, acostant així el seu comportament al d'MtnA.

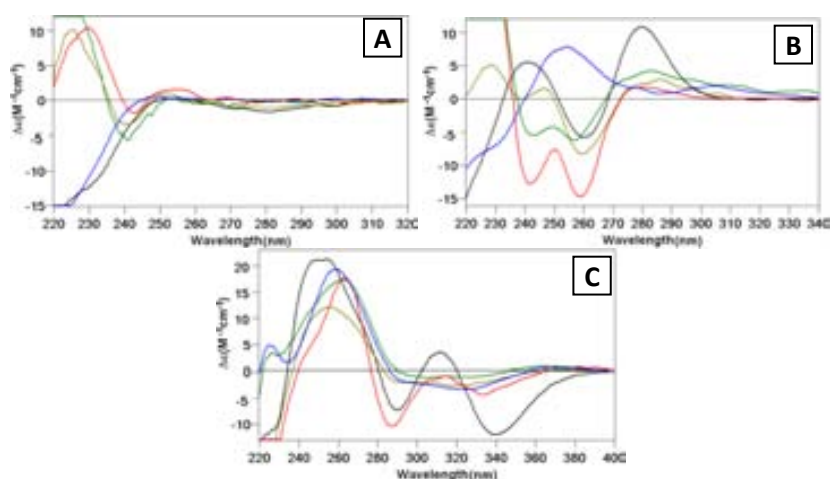


Fig. 63. Espectres de DC de les preparacions de les cinc isoformes d'MT de *D. melanogaster* obtingudes en cultius suplementats amb (A) Zn(II), (B) Cd(II), and (C) Cu(II). Els colors en A, B i C corresponen a: MtnA (negre), MtnB (vermell), MtnC (verd), MtnD (kaki), and MtnE (blau).

L'estudi de la coordinació de la proteïna MtnE vers Cd(II) aporta informació rellevant pel que fa a aquest fenomen denominat "el 4t lloc d'enllaç a metall divalent". En les bioproduccions en medis rics en Cd(II) del polipèptid MtnE s'obté com a espècie majoritària la Cd₄-MtnE presentant un espectre de DC (**Fig. 63B**).

En comparar el comportament de les 5 isoformes de *Drosophila* vers Cd(II), cal destacar que si bé la majoria donen lloc a la formació *in vivo* de l'espècie Cd₄-Mtn (**Taula 21**), MtnE és l'única isoforma on no es detecta la formació de cap espècie que excedeixi l'estequiometria del complex Cd₄-MtnE, que si es va observar en les bioproduccions d'altres isoformes MtnB-like (**Taula 21**).^[150] L'espectre de DC enregistrat en la preparació Cd-MtnE també és clarament diferent de la resta (**Fig. 63B**), indicant així un plegament de la proteïna al voltant del Cd(II) particular. En medis fisiològics també s'observa la formació del complex Cd₃S₂-MtnE amb una abundància significativament important en la mescla, amb una estequiometria equivalent a l'espècie Zn₃-MtnE *in vivo* amb la incorporació de 2 ions de sulfur extrems. La coordinació a 4 ions

divalents (Cd(II)) sembla exhibir un comportament particular per MtnE, en base a algunes observacions experimentals: **i)** que és mantingui la subpoblació de Cd₁-MtnE després de l'acidificació de la mostra de Cd-MtnE recombinant a pH 2.4 (**Annex 7.1.5, Làmina 7.1.5.1**); **ii)** l'existència de l'espècie Cd₃Zn-MtnE en solució al final de la valoració d'intercanvi Zn(II)/Cd(II); i el fet que **iii)** s'obtingui un complex Cd-MtnE d'elevat grau d'estructuració després d'afegir de 3 a 4 eq de Cd(II) a les preparacions recombinants de Zn(II)-MtnE. Si es tenen en compte també els resultats *in vitro* (acidificacions de les preparacions Cd-Mtn i valoracions amb Cd(II) de les Zn-Mtn), és destacable el fet que s'hagi observat la resistència de la isoforma MtnE a desplaçar tot el Zn(II) inicialment coordinat o a descoordinar un darrer catió Cd(II) en acidificar la mostra Cd-MtnE, indicant l'existència d'un lloc de coordinació especialment afavorit per coordinar ions divalents, fet que no s'ha observat en les altres isoformes.

En comparar les propietats coordinants de les isoformes d'MT existents en *D.melanogaster* vers Cu(I), el fet més destacable és que totes cinc proteïnes tenen un clar caràcter de Cu-tioneïna. Analitzant les diferents preparacions en medis rics en Cu(II) (**Taula 21**), es pot apreciar com MtnE, si bé forma complexos homometàl·lics de Cu com la resta d'isoformes, amb estequiometries Cu/MT similars a les observades per les isoformes secundàries MtnC i MtnD però clarament inferiors a les d'MtnA i MtnB, és l'única que forma una espècie heterometàl·lica, Cu₄Zn₁-MtnE (confirmant un cop més l'existència d'un lloc especial de coordinació per ions divalents), a més d'observar-se la presència d'una espècie amb menor metal·lació, Cu₄-MtnE. Aquests fets són indicatius d'un menor caràcter de Cu-tioneïna en MtnE respecte les altres isoformes. Un altre fet que confirma aquest menor caràcter de Cu-tioneïna és la notable inestabilitat d'aquests compostos (tant els obtinguts *in vivo* com *in vitro*) en un excés de Cu(I), que resulta de la desestructuració de la proteïna per donar lloc a l'apo-forma. La gran similitud entre els complexos Cu-MtnE *in vivo* i els corresponents de les isoformes MtnC i MtnD també es veu reflectida en la seva empremta de DC (**Fig. 63C**), completament anàloga a la de les preparacions Cu-MtnC i Cu-MtnD, suggerint una estructuració *in vivo* entorn el Cu(I) molt similar per tots ells.

Per tal de trobar explicació al comportament diferenciat d'MtnE vers les altres isoformes d'MT, es va comparar la seqüència primària de les diferents isoformes de *Drosophila melanogaster*. Aquesta recerca de les diferències entre les isoformes MtnB-like (MtnC, MtnD i MtnE) i l'MtnB dona lloc a conclusions no obvies, on la presència d'un aminoàcid bastant voluminós a la posició 15 i una càrrega positiva aportada per un residu de Lys en la posició 25 present a la isoforma d'MtnB, i absent en MtnC, MtnD i MtnE sembla ser l'única raó plausible per a l'observació d'un comportament radicalment diferent en la coordinació a Cu(I) en relació a MtnB.

3.3.2. Consideracions globals

Tenint en compte, per una banda, que en un estudi previ de les 4 primeres isoformes d'MT aïllades de la mosca *D.melanogaster* (MtnA, MtnB, MtnC i MtnD), realitzat pel grup de recerca en el que s'emmarca aquesta Tesi Doctoral, es van definir les isoformes MtnB-like com les menys Cu-preferents.^[113] I per altra banda, que els resultats obtinguts en la caracterització de les habilitats coordinants de la darrera isoforma d'MT descoberta, MtnE, indiquen que aquesta isoforma presenta un comportament d'enllaç enfront els diferents ions metàl·lics (Zn(II), Cd(II) i Cu(I)) similar a les altres MtnB-like però molt distant a MtnA. Es pot considerar que MtnE és la proteïna amb menys caràcter de Cu-tioneïna dins el polimorfisme d'MT de *Drosophila*. A més a més, no només es pot observar un comportament d'MtnE clarament diferenciat del d'MtnA (la isoforma amb el caràcter Cu-tioneïna més pronunciat) sinó també diferent del de les seves isoformes més properes, les MtnB-like. En general, mostra una disminució de la capacitat de coordinació vers els ions metàl·lics estudiats, en part atribuïble a un menor contingut en Cys, i també l'existència en MtnE d'un lloc particular per a la coordinació d'un ió metàl·lic divalent, el qual probablement es troba tant interioritzat en l'estructura de la proteïna que dificulta el seu desplaçament metàl·lic. En vista d'aquests resultats, MtnE es pot considerar com l'MT de *Drosophila* amb una capacitat d'enllaç als ions metàl·lics en la frontera (o sigui, la menys específica vers Cu(I) o Zn(II)), fet que es correlaciona molt bé amb algunes observacions fetes en l'estudi a nivell genètic.

3.4. Estudi termodinàmic del desplaçament $\text{Zn}^{II}/\text{Cd}^{II}$ en varies Zn-MTs mitjançant la tècnica d'ITC

3.4. Estudi termodinàmic del desplaçament Zn^{II}/Cd^{II} en varies Zn-MTs mitjançant la tècnica d'ITC

Tal com s'ha descrit anteriorment, la nova proposta de classificació presentada pel nostre grup de recerca (**apartat 1.1.5.**) té en consideració aspectes funcionals de les metal·lotioneïnes,^[72] basant-se en l'especificitat d'enllaç metàl·lic que exhibeixen tant *in vivo* com *in vitro*, diferenciant-les en Zn-tioneïnes o Cu-tioneïnes. L'experiència del grup en l'estudi de la coordinació metàl·lica de les MTs enfront $Zn(II)$, $Cd(II)$ i $Cu(I)$ ha estat adquirida mitjançant tècniques espectroscòpiques (DC i UV-Vis), espectrometria de masses (ESI-MS) i tècniques de quantificació (ICP-AES). Altres grups han estudiat aquestes mateixes propietats mitjançant altres tècniques com MCD, NMR i Raigs X. No obstant, cal remarcar que cap de les tècniques esmentades ha estat útil a l'hora de proporcionar dades definitives sobre l'afinitat de les MTs per aquests ions metàl·lics. Això és degut, principalment per la seva escassetat, sobretot si es comparen amb la gran quantitat de dades espectroscòpiques disponibles, i per la gran disparitat entre els valors descrits a la bibliografia.

La recerca de noves tècniques útils per a la determinació dels paràmetres termodinàmics que defineixen una reacció química concreta d'un sistema biològic succeïx un gran interès en la comunitat científica, i no ho ha estat en menor mesura en referència a la interacció metall/proteïna. La possibilitat de determinar aquestes afinitats metàl·liques resulta molt atractiva i té un gran valor afegit ja que permetria una avaluació i comparació fiable de les afinitats d'enllaç metàl·lic, claus en una comprensió quantitativa de la selectivitat i especificitat metàl·lica de multitud de proteïnes i metal·loproteïnes. Resulta particularment interessant en el cas de les metal·lotioneïnes degut a la relació existent entre l'enllaç metàl·lic, l'estructura i conseqüentment la seva funció biològica. Tot i que a la literatura es possible trobar una gran varietat de valors^[166] la gran disparitat entre ells indica que l'estimació d'aquestes afinitats metàl·liques és encara un problema vigent. En el camp de les MTs molts autors descriuen els seus intents per determinar les constants d'afinitat de l'enllaç a $Zn(II)$, $Cd(II)$ o inclús $Hg(II)$ de diferents MTs.^[167, 168, 169, 170] No obstant, en la majoria dels casos, aquests treballs s'han fet mitjançant estudis espectroscòpics o electroquímics i tan sols permeten obtenir valors aparents de les constants d'estabilitat. Un problema addicional d'aquests procediments és la gran heterogeneïtat de resultats obtinguts, els quals varien entre valors de 10^8 a 10^{13} per a l'enllaç a $Zn(II)$, i de 10^7 a 10^{21} per a l'enllaç a $Cd(II)$. D'aquesta manera es pot afirmar que fins aleshores no es disposa de cap eina universal i útil que permeti trobar de forma directa els paràmetres i les constants termodinàmiques associades al procés de coordinació dels diferents ions metàl·lics a les metal·lotioneïnes. Afortunadament, les millores en la sensibilitat de les tècniques calorimètriques actuals permeten que aquestes siguin una alternativa vàlida per solucionar la

problemàtica d'obtenir informació termodinàmica acurada i, per a resoldre i aportar claredat a la gran disparitat de valors presents en la literatura.

La tècnica anomenada *Isothermal titration calorimetry* (ITC) permet estudiar reaccions des d'un punt de vista termodinàmic, obtenint-se els valors dels paràmetres termodinàmics d'una gran varietat de reaccions de manera senzilla i directa, incloent-hi la interacció molècula-ligand o el procés de bescanvi metàl·lic en una biomolècula determinada. Prèviament, l'ITC s'ha emprat en algun cas per estudiar l'enllaç d'ions metàl·lics a diverses metal·loproteïnes,^[171] però per a les MTs les dades disponibles són encara molt escasses. Tan sols es troben a la literatura dos articles dedicats a l'estudi de l'enllaç de $Pb(II)$ ^[172] i $Cd(II)$ ^[173] a MTs, ambdós a pH àcid, i també una sèrie de treballs on s'estudia l'enllaç de $Zn(II)$ i $Cd(II)$ a fitoquelatines.^[174, 175] En aquests dos darrers treballs^[174, 175] s'ha trobat que els valors mesurats mitjançant l'ITC són, com era d'esperar, sensibles al pH i a les propietats coordinants que pugui presentar el tampó. D'aquesta manera, es pot afirmar que en cap dels treballs esmentats es van determinar les constants d'afinitat metàl·lica d'una MT a pH neutre, proper al pH fisiològic.

Per altra banda, estudiar la reacció de competència entre el $Zn(II)$ i el $Cd(II)$ és interessant per entendre molts dels processos bioquímics i mediambientals on les MTs juguen un paper rellevant o es veuen involucrades. Una de les hipòtesis més acceptades per explicar el paper destoxicador de les MTs es basa en que aquestes es troben dins l'organisme en forma de Zn-MT, on $Zn(II)$ seria desplaçat pels ions tòxics $Cd(II)$, $Hg(II)$, $Pb(II)$, $Ag(I)$, etc., de major afinitat per la proteïna, en una eventual intoxicació. Sembla així sobradament justificada la necessitat d'estudiar aquest procés d'intercanvi metàl·lic en les MTs.

Així, el principal objectiu d'aquesta part del treball és la determinació acurada i precisa mitjançant ITC dels paràmetres termodinàmics associats al desplaçament metàl·lic Zn^{II}/Cd^{II} en varies Zn-MTs amb la finalitat d'establir una relació entre les seves constants d'afinitat metall-MT i el seu caràcter de Zn- o Cu-tioneïna. El conjunt de metal·lotioneïnes escollides per aquest treball han estat prèviament caracteritzades seguint la metodologia habitual en el grup (**Apartat 1.3. Disseny experimental**) i conseqüentment classificades en base a la seva especificitat metàl·lica. Així s'inclouen tant isoformes amb especificitat metàl·lica molt ben definida per $Zn(II)$, $Cd(II)$ o $Cu(I)$, com d'altres sense una clara preferència per cap dels ions metàl·lics esmentats. També cal fer palès que les MTs aquí utilitzades tenen estructures primàries característiques, presentant longituds diferents (des de 55 aa fins a 70 aa), diferent composició d'aminoàcids a les cadenes i un contingut en residus de Cys molt variable (de 12 a 20 Cys).

Tenint en compte tot l'esmentat, les proteïnes seleccionades (**Taula 22**) han estat les dues isoformes d'MT dels cargols terrestres *H.pomatia* (HpCdMT i HpCuMT) i *C.aspersum* (CaCdCuMT, CaCdMT i CaCuMT), que presenten unes seqüències molt similars, tot i tenir especificitats metàl·liques pròpies; les MTs de mamífer MT1, MT2 i MT3, que també són molt

similars entre si, essent MT1 i MT2^[176] definides com a Zn-tioneïnes mentre que MT3^[177] presenta característiques de Cu-tioneïna; i la isoforma Cup1 de *S. cerevisiae*, una Cu-tioneïna genuïna, amb un nº d'aminoàcids i de residus de Cys menor que totes les anteriors.

3.4.1. Característiques químiques de les proteïnes estudiades

Les principals característiques de les preparacions de Zn-MT emprades per a la caracterització termodinàmica es presenten a la **Taula 22**.

	Nº aa	Nº Cys	Espècies Zn-MT inicials (per ordre d'abundància)
HpCdMT	67	18	Zn ₆ ⁻
HpCuMT	65	18	Zn ₆ ⁻ ~ Zn ₅ ⁻ > Zn ₄ ⁻ > Zn ₃ ⁻
CaCdMT	67	18	Zn ₆ ⁻
CaCdCuMT	64	17	Zn ₆ ⁻ > Zn ₅ ⁻ > Zn ₄ ⁻
CaCuMT	67	17	Zn ₆ ⁻ > Zn ₅ ⁻
Cup1	55	12	Zn ₄ ⁻ > Zn ₅ ⁻ > Zn ₃ ⁻ > Zn ₂ ⁻
MT1	63	20	Zn ₇ ⁻
MT2	63	20	Zn ₇ ⁻
MT3	70	20	Zn ₇ ⁻ > Zn ₆ ⁻ > Zn ₅ ⁻

Taula 22. Principals característiques de les proteïnes utilitzades i de les corresponents preparacions recombinants obtingudes de medis rics en Zn (Zn-MT).

Les dades recollides a la **Taula 22** permeten distingir bàsicament dos grups d'MTs en base al seu comportament en presència de Zn(II): aquelles que donen lloc a una única espècie Zn-MT *in vivo* (HpCdMT, CaCdMT, MT1 i MT2), la majoria de les quals han estat classificades com a Zn-tioneïnes; i les que donen lloc a una mescla de complexos Zn-MT de diferent contingut metàl·lic, algunes d'elles definides com a Cu-tioneïnes (HpCuMT, CaCuMT i Cup1) i d'altres amb un caràcter intermedi entre Zn/Cu-tioneïna (CaCdCuMT i MT3). Tenint en compte, l'estequiometria de les espècies formades, la longitud de la cadena i el nombre de Cys, es pot afirmar que, com calia esperar, el número de residus de cisteïnes afecta exclusivament al contingut metàl·lic (estequiometria) dels complexos formats, mentre que a priori no sembla que hi hagi una relació directa amb la longitud de la cadena. Caldrà veure de quina manera el número de residus d'aminoàcids coordinants (Cys) i l'especiació inicial (si es parteix d'una mescla de complexos o d'una única espècie Zn-MT inicial) afectarà o determinarà els paràmetres termodinàmics de la reacció.

3.4.2. Dades calorimètriques associades al desplaçament metàl·lic $\text{Zn}^{\text{II}}/\text{Cd}^{\text{II}}$ en varies Zn-MTs

La reacció que s'ha estudiat és la següent:



Els termogrames obtinguts en valorar cadascuna de les preparacions Zn-MT escollides amb una solució de $\text{Cd}(\text{II})$ es presenten a la **Fig. 64**.

Un programari específic pel tractament d'aquests termogrames permet a través d'uns càlculs matemàtics ajustar les dades experimentals obtingudes a corbes teòriques i així obtenir els valors dels paràmetres termodinàmics associats a la reacció (**Taula 23**). Per a les corbes obtingudes en aquest estudi, s'han aplicat dos models entre els diferents tipus d'ajustos disponibles, el de "*one set of sites*" (considera que tots els centres d'unió són equivalents) o el de "*two set of sites*" (implica l'existència de dos tipus de centres d'unió diferents per a l'ió metàl·lic). Tot i que hi ha termogrames on la forma de doble derivada indicaria sense cap dubte la presència de 2 tipus de centres d'unió, és a dir, la necessitat d'aplicar el model de "*two set of sites*", alhora de fer l'ajust matemàtic s'ha vist que els paràmetres termodinàmics obtinguts presenten un error associat al càlcul no acceptable, i molt més gran que el que s'obté amb l'ajust al model de "*one set of sites*" del mateix termograma. Tot plegat, indica que, encara que hi ha processos on existeixen diferents centres d'unió, en tots els casos estudiats els centres d'unió del primer tipus presenten un valor de N molt petit i una K d'unió lleugerament més elevada que els dels segon tipus. En els experiments duts a terme, aquest primer procés no proporciona ni suficient número de punts ni amb la intensitat suficient com per a poder obtenir els paràmetres termodinàmics associats amb un error petit. Es demostra així que obviant aquest procés observat a n° eq afegits molt petit (que podria ser a causa de que alguns casos partim d'una situació inicial de mescla d'espècies) utilitzant un mètode de càlcul on es consideren tots els centres d'unió iguals s'obtenen resultats amb un error associat menor. En qualsevol cas, aquest tractament aporta informació igualment acceptable per a l'estudi ja que la consideració d'un o altra model no afecta significativament als paràmetres termodinàmics més importants. D'alguna manera en l'ajust de tipus "*one set of sites*" s'inclou també aquest primer procés, tant en el valor de la K com en el de la N , que seria un sumatori de tots dos processos.

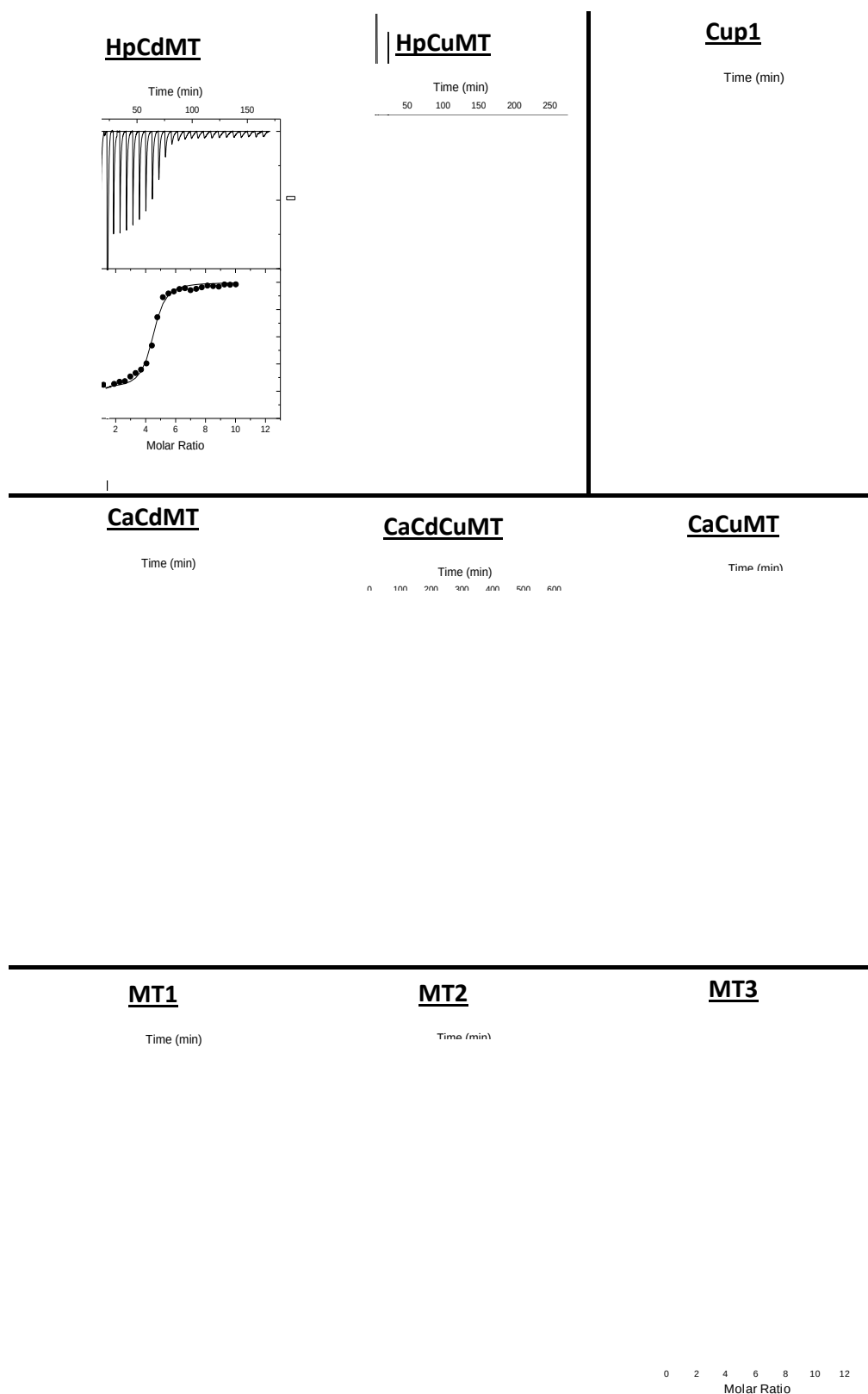


Fig. 64. Termogrames enregistrats en l'addició d'una solució de CdCl_2 a les corresponents Zn-MTs de concentració 10-15 μM . L'experiència es va dur a terme a T constant de 25 $^\circ\text{C}$ i en solucions tamponades amb 50 mM Tris-HCl a pH 7.0

	N	K _{af}	log K _{af}	ΔG_{calc}^* (cal·mol ⁻¹)	ΔH (cal·mol ⁻¹)	ΔS (cal·mol ⁻¹ ·K ⁻¹)
HpCdMT	4.37 ± 0.04	2.05x10 ⁶ ± 0.4x10 ⁶	6.31	-8622	-7791 ± 130	2.79
HpCuMT	6.0 ± 0.1	2.8x10 ⁵ ± 0.4x10 ⁵	5.30	-7425	-7355 ± 231	0.238
CaCdMT	5.5 ± 0.1	2.3x10 ⁶ ± 0.6x10 ⁶	6.36	-8667	-8274 ± 182	1.32
CaCdCuMT	7.2 ± 0.1	4.6x10 ⁵ ± 0.7x10 ⁵	5.66	-7730	-7792 ± 173	-0.209
CaCuMT	4.5 ± 0.1	1.5x10 ⁵ ± 0.1x10 ⁵	5.18	-7060	-8142 ± 166	-3.63
Cup1	2.32 ± 0.06	2.9x10 ⁵ ± 0.4x10 ⁵	5.46	-7756	-6883±250	1.91
MT1	6.57 ± 0.04	1.2x10 ⁶ ± 0.1x10 ⁶	6.08	-8298	-6176±49.46	7.12
MT2	5.20 ± 0.03	6.64x10 ⁵ ± 0.5x10 ⁵	5.82	-7940.22	-5887±56.39	6.89
MT3	6.91± 0.09	3.23x10 ⁵ ± 0.26x10 ⁵	5.51	-7518	-6189±53.93	4.46

Taula 23. Paràmetres termodinàmics calculats a partir dels termogrames de la **Fig. 64**, corresponents a l'addició de CdCl₂ a les corresponents solucions de Zn-MT de concentració 10-15 µM a pH 7.0 i 25 °C. Els valors de ΔG_{calc}^* han estat calculats a partir dels valors de ΔH i ΔS mesurats a 298 °K.

En un primer anàlisi de les dades obtingudes es pot apreciar que l'intercanvi metàl·lic de Zn(II) pel Cd(II) en totes les Zn-MTs considerades té lloc de forma exotèrmica i espontània, en total concordança amb el fet de que aquesta reacció de desplaçament sempre ha estat considerada termodinàmicament afavorida.

Un altre tret característic és la concordança entre els valor de K_{af} obtinguts i els valors de ΔG calculats (ΔG_{calc}^*) a partir de les dades obtingudes, tal i com era d'esperar si es té en compte la relació existent entre l'entropia i les constants associades a les reaccions. L'anàlisi dels valors de ΔG calculats indica que aquests valors a 25 °C són molt similars entre ells en tots els experiments, entre 7 i 9 kcal·mol⁻¹. Inclús aquells processos que presenten diferents entalpies o entropies tenen un valor de ΔG en concordança amb la resta indicant que en tots els casos hi ha el mateix grau d'espontaneïtat, sense que cap dels valors sigui especialment major o menor que la resta.

La comparació de les dades obtingudes permet observar com la majoria dels valors de ΔH es troben al voltant de 6-8 kcal·mol⁻¹, mentre que la majoria dels valors de ΔS presenten valors de -4 a 7 cal·mol⁻¹·K⁻¹. Això significa que l'aportació del factor entropic és molt menor que l'entalpic, probablement a causa d'un plegament similar de la proteïna quan uneix a ambdós ions metàl·lics, o en qualsevol cas implicaria una variació en el plegament global de la proteïna relativament baixa.

En referència a les constants d'afinitat associades al procés, es poden separar en dos grups principals, aquelles que tenen un log K_{af} per sobre de 6.0 i les que presenten uns valors de constant ordre de magnitud inferior, amb valors de log K_{af} per sota de 6.0.

Finalment, el paràmetre N, definit com el punt de saturació de la proteïna si bé en aquesta reacció pot ser indicatiu de l'estequiometria de la reacció, pren diferents valors segons la proteïna en qüestió. Tot i que caldria esperar, a priori, que fos un valor estretament lligat al

nombre de Cys presents a la cadena aminoacídica, existeixen casos especials en els que isoformes amb el mateix número de cisteïnes prenen un valor de N molt diferent, especialment en el cas de les proteïnes dels cargols *H.pomatia* i *C.aspersum*. En analitzar en profunditat els termogrames es pot apreciar que el valor N pot estar altament influenciat per l'ajust realitzat, potser més que d'altres factors. En algun cas on l'ajust és baix aquest paràmetre apareix a valors lleugerament més elevats o més petits del que s'esperaria.

3.4.3. Anàlisi de les dades termodinàmiques i comparació amb d'altres estudis sobre la reacció de desplaçament Zn^{II}/Cd^{II} en les espècies Zn-MT *in vivo*

Una vegada presentats, a grans trets, els paràmetres termodinàmics obtinguts per a la reacció de bescanvi metàl·lic Zn^{II}/Cd^{II} de les diferents proteïnes, és important comparar aquests resultats amb les dades obtingudes prèviament pel mateix procés mitjançant altres tècniques, com DC, UV-Vis i ESI-MS, especialment pel que fa referència a la seva classificació com a Zn- o Cu-tioneïnes.

Aquelles isoformes que han estat classificades prèviament com a Zn-tioneïnes (MT1, HpCdMT i CaCdMT) mostren uns valors de constants d'afinitat de l'ordre de 10^6 , els més elevats, i uns valors de ΔG inferior a les $-8000 \text{ cal}\cdot\text{mol}^{-1}$. No obstant, el comportament d'aquestes tres isoformes enfront Cd(II), tant *in vivo* com *in vitro*, no és exactament idèntic. En tots els casos, el desplaçament Zn^{II}/Cd^{II} té lloc de manera seqüencial fins al punt de saturació de la proteïna (6 Cd(II) per HpCdMT i CaCdMT, 7 Cd(II) per MT1). Però mentre que en les bioproduccions en medis rics en Cd(II) de les isoformes HpCdMT i CaCdMT es forma una única espècie, MT1 en les mateixes condicions dóna lloc a una mescla de diverses espècies, on en excés de Cd(II) l'espècie majoritària esdevé la Cd₇-MT1, indicant així un major caràcter de Cd-tioneïna de les proteïnes de cargol. De la mateixa manera, per les isoformes HpCdMT i CaCdMT, s'obté l'espècie única Cd₆-MT *in vitro*, per 6 eq de Cd(II) afegits a Zn₆-MT, estable al temps i en excés de Cd(II). És el cas perfecte d'unes isoformes que presenten una elevada afinitat per Cd(II), que clarament queda reflexada pels seus paràmetres termodinàmics, sobretot en la K_{af} .

Per altra banda, aquelles isoformes que exhibeixen un major caràcter de Cu-tioneïnes (CaCuMT, HpCuMT i Cup1^[89]), encara que en diferents graus, donen lloc a valors de la constant d'afinitat de l'ordre de 5, i en correspondència un valor de ΔG més gran que per les Zn-tioneïnes, al voltant de $-7000 \text{ cal}\cdot\text{mol}^{-1}$. El comportament de totes tres proteïnes enfront Zn(II) i Cd(II), tant *in vivo* com *in vitro*, és força similar: totes elles donen lloc a una mescla de diferents espècies en les seves bioproduccions amb Zn(II) (**Taula 22**), i per tant, totes les valoracions realitzades, tant les seguides per ITC com per altres tècniques (DC, UV-Vis i ESI-MS), parteixen d'una situació inicial amb diversitat de complexos Zn-MT, la qual cosa probablement afecta la reacció que

s'està estudiant. De fet, les valoracions amb Cd(II) d'aquestes proteïnes donen lloc, en tots els casos, a una mescla d'espècies, indicatiu d'una baixa preferència per aquest ió. L'obtenció de multitud d'espècies en tots els passos de la valoració, tant inicial, intermedi i final, pot provocar l'obtenció d'uns valors dels paràmetres termodinàmics més baixos per aquestes isoformes amb un caràcter extrem de Cu-tioneïna en comparació amb les que presentaven aquelles classificades com Zn-tioneïnes.

Pel que fa a la isoforma CaCdCuMT, definida en estudis previs com una proteïna d'especificitat intermèdia amb un lleuger caràcter de Cu-tioneïna, presenta valors situats les Zn- i les Cu-tioneïnes, tant pel que fa a K_{af} com per ΔG . Específicament, les dades obtingudes són valors situats entre els obtinguts per les altres dues isoformes del cargol *Cornu aspersum* d'especificitat extrema, caracteritzades com a Zn i Cu-tioneïna respectivament. Així, els paràmetres termodinàmics obtinguts permeten confirmar el caràcter intermedi de CaCdCuMT altrament observat. Aquest caràcter de Cu-tioneïna intermedi concorda perfectament amb l'estudi de l'especificitat metàl·lica realitzat prèviament, on es va observar la formació de diverses espècies M-MT tant en les produccions recombinants en medis de cultiu rics en Zn(II) i Cd(II) , com *in vitro* per desplaçament metàl·lic de Zn(II) per Cd(II) , característic de les Cu-tioneïnes.

Tenint en compte les dades obtingudes i la comparació amb la bibliografia, és més que evident que l'ITC és una eina que pot arribar a ser enormement eficaç per a conèixer, per primera vegada, les afinitats metàl·liques d'aquestes metal·loproteïnes. L'ITC, amb un únic experiment, permet obtenir els paràmetres termodinàmics que es poden correlacionar amb l'afinitat metàl·lica de les diferents isoformes d'MT i, en definitiva, amb el seu caràcter de Zn- o Cu-tioneïnes. És per aquests motius que es poden aplicar els resultats obtinguts per tal de predir el comportament de les proteïnes d'estudi. És el cas de les dues isoformes d'MT, MT2 i MT3. En el cas concret d'MT2, aquesta comparteix les principals característiques termodinàmiques amb les Zn-tioneïnes, amb una K_{af} elevada i un valor de ΔG de $-7.9 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$, molt proper al de la Zn-tioneïna de mamífer MT1. El cas de l'MT3 resulta ser diferent a la resta d'MTs de mamífer estudiades. La mescla inicial està formada per una diferents complexos, essent $\text{Zn}_7\text{-MT3}$ el majoritari. Aquesta presenta uns valors dels paràmetres termodinàmics clarament associables a una MT amb marcat caràcter de Cu-tioneïna, com són una K_a de l'ordre de 5, més baixa que la d'MT2, i amb valor de ΔG clarament inferior també, de $-7.3 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ (**Taula 23**).

Així, el conjunt de dades obtingudes permet classificar aquestes dues MTs de mamífer, essent MT2 de manera clara una Zn-tioneïna, mentre que MT3 té un caràcter més proper a les Cu-tioneïnes, sense mostrar en cap cas un comportament extrem.

	N	Nº Cys	Cys/N	log K _{af}
HpCdMT	4.4	18	4.09	6.31
HpCuMT	6.0	18	3.00	5.30
CaCdMT	5.5	18	3.28	6.36
CaCdCuMT	6.9	17	2.36	5.66
CaCuMT	4.5	17	3.78	5.18
Cup1	2.3	12	5.22	5.46
MT1	6.7	20	2.98	6.08
MT2	5.2	20	3.85	5.82
MT3	5.7	20	3.5	5.51

Taula 24. Valors experimentals de N i log K_{af} mesurats en els diferents experiments de desplaçament metàl·lic Zn^{II}/Cd^{II} en diverses Zn-MTs en comparació amb el valor de nombre de Cys/N.

Si fem una ordenació en funció dels valors de les constants d'afinitat obtingudes, la gradació de més a menys resultant correspon a: CaCdMT > HpCdMT > MT1 > MT2 > CaCdCuMT > MT3 > Cup1 > HpCuMT > CaCuMT. Aquesta gradació no encaixa perfectament amb el caràcter de Zn- i Cu-tioneïna definit per les MTs estudiades però en canvi, si que ho fa amb un possible caràcter de Cd-tioneïna. En primer lloc es troben aquelles isoformes que presenten una major especificitat pel Cd(II), observada de forma molt evident tant en estat natiu com *in vivo* i *in vitro*, i que conseqüentment han estat anomenades CdMTs, la HpCdMT i la CaCdMT. És possible observar aquesta major afinitat pel Cd(II) en els termogrames obtinguts, amb un primer procés molt marcat, indicant que els primers equivalents de Cd(II) s'uneixen amb molta afinitat. Aquest fet ha estat altrament observat en les valoracions amb Cd(II) mitjançant ESI-MS i DC. A continuació, en aquesta gradació, es situen les Zn-tioneïnes, però mostrant lleugeres diferències en el seu comportament. Recentment, un estudi comparatiu de l'especificitat metàl·lica d'MT1 i MT2 mostra com tot i que les dues isoformes presenten un elevat caràcter de Zn-tioneïna, l'MT2 presentaria una especificitat pel Zn(II) major. S'ha postulat que l'MT1 podria formar part del mecanisme de destoxicació del Cd(II), mostrant per tant una K més gran que MT2, a diferència de la segona isoforma que estaria més involucrada en l'homeòstasi del Zn(II), més reticent a bescanviar alguns dels ions Zn(II) inicialment enllaçats, per tant, correspondència amb una K_{af} d'MT2 lleugerament inferior. A la cua de la gradació es troben les isoformes amb un caràcter intermedi com CaCdCuMT i MT3, amb un major caràcter de Cu-tioneïna. Finalment, trobem inequívocament aquelles MTs que són clarament Cu-tioneïnes, com la Cup1, HpCuMT i CaCuMT. Un fet interessant, és veure com la Cup1, la Cu-tioneïna genuïna, presenta una K_{af} lleugerament superior a les altres dues. Això no es pot relacionar de forma directa amb un menor grau de Cu-tioneïna, sinó possiblement a un tret diferencial amb les altres dues, donat que aquesta és més curta, i presenta un número de Cys inferior i possiblement un plegament de la proteïna diferent als anteriors. Aquest fet indica que la comparació directa de K de diferents isoformes s'hauria de fer entre aquelles que presenten característiques estructurals similars, i per comparació en general s'hauria de fer algun tipus de normalització de les dades.

3.4.4. Consideracions globals

El conjunt de dades obtingudes en l'estudi del bescanvi metàl·lic $\text{Zn}^{\text{II}}/\text{Cd}^{\text{II}}$ en diverses produccions de Zn-MTs mitjançant la tècnica d'ITC permet concloure que ha estat útil per calcular els valors termodinàmics associats a la reacció considerada de forma directa, amb una error baix i amb una quantitat de mostra relativament petita, validant així la idoneïtat de la metodologia per a l'estudi de les MTs.

Per altra banda, ha estat possible determinar la relació entre la K (i la ΔG) i el caràcter de Zn- i Cu-tioneïna, i fins i tot, l'especificitat vers el $\text{Cd}(\text{II})$ de les diferents isoformes d'MT, possibilitant l'aplicació d'aquesta eina en l'obtenció d'informació addicional sobre l'especificitat metàl·lica de noves MTs.

L'estudi realitzat amb les diverses MTs indica que els valors termodinàmics obtinguts estan lligats amb les propietats intrínseques de les proteïnes (longitud i número de Cys), a més de la seva puresa (nombre d'espècies inicials), el seu caràcter d'afinitat metàl·lica i per tant, es fa molt difícil la comparació en valors termodinàmics entre proteïnes que no estiguin estretament relacionades.

3.5. Estudi de l'evolució amb el temps de les preparacions Cd-MT

3.5. Estudi de l'evolució amb el temps de les preparacions Cd-MT

Després d'estudiar una considerable varietat de metal·lotioneïnes de diversos organismes, s'han pogut recollir evidències suficients com per relacionar la presència o absència d'anions sulfur com a lligands addicionals en les preparacions recombinants en medis enriquits amb Cd (Cd-MTs) amb el seu caràcter de Zn- o Cu-tioneïnes. Aquelles proteïnes que es caracteritzen per una baixa preferència pels ions divalents Zn(II) i Cd(II), és a dir, aquelles definides com a Cu-tioneïnes, són les que presenten un major contingut en lligands sulfur en les seves espècies Cd-MT, i fins i tot en alguns casos en les formes Zn-MT.^[11] A més a més, va ser possible observar com en aquelles bioproduccions Cd-MT amb la presència de lligands sulfur extres patien un procés d'evolució al llarg del temps, donant lloc a canvis considerables tant en les seves propietats espectroscòpiques com en l'especiació dels complexos Cd-MT i Cd_xS_y-MT detectats.^[89]

Amb l'objectiu de caracteritzar aquestes variacions i establir una metodologia que permeti relacionar unívocament el fenomen d'evolució amb el temps amb el caràcter de Cu-tioneïna de qualsevol MT, es va decidir dissenyar una sèrie d'experiments on es van analitzar un conjunt de bioproduccions de diverses MTs obtingudes en medis rics en Cd(II) (Cd-MTs) on la presència dels lligands sulfur (en major o menor mesura) ha estat detectada. Així, per aquest estudi, es van triar diverses MTs de diferents organismes (**Fig. 65**), amb una especificitat metàl·lica ben coneguda i definida sota la mateixa estratègia experimental.

HpCuMT	GSGRGK--NCGGACNSNPSCGNDCKGAGCNCDRSSCHCSNDDCKCGSQCTGSGSCCKGSA ^{CGCK}
HpCdMT	GSQKGGKGEKCTSA ^{CRSEPCQCGSKCQCGEGCTCAACKTCNCTSDGCKGKECTGPDSCCKGSS^{CGCK}}
CaCuMT	GSMSGRG--QNCGGACNSNPSCGNDCKGAGCNCDSARHCNDDCKCGSQCTRSGSCCKGNAC ^{CGCK}
CaCdCuMT	GSMSGKG--SACAGSCNSNPSCGDDCKGAGCSAQCYSQCNNDTCKCGSQCTSGSCCKG--SC ^{CGCK}
CaCdMT	GSMSGKGKGEKCTAACRNEPCQCGSKCQCGEGCTCAACKTCNCTSDGCKGKECTGPDSCCKGSS ^{CGCK}
MT2	GSMDPN--CSCASDGS ^{CS} CAGAC ^{CKCKQCKCTSCKKSCSCCPVGCAC^{CSQGC}ICK-----EASDK^{CSCC}}
MT3	GSMDPET ^{CP} PTGGSCT ^{CS} DK ^{CKCKGCKCTNCKKSCSCCPAGCEKCAKD^{VC}CKGEEGAKAEAEK^{CSCC}}
Cup1	GSQNEGHE ^{CQCQCGSCKNNEQCQKSCSCPTGCNSDDCKPCGNKSEETKKS^{CC}SGK}

Fig. 65. Alineació de les diferents seqüències aminoacídiques de les MTs recombinants de: les isoformes dels cargols terrestres *H.pomatia* (HpCdMT, HpCuMT) i *C.aspersum* (CaCdMT, CaCuMT i CaCdCuMT), les isoformes de mamífer MT2 i MT3, i finalment la proteïna Cup1 del llevat *S.cerevisiae*. En fons groc es representen els residus de cisteïna, en verd les histidines i en blau el residu de tirosina.

Entre les MTs escollides es troben les isoformes dels cargols terrestres *H.pomatia* (HpCdMT i HpCuMT) i *C.aspersum* (CaCuMT, CaCdCuMT i CaCdMT), organismes de la mateixa família i amb isoformes amb seqüència d'aa molt similars. Són particularment interessants perquè presenten especificitats metàl·liques completament diferenciades i molt ben definides (analitzades a l'**apartat 3.1.** i **3.2.** del bloc de **Resultats i discussió**). També s'han inclòs MTs d'altres organismes com, una isoforma del llevat *S.cerevisiae* (Cup1)^[89] i dues de mamífer

(MT2^[176] i MT3^[177]), prèviament estudiades i caracteritzades. La presència de Cup1 és especialment important ja que aquesta proteïna és considerada com la Cu-tioneïna genuïna.^[89] En la seva caracterització ja es va descriure, a grans trets, aquest fenomen d'evolució amb el temps i es va relacionar amb la presència de lligands sulfur en la preparació Cd-MT. Pel que fa a les isoformes d'MT de mamífer triades, es pot afirmar que la seva importància en l'estudi rau en el fet indiscutible de que són les proteïnes més estudiades i que desperten més interès entre la comunitat científica. Es conegut que MT2 i MT3 presenten un comportament clarament diferenciat^[176, 177] envers Zn(II), Cd(II) i Cu(I). Els darrers resultats indiquen que la MT2^[176] és clarament una Zn-tioneïna, mentre que MT3^[177] presentaria caràcter de Cu-tioneïna. Addicionalment, el conjunt d'MTs triat permet analitzar altres factors, com són la variabilitat en composició d'aa i la diferent longitud del polipèptid.

3.5.1. Estudi de l'evolució amb el temps mitjançant les tècniques de DC, UV-Vis i ESI-MS

L'evolució amb el temps de les diverses preparacions recombinants de Cd-MT considerades, en solució aquosa Tris-HCl, a un valor de pH al voltant de 7 i a temperatura constant de 25 °C, ha estat monitoritzada mitjançant les tècniques de DC, UV-Vis i ESI-MS, de forma anàloga als altres experiments realitzats en aquesta Tesi (**Apartat 5. Procediment experimental i tècniques utilitzades**). La primera anàlisi dels resultats obtinguts permet fonamentalment diferenciar aquelles preparacions Cd-MT que evolucionen amb el temps (en major o menor grau) d'aquelles que no ho fan, fet condicionat sempre a la presència de lligands sulfur en la preparació i, per tant, amb el seu caràcter de Cu-tioneïna.

Aquelles proteïnes que no van evolucionar al llarg del temps, demostrant una gran estabilitat dels complexos Cd-MT presents en solució, corresponen a HpCdMT i CaCdMT, definides com a Zn-tioneïnes. La seva bioproducció en medis rics en Zn(II) o Cd(II) dóna lloc a espècies úniques d'estequiometria M₆-MT (on M= Zn(II) o Cd(II)) amb característiques espectroscòpiques molt similars respectivament. Els resultats obtinguts en la monitorització al llarg del temps (**Fig. 66**) mostren la invariabilitat tant en del plegament de la proteïna, com ho corroboren espectres de DC (**Fig. 66A i B**), com la dels complexos Cd₆-HpCdMT i Cd₆-CaCdMT inicials que es mantenen inalterats (**Fig. 66C i D**). Aquesta manca d'evolució amb el temps està en total concordança amb l'elevada especificitat metàl·lica que presenten enfront Cd(II).

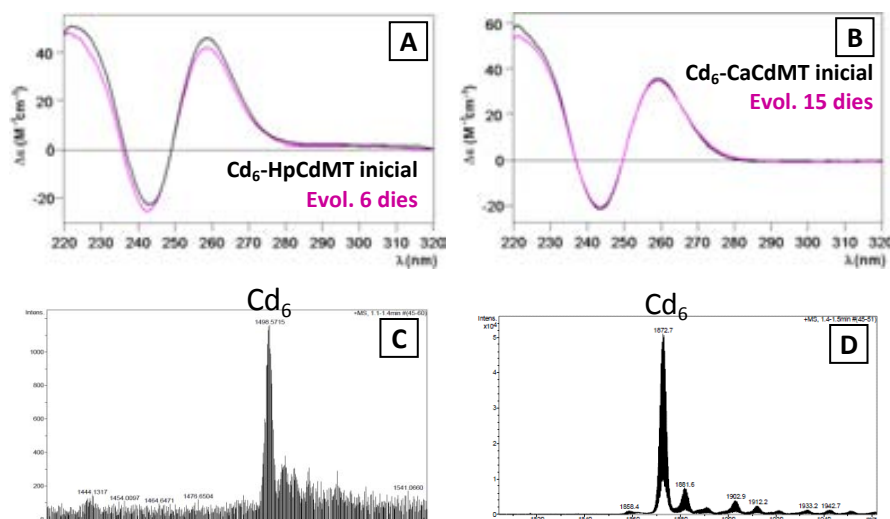


Fig. 66. Espectres de DC corresponents a les espècies $\text{Cd}_6\text{-MT}$ *in vivo* (negre) i $\text{Cd}_6\text{-MT}$ evolucionada (rosa) a T constant de 25 °C de les isoformes (A) HpCdMT i (B) CaCdMT durant 6 i 15 dies, respectivament. Espectres d'ESI-MS corresponents a les espècies (C) $\text{Cd}_6\text{-HpCdMT}$ i (D) $\text{Cd}_6\text{-CaCdMT}$ evolucionades 6 i 15 dies, respectivament.

En un altre grup, entre les proteïnes que sí evolucionen amb el temps, es troben les isoformes d'MT dels cargols terrestres *H.pomatia* i *C.aspersum*, HpCuMT i la CaCuMT, descrites anteriorment com a Cu-tioneïnes, i on es van detectar la presència de lligands sulfur en les seves corresponents preparacions Cd-MT.

L'estudi de l'evolució al llarg del temps (més de 30 dies) d'ambdues preparacions, Cd-HpCuMT i Cd-CaCuMT, mitjançant DC, UV-Vis i ESI-MS (**Fig. 67** i **Fig. 68**) permet observar variacions de les mostres inicials e identificar tendències comuns en el seu comportament. És rellevant remarcar com, tot i les tendències globals de comportament observades, el caràcter de Cu-tioneïna, així com el contingut en sulfurs inicials, marquen diferències més o menys significatives en l'evolució amb el temps de les diferents bioproduccions Cd-MT. En el cas de HpCuMT, a partir de les 3 produccions de Cd-HpCuMT, amb estadis inicials lleugerament diferents (espectre de DC, contingut en sulfurs i espècies metàl·liques inicials), s'arriba a estadis finals molt semblants. En concret, en l'estudi de l'evolució amb el temps de la producció Cd-HpCuMT de tipus 1 (**Fig. 67C**) es mostra com després de 30 dies en solució les espècies inicials i majoritàries $\text{Cd}_6\text{-}$ i $\text{Cd}_7\text{-HpCuMT}$ es transformen en l'espècie majoritària i pràcticament única $\text{Cd}_8\text{S-HpCuMT}$, augmentant el seu contingut en cadmi i sulfur. Per una altra banda, la bioproducció de Cd-CaCuMT, on inicialment les espècies de tipus $\text{Cd}_x\text{S}_y\text{-MT}$ i en concret l'agregat $\text{Cd}_8\text{S-CaCuMT}$ tenen una major importància, tot i observar-se un comportament anàleg a l'anterior a nivell espectroscòpic (creixement de la banda *ca.* 280 nm vs la disminució de la senyal a 250 nm), aquesta resulta al llarg del temps en la degradació de la mostra. De tota manera s'observa com amb 10 dies d'evolució l'espècie $\text{Cd}_8\text{S-CaCuMT}$ guanya intensitat i importància en la mescla, com succeeix en el cas de la isoforma de coure anàloga, HpCuMT. Així, és plausible hipotetitzar que és el contingut en sulfurs i en espècies CdS-MT inicials la que determina l'evolució amb el temps de les diferents mostres, així com l'estabilitat de les formes

obtingudes. Una major importància de les espècies CdS-MT inicials podria estar relacionada amb una menor estabilitat de les mostres, o potser una difícil determinació mitjançant ESI-MS. Possiblement una major quantitat de sulfurs dóna lloc a espectres d'ESI-MS molt sorollosos, inclús complexos Cd_xS_y -MT molt inestables.

En general, com s'observa en l'anàlisi amb el temps de Cd-HpCuMT i Cd-CaCuMT, els espectres de DC de les mostres evolucionades presenten uns senyals més intensos i definits, observant-se un desplaçament de les absorpcions inicials cap a valors de longitud d'ona més elevades, especialment al voltant de 270 nm (positiva o negativa), corresponents a l'enllaç Cd-S²⁻. Aquest fenomen es fa més evident en els espectres d'UV-Vis, on s'observa un increment de l'absorció a valors superiors a 270 nm en detriment de la senyal *ca.* 250 nm, fet que s'interpreta com un augment del nombre d'enllaços de tipus Cd(II)-sulfur i una disminució dels de tipus Cd-MT. La reestructuració dels enllaços es determina també a través dels espectres d'ESI-MS enregistrats. A grans trets, es detecten canvis en l'especiació, observant-se el creixement o l'aparició d'espècies Cd_xS_y -MT en solució en detriment de les espècies Cd-MT majoritàries inicialment, en completa concordança amb la pèrdua de senyal de l'enllaç Cd-S_{Cys} (250 nm) i el creixement del corresponent Cd-S²⁻ (per sobre 270 nm). Cal destacar que les espècies CdS-MT formades tenen un major contingut en Cd(II) (estequiometria Cd/MT més elevada) que les espècies no sulfurades, fet que indica que la incorporació de sulfurs com a lligands addicionals en els complexos Cd-MT proporciona a les proteïnes una major capacitat per enllaçar ions Cd(II), com ja s'ha descrit a la literatura recentment.

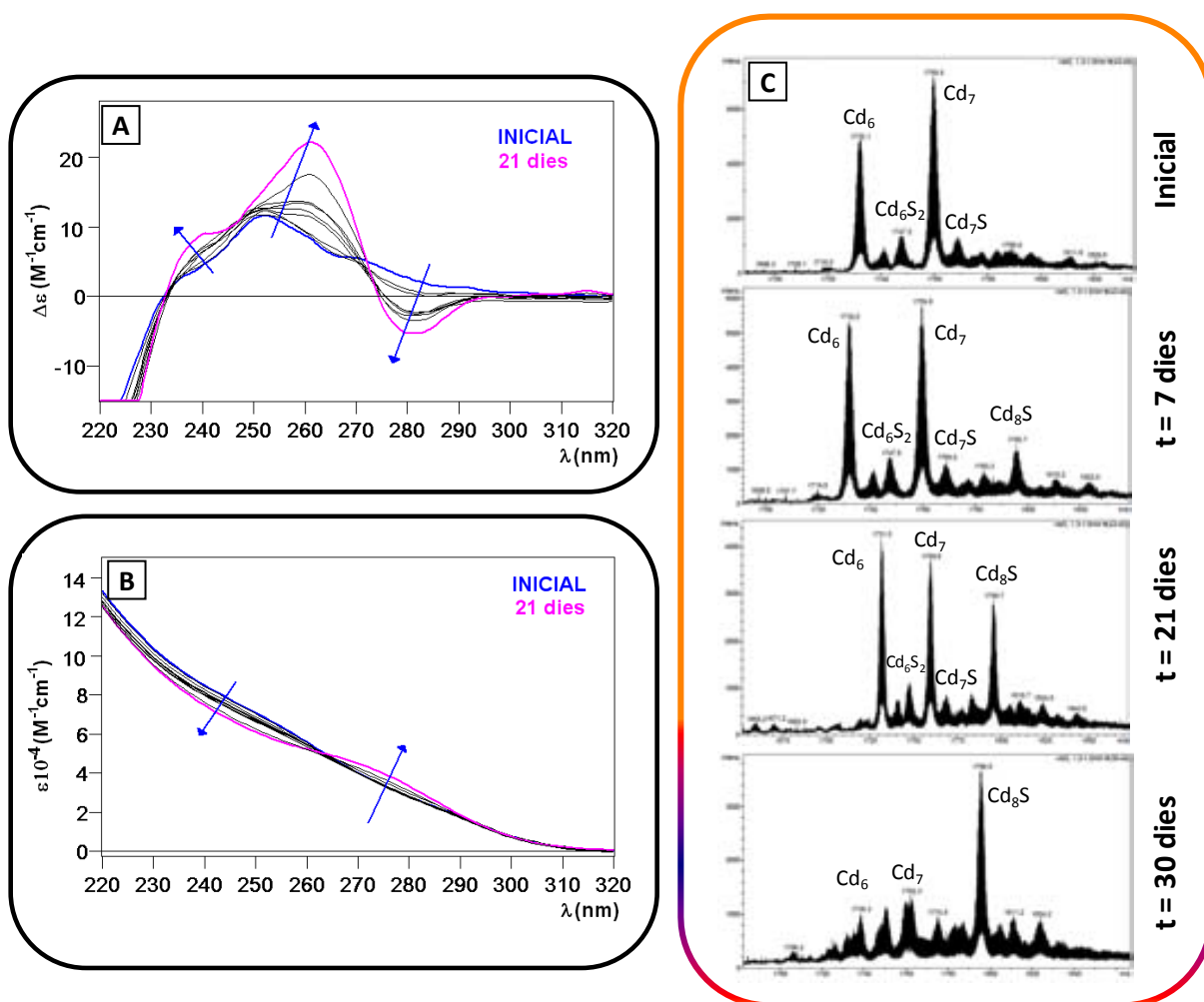


Fig. 67. Espectres de (A) DC, (B) UV-Vis i (C) ESI-MS enregistrats en diferents estadis de l'evolució amb el temps de la preparació Cd-HpCuMT a pH 7 i 25 °C.

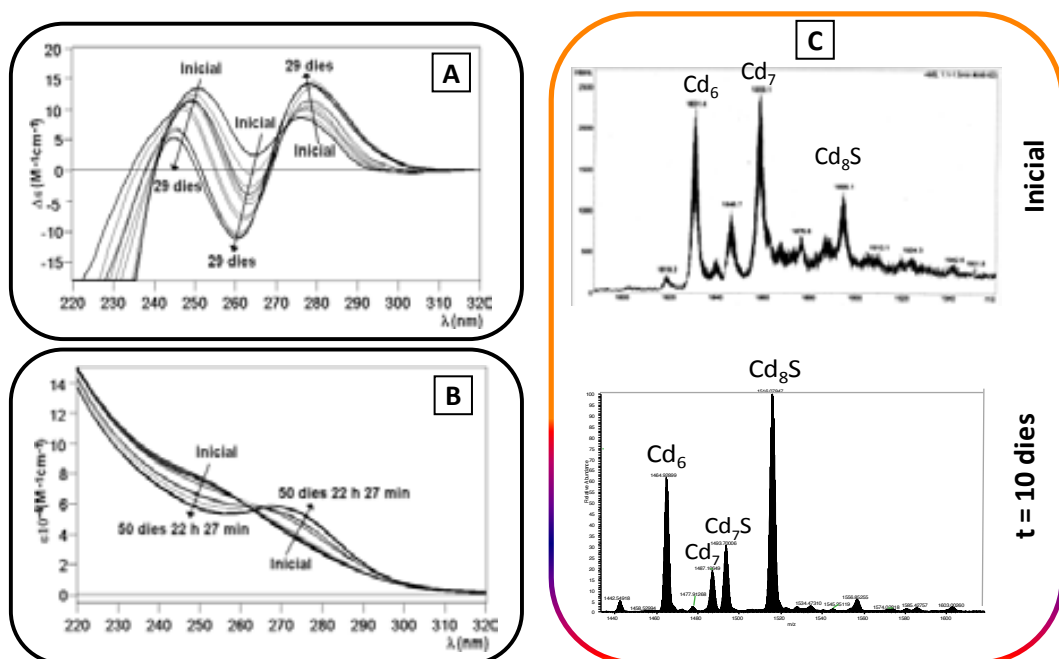


Fig. 68. Espectres de (A) DC, (B) UV-Vis i (C) ESI-MS enregistrats en diferents estadis de l'evolució amb el temps de la preparació Cd-CaCuMT a pH 7 i 25 °C.

Aquest fenomen de desplaçament de les bandes d'absorció a longituds d'ona superiors a 270 nm va ser prèviament observat en polipèptids rics en Cys, les fitoquelatines (**Introducció, apartat 1.1.4.2.**). En l'estudi d'aquests pèptids,^[95] on es va proposar la formació d'unes partícules de sulfur de cadmi unides als pèptids, que es van anomenar “crystallites”, es va concloure que el desplaçament dels màxim de les absorcions cap a longituds d'ona superiors en la zona de 260-280 nm es podien relacionar amb un creixement de la mida de les partícules de CdS. Aquest comportament, observat en plantes superiors, es va associar a un procés de destoxicació del Cd(II) en organismes superiors.

El sistema d'MTs del cargol terrestre *C. aspersum* presenta addicionalment una tercera MT en els seus teixits, la isoforma mixta CaCdCuMT. Aquesta ha estat definida com una proteïna de caràcter Zn/Cu-tioneïna intermedi però amb una major tendència a comportar-se com a Cu-tioneïna. Una evidència d'aquest comportament com a Cu-tioneïna és l'observació del procés d'evolució amb el temps que pateix la preparació Cd-CaCdCuMT. Mitjançant l'anàlisi per DC, UV-Vis i ESI-MS de Cd-CaCdCuMT *in vivo* al llarg del temps (**Fig. 69**) va ser possible determinar un comportament que seguia les tendències globals observades per a les isoformes CaCuMT i HpCuMT, amb les que comparteix una elevada similitud seqüencial.

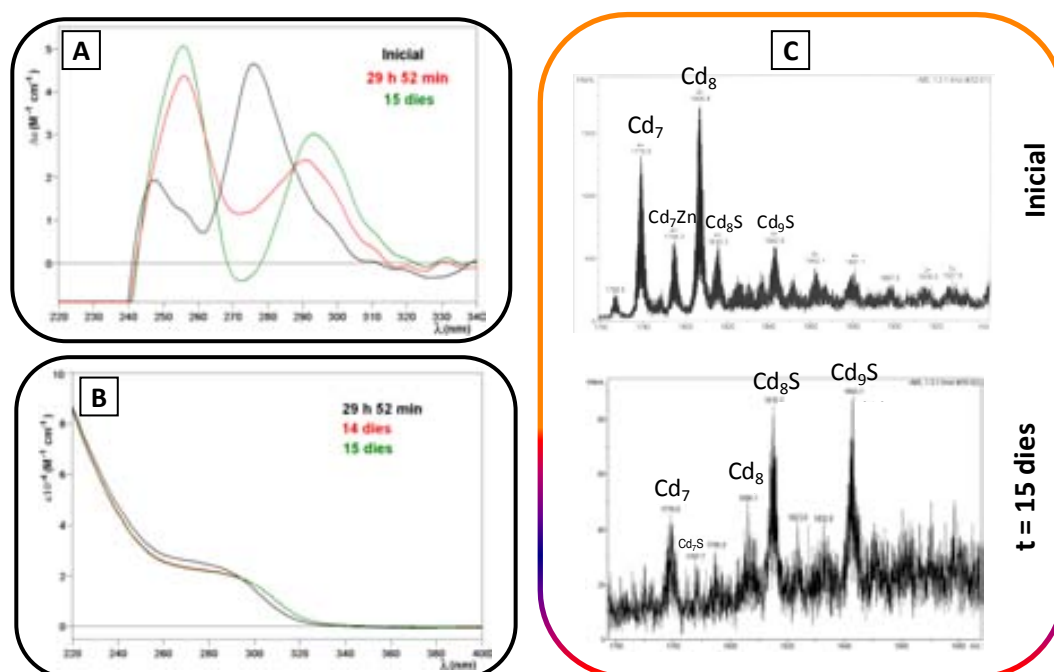


Fig. 69. Espectres de (A) DC, (B) UV-Vis i (C) ESI-MS enregistrats en diferents estadis de l'evolució amb el temps de la preparació Cd-CaCdCuMT a pH 7 i 25 °C.

Les mostres presenten canvis estructurals i d'especiació, donant lloc a la formació de complexos Cd_xS_y-MT de major estructuració (espectres de DC més definits i més senyals) i el creixement de les partícules de tipus Cd_xS_y-MT (creixement de les absorcions per sobre de 280 nm). Finalment, remarcar com els espectres d'ESI-MS enregistrats en estadis avançats d'evolució, mostren la presència de forma majoritària dels complexos Cd₉S- i Cd₈S-MT. Aquests

resultats indiquen la preferència per a formar aquest tipus de complexos en totes les CuMTs de cargols terrestres estudiades i que mostren canvis al llarg del temps (CaCuMT i HpCuMT).

Una vegada estudiat el fenomen d'evolució amb el temps en dos sistemes d'MT estretament relacionats (longitud, número d'aminoàcids i de residus de Cys, alineament de la seqüència) i amb una especificitat tan extrema i clarament diferenciada com són les isoformes d'MT presents als cargols terrestres *H.pomatia* i *C.aspersum*, aquest estudi es va fer extensiu a altres MTs amb diferents particularitats. Aquestes en presentar característiques diferents, com són el diferent número de Cys, d'aa i el caràcter d'especificitat metàl·lica són de gran utilitat per ampliar, contrastar i conèixer millor el fenomen d'evolució amb el temps prèviament observat.

S'inclou en aquest estudi la isoforma Cup1, definida inequívocament com una Cu-tioneïna genuïna. Aquesta va ser estudiada prèviament^[89] i formant part de la Tesi Doctoral del Doctor R. Orihuela, com s'observa en la **Fig. 70**. S'ha dut a terme novament aquesta experiència sota les mateixes condicions experimentals, obtenint-se resultats completament anàlegs. El procés d'evolució amb el temps presenta un canvi radical en la seva especiació inicial i en les propietats espectroscòpiques de la mostra al llarg d'un temps superior a 30 dies. Els canvis detectats segueixen bàsicament les mateixes tendències observades per a les Cu-tioneïnes dels cargols terrestres, on les espècies sulfurades creixen en abundància amb el temps i amb un major contingut metàl·lic en Cd(II), sempre en detriment de l'espècie inicial més abundant Cd-MT. Aquest fenomen, sembla estar acompanyat per un reordenament de la proteïna observant-se per UV-Vis una disminució de l'absorció a 250 nm corresponent als enllaços Cd-S_{Cys} i augmentant a longitud d'ona de 300 nm, corresponent als enllaços Cd-S²⁻, tot plegat indicant el creixement d'aquestes espècies i de la mida de la partícula. L'empremta de DC mostra a la vegada la formació d'espècies finals més rígides i més estructurades que les inicials (senyals de DC més intenses i definides). Tot i confirmar-se les tendències globals observades, Cup1 presenta la particularitat de formar una espècie final i molt important d'estequiometria molt elevada, Cd₇S₇, la que presenta el contingut en sulfurs més elevat de totes les estudiades, tot i ser la isoforma més curta i amb menys número de residus de Cys. Seria llavors, la Cu-tioneïna que presenta complexos amb major capacitat d'incorporar lligands sulfur formant complexos estables. Així, totes les evidències recollides indiquen que el procés d'evolució amb el temps i de reordenació de la proteïna a causa de la presència de lligands sulfur no sembla estar relacionat ni amb la longitud d'aa ni número de residus de cisteïna.

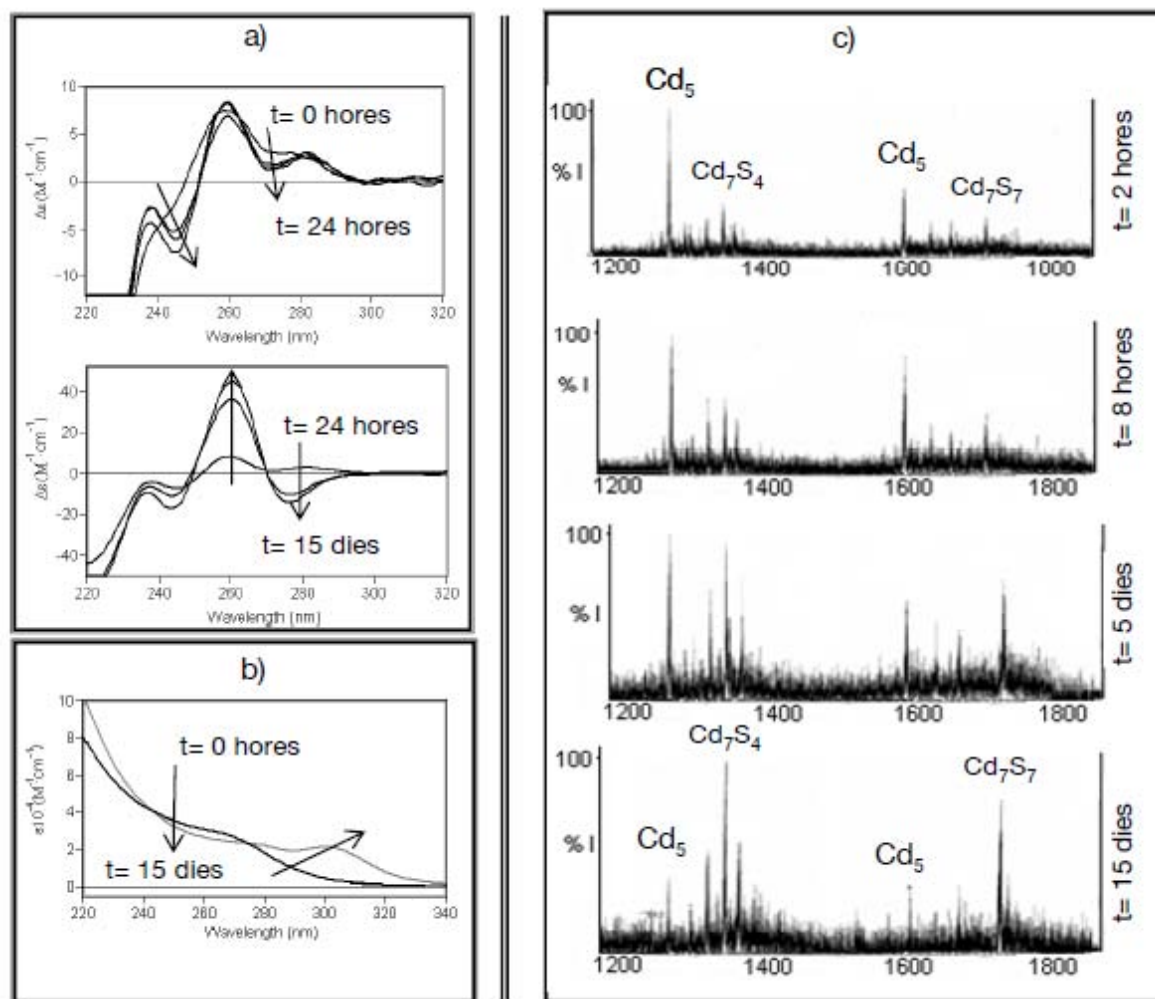


Fig. 70. Canvis espectroscòpics i espectromètrics de la preparació Cd-Cup1 obtinguda *in vivo* amb el temps. a) Canvis produïts en els espectres de DC des de $t = 0$ h fins a $t = 15$ dies, b) Espectres d'UV-Vis mesurats a $t = 0$ h (línia negra) i a $t = 15$ dies (línia gris), c) Evolució de la distribució molecular d'espècies presents en solució en diferents dies (des de $t = 0$ h fins a $t = 15$ dies) mesurada per ESI-MS.^[108]

Per últim, es van incloure a l'estudi les isoformes de mamífer MT2^[176] i MT3^[177], que com s'ha indicat anteriorment han estat recentment estudiades i classificades en Zn i Cu-tioneïnes. Es pretén, mitjançant l'observació de la seva evolució amb el temps i gràcies als coneixements adquirits a partir de l'anàlisi de sistemes coneguts, corroborar la idoneïtat de la classificació proposada per aquestes dues isoformes en funció d'aquest nou procés observat.

En el cas d'MT2, es va determinar un comportament més proper al d'una Zn-tioneïna. L'observació dels canvis al llarg del temps de la bioproducció Cd-MT2 (**Fig. 71**) ens permet afirmar que el seu comportament no és el d'una Zn-tioneïna genuïna. Encara que inicialment no es van detectar espècies sulfurades si s'observa la seva presència en solució, ja que després de 39 dies apareixen amb especial estabilitat les espècies Cd_6S_2 i Cd_7S_2 . Cal remarcar com l'estabilitat dels agregats de tipus Cd_7 -MT2 és tan gran que és necessari esperar molts dies per observar canvis en la mostra, reforçant així la idea de la seva afinitat pels metalls divalents. Per tant, els resultats indiquen que el temps d'evolució seria un factor rellevant. Els canvis observats en l'espectre de DC i UV-Vis són mínims, inclús es podria dir que inexistents encara que

segueixen la tendència observada anteriorment. L'aparició de les espècies sulfurades sembla no modificar en un grau important o no ser detectable en el plegament de la proteïna. Finalment, remarcar que sembla existir una tendència clara, on les proteïnes que presenten una afinitat intermèdia pel Zn(II), Cd(II) i Cu(I) també contenen menys quantitat de sulfurs en el medi, una evolució menys marcada de les espècies però també una menor degradació amb el temps de Cd-MT inicials. Seria possible llavors indicar com una petita quantitat de sulfurs en el medi podria tenir un efecte estabilitzador de les isoformes amb un caràcter Zn/Cu-tioneïna intermedi.

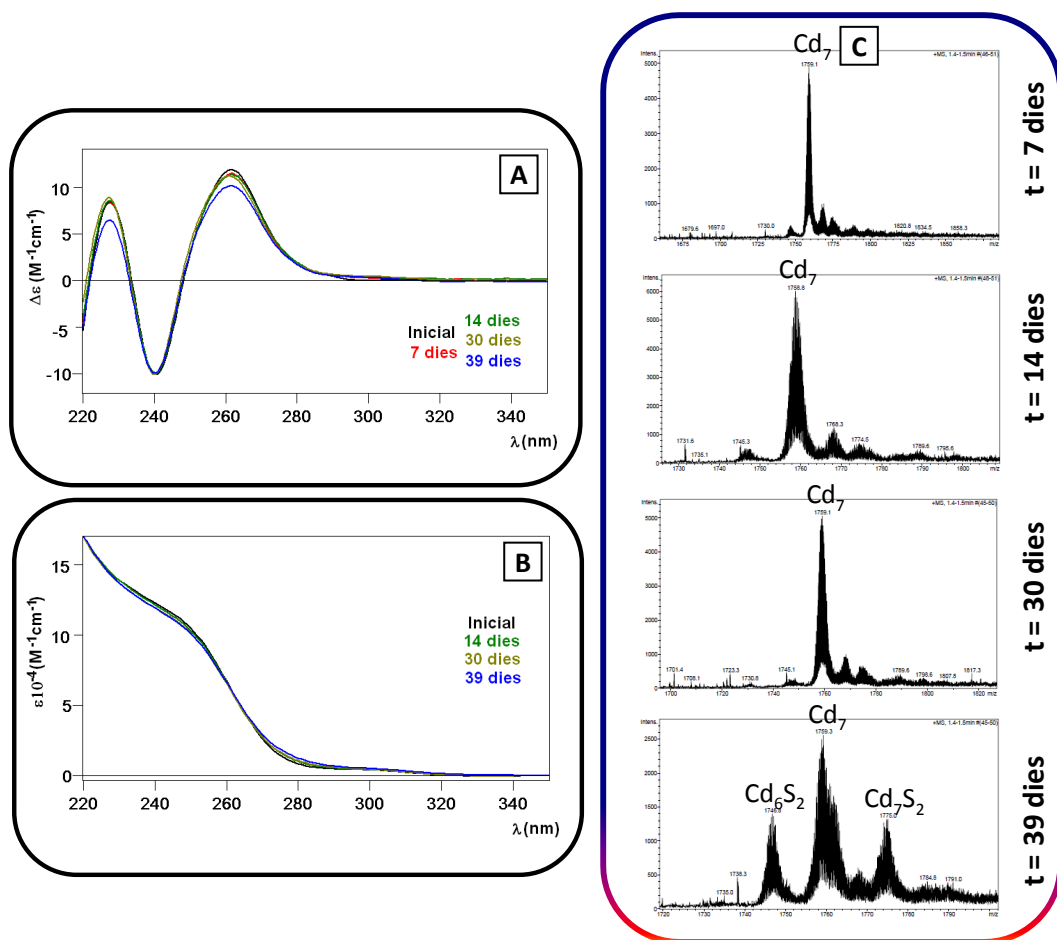


Fig. 71. Espectres de (A) DC, (B) UV-Vis i (C) ESI-MS enregistrats en diferents estadis de l'evolució amb el temps de la preparació Cd-MT2 a pH 7 i 25 °C.

Finalment, el canvis observats en la preparació de Cd-MT3 (definida com a una proteïna de caràcter intermedi però més propera a una Cu-tioneïna) aporten claredat a aquesta hipòtesi (Fig. 72). En un estadi inicial (7 dies) d'evolució de les formes Cd-MT es detecta la formació d'una mescla d'espècies on la Cd_7 -MT3 és la majoritària, però acompanyada per altres de tipus Cd_xS_y -MT (Cd_6S_2 -, Cd_7S_2 - i Cd_7S_3 -MT). Aquesta mescla es manté constant, no s'aprecien canvis en l'especiació fins passats 30 dies, on es comença a observar degradació de les espècies. Tot i que segueixen les tendències globals, els canvis detectats en els espectres de DC i UV-Vis són molt lleugers. El conjunt de resultats indiquen canvis mínims en l'estructuració de les espècies, si més no sembla com aquests no tenen una gran rellevància en els espectres de DC i UV-Vis, tot i la

formació d'espècies de tipus $\text{Cd}_x\text{S}_y\text{-MT}$. No es determina la formació d'una espècie amb especial importància, i en cap cas l'agregat $\text{Cd}_7\text{-MT3}$ deixa de ser l'espècie majoritària en la mostra. Així, les dades indiquen com MT3, tot i presentar característiques evidents d'una proteïna amb elevat caràcter de Cu-tioneïna, no mostra un canvi en l'estructuració ni en l'especiació tant marcat com en d'altres isoformes, per exemple en les Cu-tioneïnes genuïnes CaCuMT, HpCuMT i Cup1. Possiblement, el seu caràcter de Zn/Cu-tioneïna intermedi provoca la presència d'una menor quantitat de sulfur en la mostra, i per tant, un fenomen d'evolució de les espècies menys important.

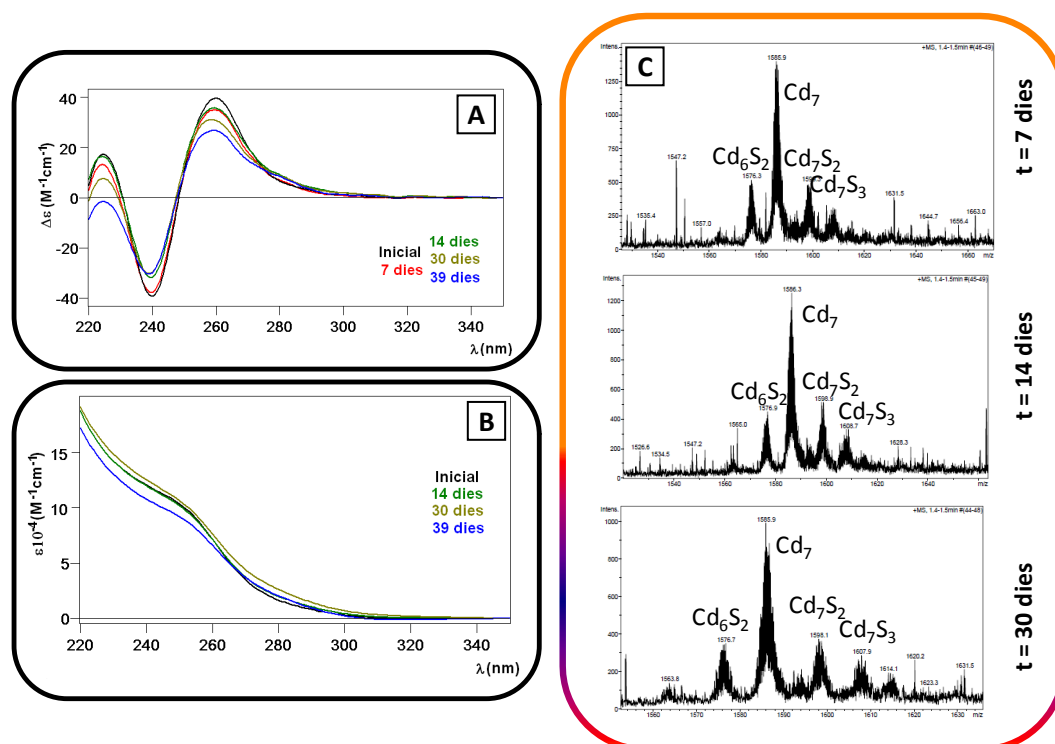


Fig. 72. Espectres de (A) DC, (B) UV-Vis i (C) ESI-MS enregistrats en diferents estadis de l'evolució amb el temps de la preparació Cd-MT3 a pH 7 i 25 °C.

L'anàlisi de l'evolució amb el temps mostra la detecció de canvis més dràstics en aquelles isoformes definides com a Cu-tioneïnes, indicant la formació d'espècies $\text{Cd}_x\text{S}_y\text{-MT}$ de major contingut en Cd(II) que les inicials i també de major estructuració. Es confirma com el procés es troba en total concordança amb el caràcter de Zn- i Cu-tioneïna de les metal·lotioneïnes, i per tant, amb el seu contingut en ions sulfurs. Tant la presència de lligands sulfur com el seu caràcter metàl·lic determinarà la velocitat i el grau de l'evolució amb el temps detectat. Finalment, ha estat possible establir com la naturalesa de les proteïnes, nombre de Cys i longitud de la cadena, no és un factor determinant d'aquest procés, sinó més aviat està acusat per l'especificitat metàl·lica de dites proteïnes.

3.5.2. Estudi de l'evolució amb el temps mitjançant la tècnica d'HPLC acoblada a diferents detectors: UV-Vis, ICP-MS i ESI-MS

Tot i la relació evident entre la presència de lligands sulfur en les preparacions Cd-MT i la seva evolució amb el temps, que dona lloc a canvis espectroscòpics i d'especiació observada, com s'ha observat en l'apartat anterior, encara queden algunes qüestions pendents de resoldre: realment el desplaçament de les absorpcions properes a 270 nm és degut a la mida de les espècies $\text{Cd}_x\text{S}_y\text{-MT}$ formades? Totes les espècies que contenen sulfurs es comporten de la mateixa manera? I les diferents MTs que contenen sulfurs tenen un comportament idèntic?. Per tal de resoldre aquestes qüestions, es va realitzar l'estudi de l'evolució amb el temps mitjançant cromatografia líquida d'alta resolució (HPLC) utilitzant una columna d'exclusió molecular (Size Exclusion Chromatography, SEC) acoblada a diferents detectors, UV-Vis, ESI-MS i ICP-MS (**Capítol 5, Apartat 5.4.**), el quals han de permetre monitoritzar i caracteritzar els canvis observats prèviament al llarg del temps.

Es va triar la metodologia d'exclusió molecular per mida ja que, com el seu nom indica, permet separar les espècies per mida (volum hidrodinàmic), i d'entre els diferents mecanismes de separació existents, aquest és el que menys altera el clúster metàl·lic format, degut a que no implica cap tipus d'interacció de caràcter químic. Un altre avantatge d'aquesta metodologia és que permet l'acoblament amb diferents detectors, la qual cosa permet una anàlisi més completa i acurada del sistema en estudi.

Cal remarcar que, tot i que les mostres poden evolucionar durant més de 30 dies, l'estudi dut a terme s'ha realitzat amb la mostra inicial (a temps zero) i un cop han evolucionat 10 dies a temperatura ambient sota atmosfera d'argó, amb la finalitat de poder estudiar totes en un mateix moment evolutiu i, alhora, evitar possibles problemes associats amb la degeneració de la mostra.

La columna escollida va ser la Superdex Peptide 10/30 GL (GE HEALTHCARE), amb un rang d'exclusió entre 100 i 7000 Da, que va permetre observar diferents pics a partir d'unes mostres pures. El detector d'UV-vis és de fàcil aplicació quan es treballa amb un sistema d'HPLC ja que en molt casos, com el que aquí es presenta, els instruments utilitzats porten incorporats un mòdul amb aquest detector i a més, en cas de fer servir un de tipus Diode Array, permeten monitoritzar diferents longituds d'ona al mateix temps per tal d'obtenir informació addicional i complementària. Pel que fa a l'acoblament en línia de la tècnica cromatogràfica amb la detecció per ESI-MS, aquesta permet detectar les espècies en solució en cada punt del cromatograma (**Capítol 5, Apartat 5.4.**), la qual cosa aporta una valuosa informació del sistema. Finalment, l'anàlisi mitjançant l'acoblament HPLC-ICP-MS permet monitoritzar de forma contínua el senyal simultani de diferents elements (en aquest cas Cd i S), fent possible determinar el contingut de

cadascun dels pics cromatogràfics observats. En el cas concret d'aquest treball, la monitorització de ^{111}Cd i ^{32}S hauria de permetre detectar els canvis en el contingut en Cd i S (la relació Cd/S) en tots els punts del cromatograma, per tal d'identificar els pics que contenen el metall i la proteïna, així com confirmar els pics que presenten els canvis més importants. Cal remarcar que per fer el seguiment de S va ser necessari emprar un instrument d'alta resolució degut als problemes inherents de la tècnica pel que fa al seguiment del S (interferència important de l' O_2) i per la baixa quantitat de S present a la mostra.

Tal i com s'havia observat en l'apartat anterior, mitjançant tècniques espectroscòpiques, les mostres evolucionades es poden agrupar en dos grans grups: les que pateixen un canvi en els senyals detectats amb el temps, i les que no.

Aquelles que es mostren invariants amb el temps acostumen a formar un únic complex Cd-MT *in vivo* de gran estabilitat i que és manté inalterable en uns períodes llargs de temps, més de 30 dies. S'inclouen en aquest grup els complexos $\text{Cd}_6\text{-HpCdMT}$, $\text{Cd}_6\text{-CaCdMT}$ i $\text{Cd}_7\text{-MT2}$ *in vivo*. Aquestes mostres són les idònies per a comprovar la validesa dels sistema HPLC-SEC acoblat amb UV-Vis, ICP-MS i ESI-MS en l'estudi de l'evolució amb el temps, donat que tenen un comportament perfectament conegut. Els resultats obtinguts per aquestes tres isoformes d'MT (**Fig. 73** a **Fig. 78**) mostren, en les tres tècniques, un únic pic molt intens, acompanyat d'altres relativament menys importants a temps de retenció inferiors. En totes tres bioproduccions és possible determinar com aquests pics més petits corresponen en tots els casos al mateix tipus d'espècies, degut a una petita degradació de la mostra (oxidacions, dimerització, etc.) o per arrossegament d'impureses presents a la columna. Cal esmentar que s'ha pogut observar que els espectres d'ICP-MS enregistrats presenten una menor resolució dels pics en comparació amb els espectres d'UV-Vis. Això és degut principalment a la necessitat d'utilitzar un acoblament amb divisor de flux (*splitter*), que provoca una pèrdua de resolució cromatogràfica, fet habitual en aquests tipus d'acoblaments.

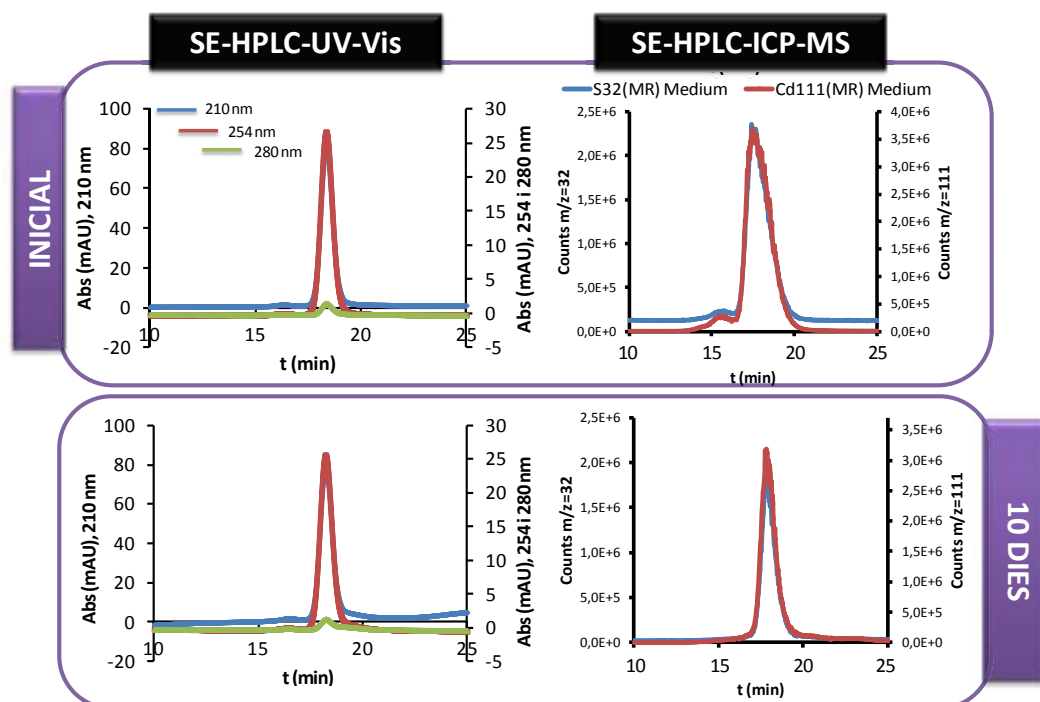


Fig. 73. Cromatogrames obtinguts mitjançant els acoblaments HPLC-UV-Vis i HPLC-ICP-MS de l'espècie $\text{Cd}_6\text{-HpCdMT}$, a temps zero i després de 10 dies.

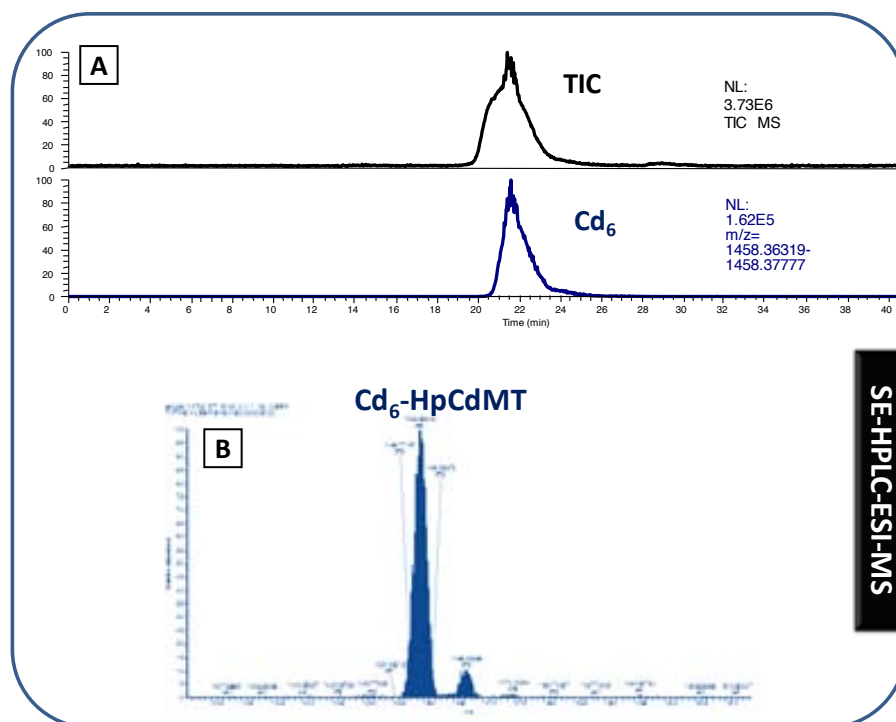


Fig. 74. (A) Cromatograma obtingut mitjançant l'acoblament HPLC-ESI-MS de l'espècie $\text{Cd}_6\text{-HpCdMT}$ després de la seva evolució durant 10 dies i (B) el corresponent espectre d'ESI-MS enregistrat per al temps de retenció de 22 min.

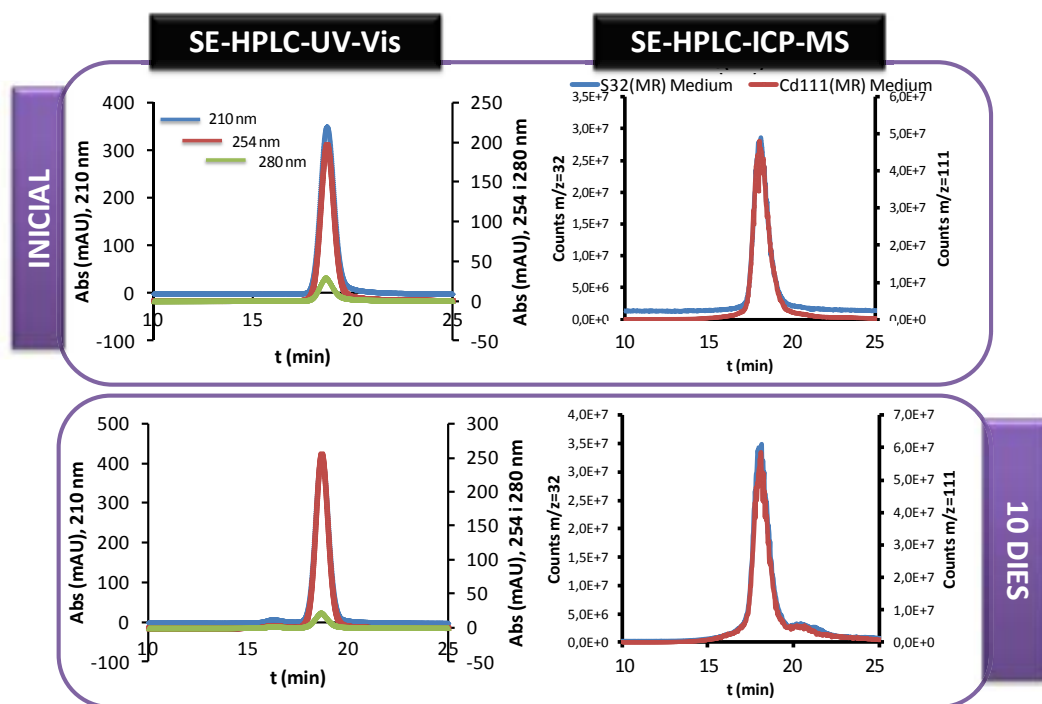


Fig. 75. Cromatogrames obtinguts mitjançant els acoblaments HPLC-UV-Vis i HPLC-ICP-MS de l'espècie $\text{Cd}_6\text{-CaCdMT}$, a temps zero i després de 10 dies.

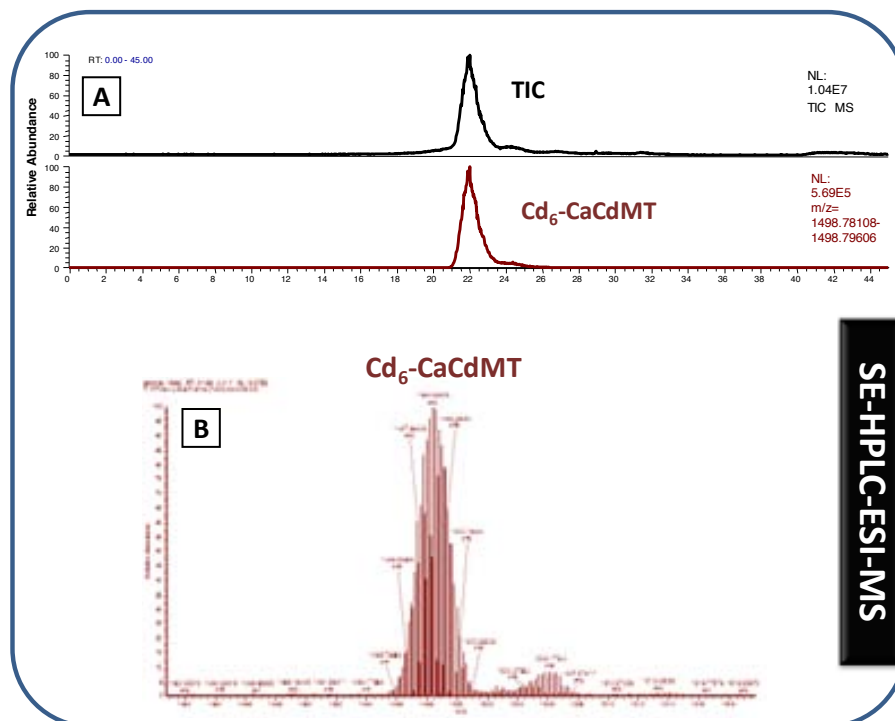


Fig. 76. (A) Cromatograma obtingut mitjançant l'acoblament HPLC-ESI-MS de l'espècie $\text{Cd}_6\text{-CaCdMT}$ després de la seva evolució durant 10 dies i (B) el corresponent espectre d'ESI-MS enregistrat per al temps de retenció de 22 min.

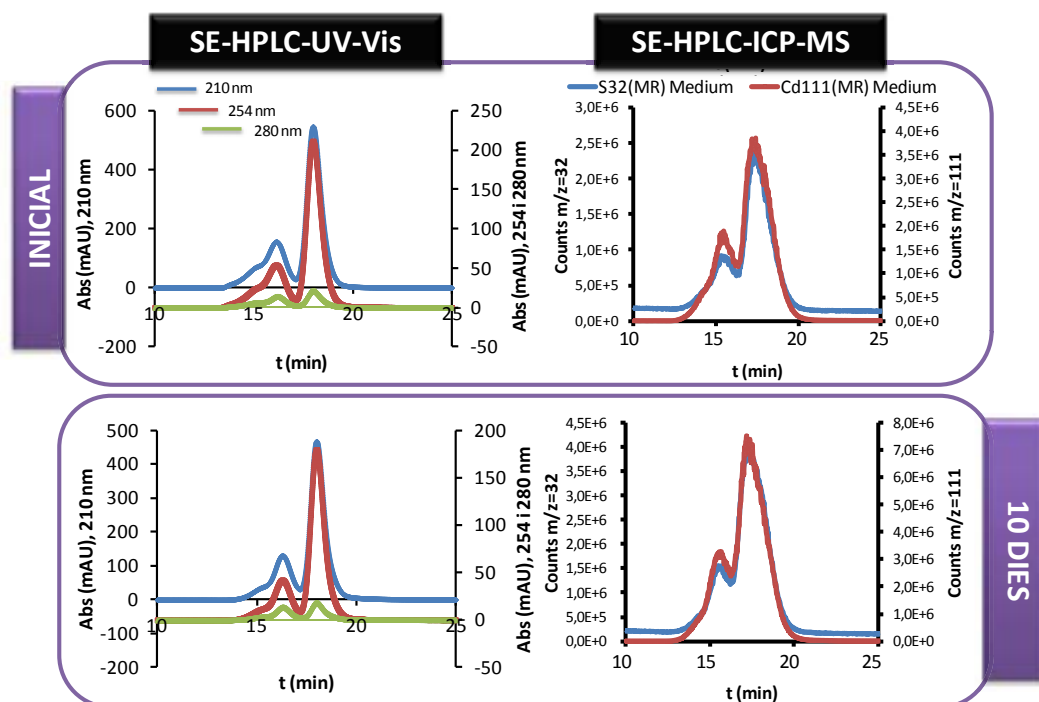


Fig. 77. Cromatogrames obtinguts mitjançant els acoblament HPLC-UV-Vis i HPLC-ICP-MS de la preparació Cd-MT2, a temps zero i després de 10 dies.

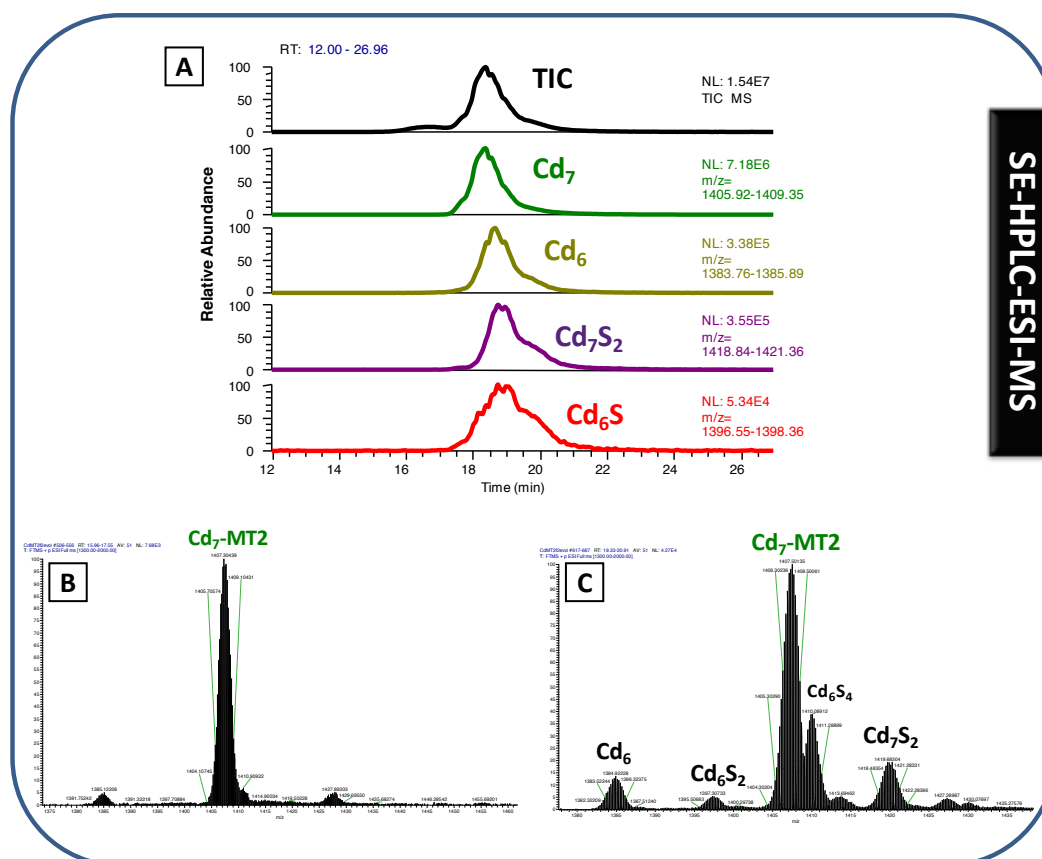


Fig. 78. (A) Cromatograma obtingut mitjançant l'acoblament HPLC-ESI-MS de la preparació Cd-MT2 després de la seva evolució durant 10 dies i els corresponents espectres d'ESI-MS enregistrat per al temps de retenció de (B) 17.89-19.39 i (C) 19.39-20.91.

L'estudi de les espècies $\text{Cd}_6\text{-HpCdMT}$ (**Fig. 73**) i $\text{Cd}_6\text{-CaCdMT}$ (**Fig. 75**) mostra com el pic majoritari, que apareix a un temps de retenció d'aproximadament 18 min, ni es desplaça ni varia el seu espectre d'UV-Vis (els perfils de les diferents longituds d'ona enregistrades) i tampoc ho fa el seu contingut en S i Cd. Aquest pic cromatogràfic conté únicament l'espècie $\text{Cd}_6\text{-MT}$ corresponent (**Fig. 74 i Fig. 76**), descartant així cap canvi en l'especiació de les mostres inicials.

El cas particular de la preparació Cd-MT2 és lleugerament diferent als dos anteriors. Tot i no observar-se una clara evolució amb el temps, sí que és possible identificar petites variacions en els espectres d'UV-Vis després de 10 dies (**Fig. 77**). S'observa un lleuger creixement de l'absorció a longitud d'ona de 280 nm a temps de retenció més grans que el pic principal, zona corresponent a l'enllaç Cd(II)-sulfur . Una menor resolució dels espectres d'ICP-MS podria ser la causant de que aquests canvis observats per la preparació Cd-MT2 no siguin detectables per aquesta tècnica. Els espectres d'ESI-MS enregistrats mostren que, a més de l'espècie majoritària inicial $\text{Cd}_7\text{-MT2}$ (**Fig. 78B**), a temps de retenció superiors (**Fig. 78C**) es detecta l'aparició conjunta d'agregats de tipus $\text{Cd}_x\text{S}_y\text{-MT2}$ minoritaris coexistent amb l'espècie inicial majoritària. Es confirma llavors la presència d'una petita quantitat d'anions sulfur tot i que l'espècie principal $\text{Cd}_7\text{-MT}$ continua mantenint-se sense alteracions al llarg del temps.

Aquests resultats preliminars mostren com, mitjançant la monitorització de l'evolució amb el temps amb aquesta metodologia, és possible determinar canvis, fins i tot quan aquests són de poca importància, en l'especiació i en el contingut en Cd i S dels diferents pics cromatogràfics. Tanmateix, la formació i creixement de les espècies de tipus $\text{Cd}_x\text{S}_y\text{-MT}$ es reflecteix en un creixement de l'absorció a longitud d'ona de 280 nm a temps de retenció superiors al de les espècies inicials.

En l'altre grup de proteïnes es troben aquelles preparacions Cd-MT que sí van mostrar uns canvis en l'especiació i en les propietats espectroscòpiques al llarg del temps, tot i que en diferents graus: HpCuMT , CaCuMT i Cup1 (amb un clar caràcter de Cu-tioneïna), i les isoformes CaCdCuMT i MT3 (definides com a Cu-tioneïnes no genuïnes). Com a tret comú cal destacar que els resultats obtinguts han permès observar, en els espectres inicials, diferents pics que contenen tant Cd com S, a diferència del grup anterior, provocat per la presència de lligands sulfur addicionals. L'evolució amb el temps també és molt similar, ja que es produeix un canvi en la intensitat dels pics observats i, en alguns casos, l'aparició de pics a temps de retenció superiors. El conjunt de les dades adquirides pels 3 tipus de detectors (UV-Vis, ESI-MS i ICP-MS) permet observar que el pic a temps de retenció menor (pic 1) acostuma a presentar bàsicament espècies que només contenen Cd, mentre que les espècies amb lligands sulfurs apareixen en pics a temps de retenció superiors (pics 2 i 3). Per tant, la presència de sulfurs comporta la formació d'uns complexos Cd-S-MT amb un volum hidrodinàmic inferior als dels complexos Cd-MT. Com que el contingut en Cd de les espècies sulfurades és sempre igual o superior al de les

homòlogues sense lligands sulfur, aquesta diferència de comportament cromatogràfic es pot atribuir a la formació d'espècies més compactes. De fet, mentre que el pic 2 acostuma a presentar una mescla d'espècies Cd-MT i $\text{Cd}_x\text{S}_y\text{-MT}$, el pic 3, poc intens inicialment o absent, conté principalment espècies sulfurades que evolucionen cap a una espècie majoritària $\text{Cd}_x\text{S}_y\text{-MT}$, que varia en funció de la proteïna considerada. Finalment, cal remarcar com l'increment observat pel pic 3 acostuma a estar acompanyat d'una disminució de la intensitat dels pics 1 i 2 (en concordança amb les dades de DC, UV-Vis i ESI-MS on s'observa la formació d'espècies sulfurades en detriment de la canònica Cd-MT inicial al llarg del temps).

Entre les MTs estudiades, el comportament més proper és el que mostren les isoformes HpCuMT (**Fig. 79** i **Fig. 80**) i CaCuMT (**Fig. 81** i **Fig. 82**). Inicialment, en els respectius cromatogrames d'UV-Vis per les $\lambda=254$ i 210 nm s'observen 3 pics, dos d'ells de major intensitat, i un colze a temps de retenció més grans. Aquest colze presenta una intensitat relativa més gran per a $\lambda=280$ nm, indicant una major proporció de sulfurs que en la resta de pics. Amb el temps aquest colze es fa més intens (pic 4), en totes les longituds d'ona enregistrades però amb major importància per $\lambda=280$ nm. A la vegada, els espectres d'ICP-MS mostren després de 10 dies també un increment del contingut de Cd i S a temps de retenció més grans. Finalment, en el cas d'aquestes dues MT, es pot apreciar que l'evolució amb el temps, 10 dies, dóna lloc a la formació amb gran preferència d'agregats $\text{Cd}_8\text{S-MT}$ (**Fig. 80** i **Fig. 82**) com a espècie majoritària en el pic 4 (temps de retenció més gran) que creix amb el temps.

En el cas de la forma Cd-Cup1 (**Fig. 83** i **Fig. 84**) els canvis observats en els cromatogrames d'UV-Vis i ICP-MS són molt menys importants que en les altres dues Cu-tioneïnes estudiades (HpCuMT i CaCuMT). S'observa com després de 10 dies d'evolució creix un petit colze a temps de retenció d'aproximadament 20 minuts. Aquest canvi és tant poc important que no s'aprecia en els espectres d'ICP-MS enregistrats. El espectres d'ESI-MS indiquen la coexistència d'espècies de tipus Cd-MT i $\text{Cd}_x\text{S}_y\text{-MT}$ de diferents estequiometries a pràcticament tots els punts del cromatograma. En qualsevol cas, seguint la tendència global observada anteriorment, a temps de retenció més grans (**Fig. 84C**), es pot detectar que el colze conté com a espècie molt important el complex $\text{Cd}_7\text{S}_7\text{-Cup1}$, observat prèviament en altres estudis d'evolució amb el temps.^[108] Es confirma d'aquesta manera la formació d'aquest complex més compacte (volum hidrodinàmic més petit) i que incorpora gran quantitat de S^{2-} i Cd(II) respecte la seva forma $\text{Cd}_5\text{-MT}$ inicial.

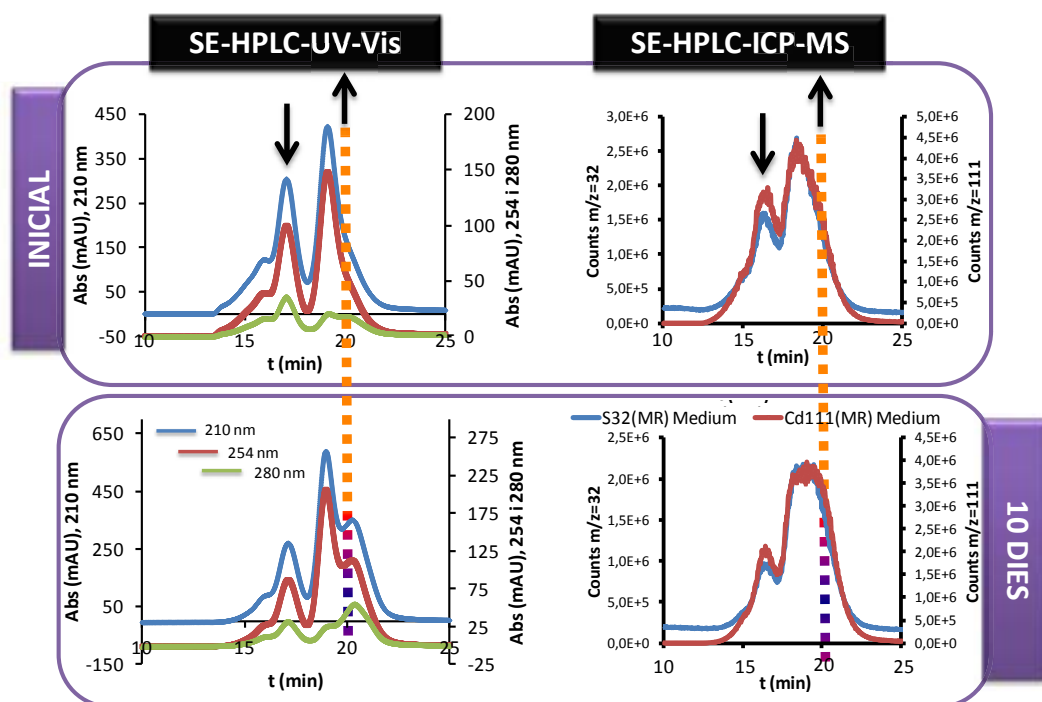


Fig. 79. Cromatogrames obtinguts mitjançant els acoblament HPLC-UV-Vis i HPLC-ICP-MS de la preparació Cd-HpCuMT, a temps zero i després de 10 dies.

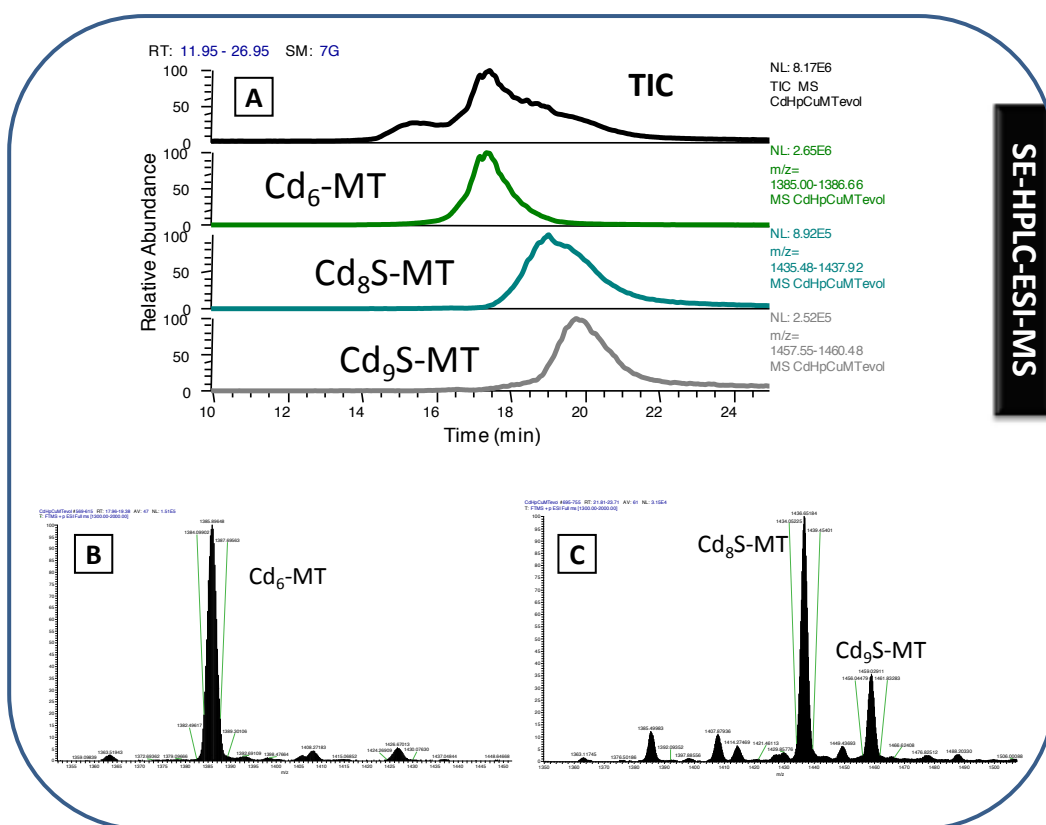


Fig. 80. (A) Cromatograma obtingut mitjançant l'acoblament HPLC-ESI-MS de la preparació Cd-HpCuMT després de la seva evolució durant 10 dies i els corresponents espectres d'ESI-MS enregistrat per al temps de retenció de (B) 16.00-17.50 i (C) 19.81-21.70.

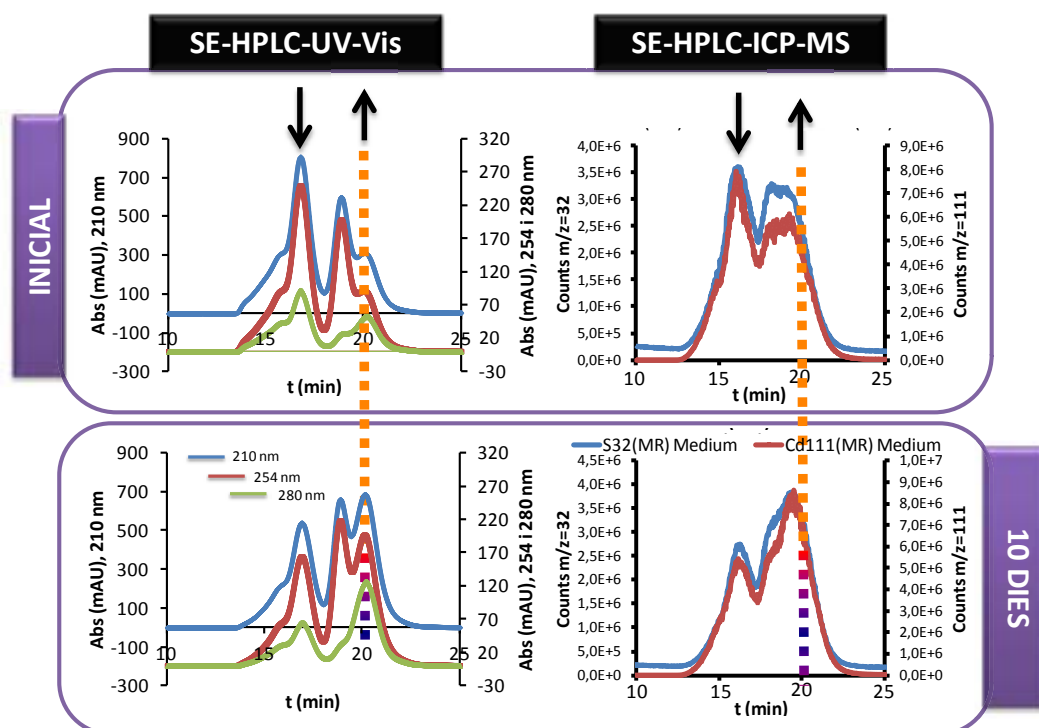


Fig. 81. Cromatogrames obtinguts mitjançant els acoblaments HPLC-UV-Vis i HPLC-ICP-MS de la preparació Cd-CaCuMT, a temps zero i després de 10 dies.

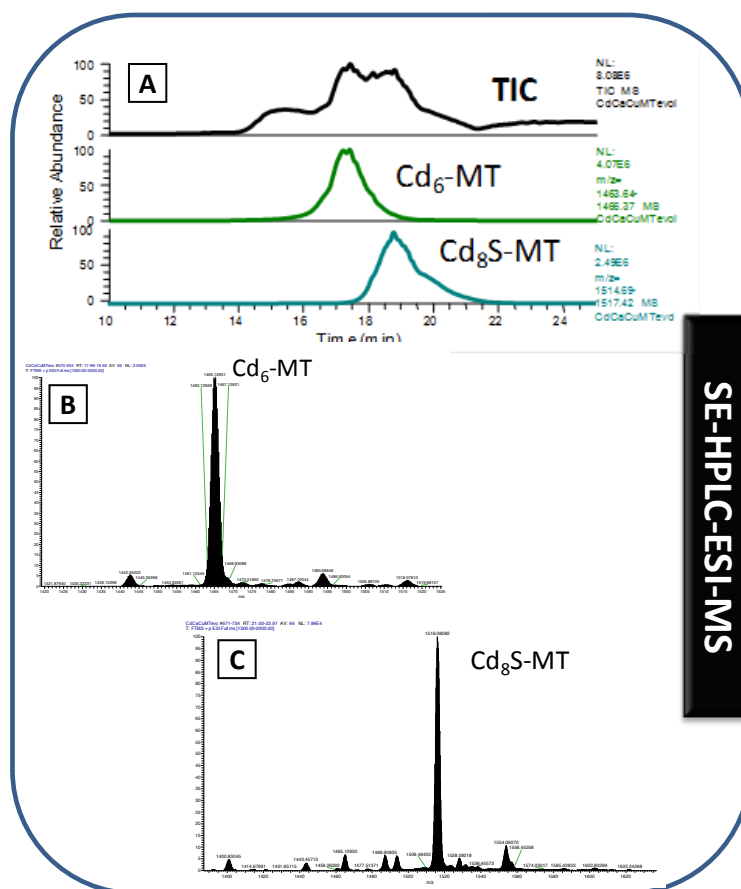


Fig. 82. (A) Cromatograma obtingut mitjançant l'acoblament HPLC-ESI-MS de la preparació Cd-CaCuMT després de la seva evolució durant 10 dies i els corresponents espectres d'ESI-MS enregistrats per al temps de retenció de (B) 16.00-18.00 i (C) 19.00-21.00.

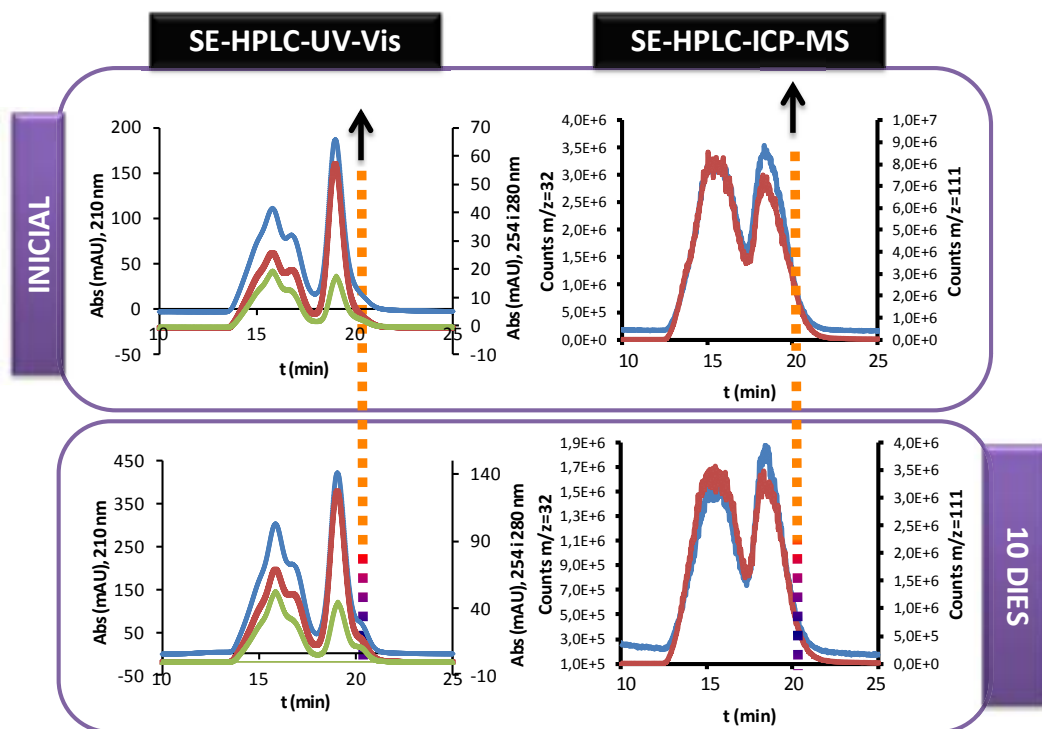


Fig. 83. Cromatogrames obtinguts mitjançant els acoblament HPLC-UV-Vis i HPLC-ICP-MS de la preparació Cd-Cup1, a temps zero i després de 10 dies.

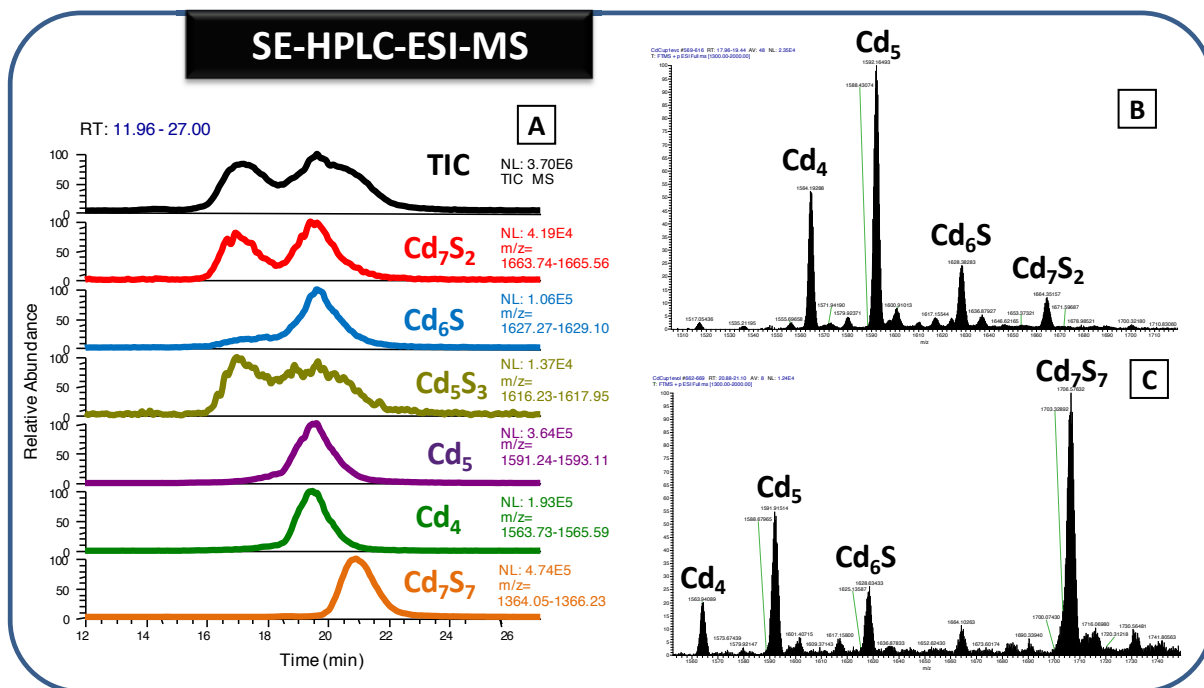


Fig. 84. (A) Cromatograma obtingut mitjançant l'acoblament HPLC-ESI-MS de la preparació Cd-Cup1 després de la seva evolució durant 10 dies i els corresponents espectres d'ESI-MS enregistrat per al temps de retenció de (B) 17.96-19.44 i (C) 20.88-21.10.

Finalment, es presenten els casos de les isoformes CaCdCuMT i MT3, amb un caràcter de Zn-/Cu-tioneïna intermedi però amb una major especificitat pel Cu(I).

CaCdCuMT (**Fig. 85** i **Fig. 86**), tot i presentar canvis al llarg del temps ho fa de forma particular a la resta, ja que a més de la variació d'intensitat dels pics observats presenta un

augment del temps de retenció del pic 3. Analitzant el contingut d'aquest pic 3 evolucionat s'observa la presència d'espècies amb menys contingut metàl·lic i amb S^{2-} , la qual cosa justificaria una disminució de la mida de les espècies generades i l'augment del temps de retenció observat. La justificació més raonable seria una baixa estabilitat de les espècies Cd_xS_y - $CaCdCuMT$ formades que no resisteixen les condicions experimentals, la qual cosa es troba en correspondència amb una especificitat metàl·lica intermèdia per Zn/Cd i per Cu.

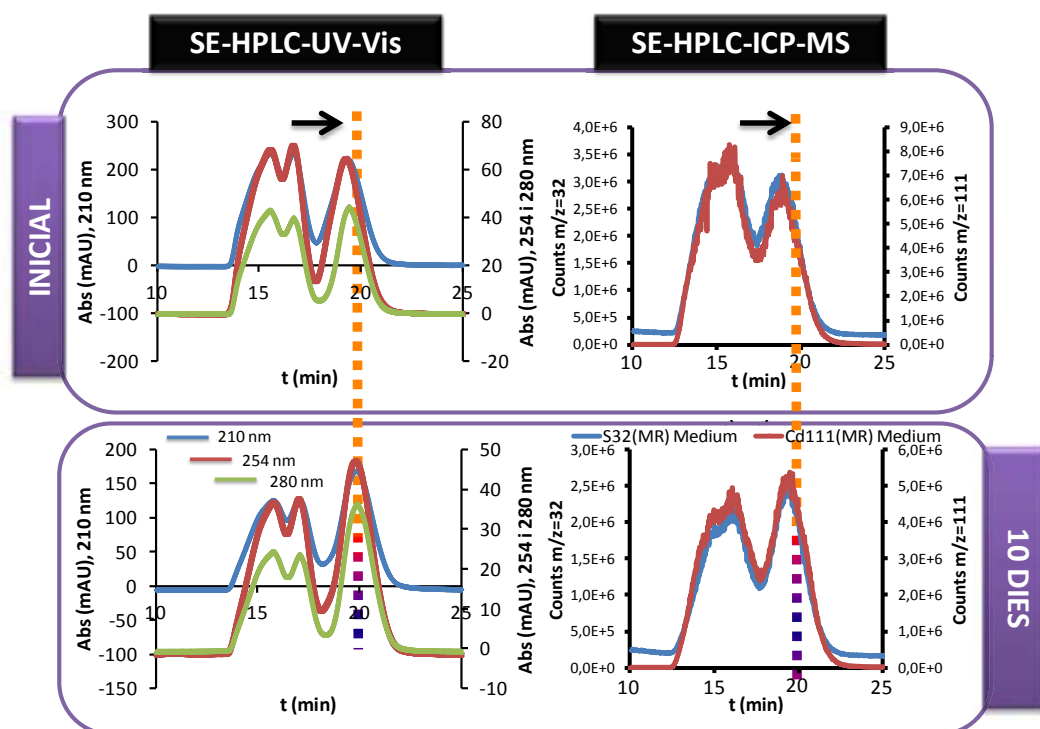


Fig. 85. Cromatogrames obtinguts mitjançant els acoblaments HPLC-UV-Vis i HPLC-ICP-MS de la preparació Cd- $CaCdCuMT$, a temps zero i després de 10 dies.

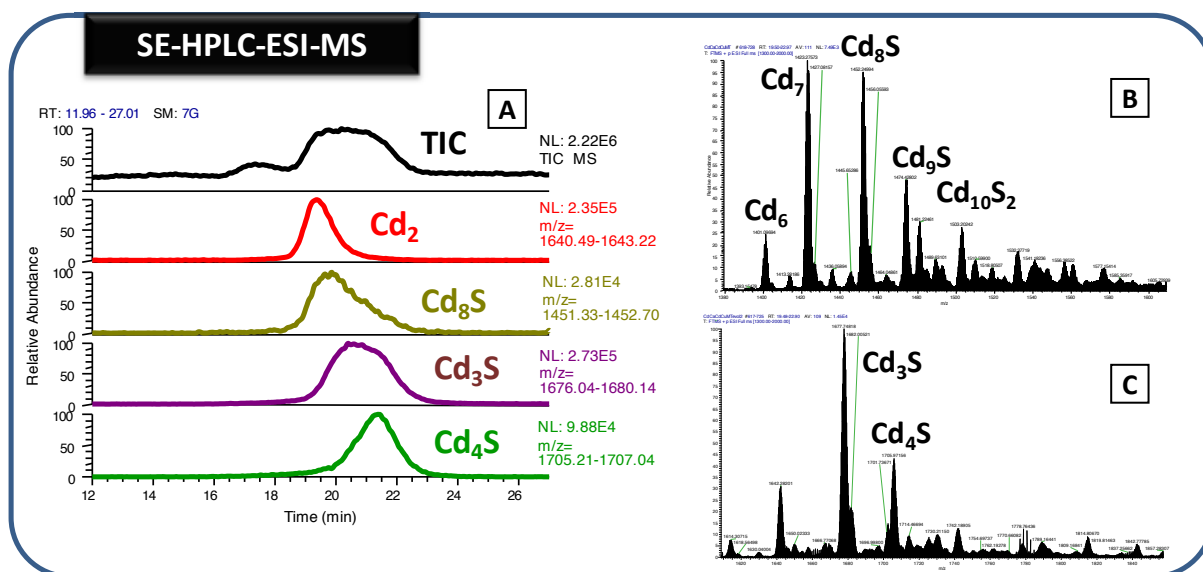


Fig. 86. (A) Cromatograma obtingut mitjançant l'acoblament HPLC-ESI-MS de la preparació Cd- $CaCdCuMT$ després de la seva evolució durant 10 dies i els corresponents espectres d'ESI-MS enregistrat per al temps de retenció de (B) 19.50-23.00 i (C) 21.00-22.50.

En el cas d'MT3 no s'observa cap desplaçament significatiu del pic majoritari inicial. Tot i que en una primera anàlisi no s'aprecien canvis importants, si és possible enregistrar un lleuger creixement de les espècies sulfurades, però tant lleuger que és difícil identificar la seva correspondència en els espectres d'UV-Vis i ICP-MS, però si mitjançant l'ESI-MS. Es va poder detectar per anàlisi de masses un creixement relatiu de les espècies sulfurades en la mescla. Així MT3 presentaria, segons les dades d'evolució amb el temps, un caràcter intermedi amb major tendència a ser una Cu-tioneïna però en menor grau que les respectives CuMTs dels cargols terrestres *H.pomatia* i *C.aspersum*.

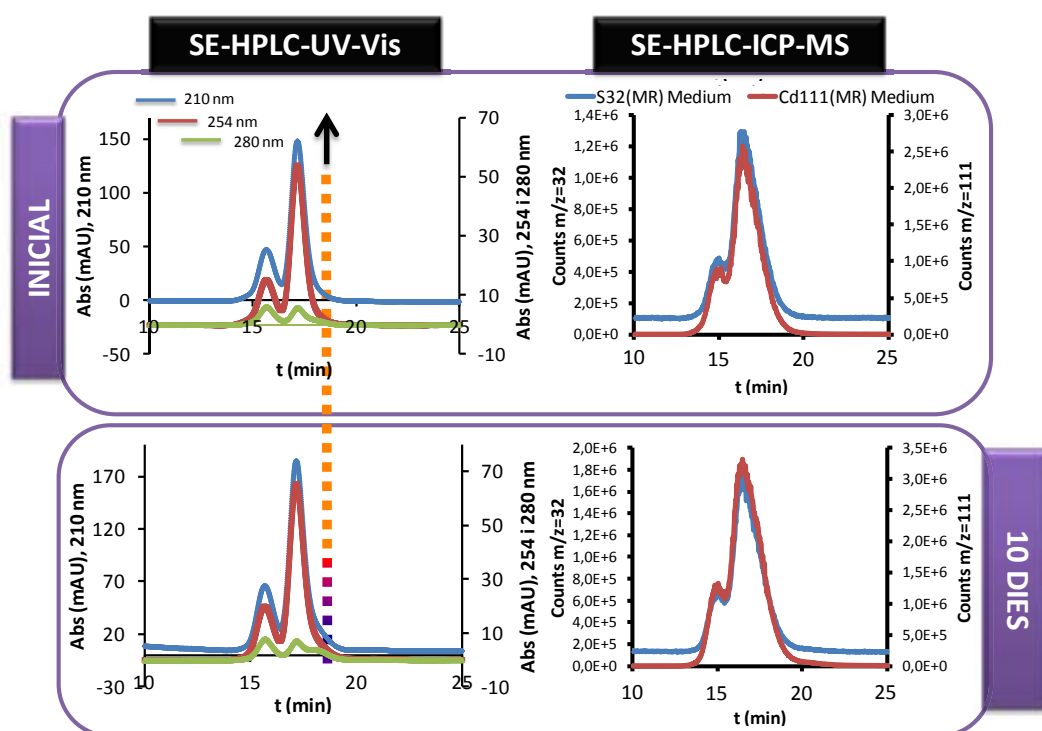


Fig. 87. Cromatogrames obtinguts mitjançant els acoblaments HPLC-UV-Vis i HPLC-ICP-MS de la preparació Cd-MT3, a temps zero i després de 10 dies.

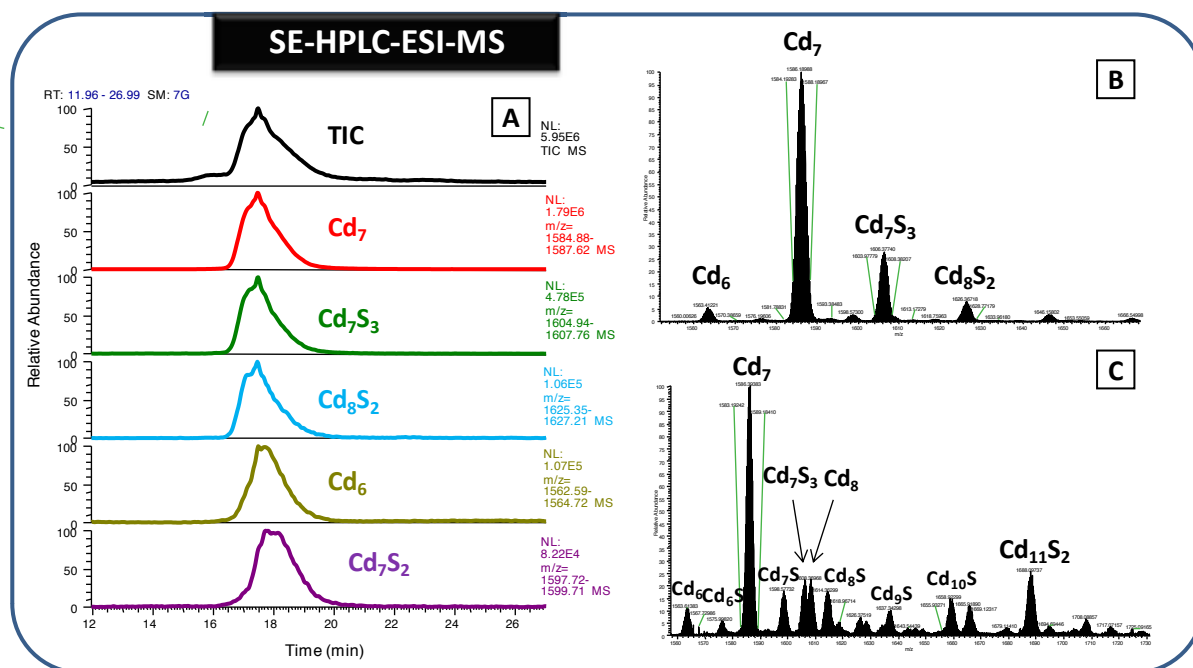


Fig. 88. (A) Cromatograma obtingut mitjançant l'acoblament HPLC-ESI-MS de la preparació Cd-MT3 després de la seva evolució durant 10 dies i els corresponents espectres d'ESI-MS enregistrat per al temps de retenció de (B) 16.98-17.54 i (C) 18.64-19.31.

És molt important remarcar aquí que l'anàlisi dels resultats obtinguts en el conjunt de l'estudi permeten demostrar que les dades aportades per l'acoblament HPLC-UV-Vis són perfectament comparables a les dades aportades pels detectors. Fins i tot, el fet que la detecció sigui en línia, sense necessitat d'acoblements específics, fa que aquesta metodologia presenti una major resolució cromatogràfica que les altres assajades. Així, l'evolució amb el temps de les preparacions Cd-MT podria ser seguida únicament pels senyals d'UV-Vis (**Fig. 89**). L'estudi confirma que aquelles isoformes d'MT amb un major caràcter de Cu-tioneïna (HpCuMT, CaCuMT i CdCup1) continuen evolucionant i presentant canvis al llarg del temps. En totes tres situacions els espectres d'UV-Vis mostren el creixement en intensitat del pic a temps de retenció més gran. L'efecte més important es pot observar en HpCuMT (**Fig. 89A**) i CaCuMT (**Fig. 89B**) on el pic 3 arriba a tenir la mateixa intensitat i, en el cas de CaCuMT ser més gran, que el segon pic que com s'ha vist, contenen barreges d'espècies $\text{Cd}_x\text{S}_y\text{-MT}$ i Cd-MT. Pel que fa a la isoforma Cup1 (**Fig. 89C**), tot i tenir un caràcter de Cu-tioneïna més extrem, i per tant la presència de més espècies $\text{Cd}_x\text{S}_y\text{-MT}$ inicials, el seu perfil cromatogràfic no varia tant des de l'estadi inicial (evolució cromatogràfica menys important), tot i que s'observen canvis a temps de retenció més grans, seguint les tendències observades per les Cu-MTs de cargol en aquest fenomen d'evolució. Aquelles espècies que inicialment no contenien, o en petita quantitat, lligands sulfurs no presenten canvis rellevants a temps més llargs, indicant que la menor presència de sulfurs provoca menys canvis, una evolució més ràpida.

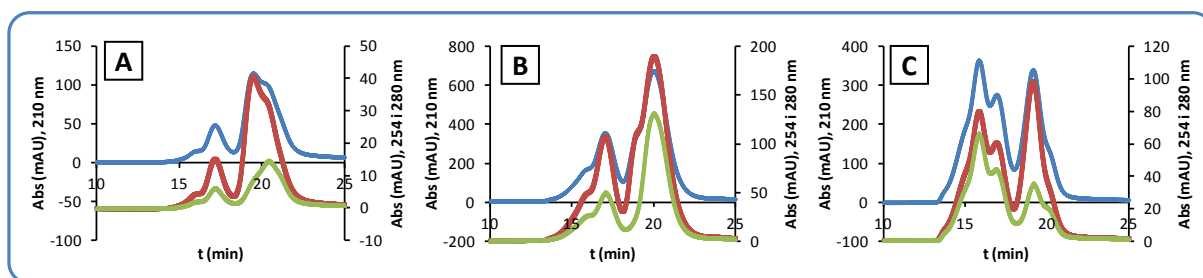


Fig. 89. Cromatogrames obtinguts mitjançant l'acoblament HPLC-UV-Vis de les preparacions Cd-HpCuMT (A), Cd-CaCuMT (B) i Cd-Cup1 (C) després de 30 dies d'evolució.

3.5.3. Consideracions globals

L'estudi mitjançant les tècniques de DC, UV-Vis i ESI-MS de la variació amb el temps de diverses preparacions Cd-MT de diferents isoformes ha permès determinar les principals característiques dels canvis experimentats amb el temps deguts a la presència de lligands sulfur, fet associat al caràcter de Cu-tioneïna d'aquestes proteïnes. L'evolució observada comporta uns canvis característics i comuns en les diferents preparacions que ho experimenten: augment i desplaçament de les absorcions per sobre de 270 nm (Cd-S^{2-}) al DC i UV-Vis, alhora que disminueix l'absorció a 250 nm (Cd-S_{Cys}), augment de les espècies sulfurades per ESI-MS i disminueix la intensitat de les no-sulfurades. Totes aquestes evidències porten a concloure que l'evolució de les mostres, en diferents graus segons la preparació considerada, dona lloc a la formació d'espècies $\text{Cd}_x\text{S}_y\text{-MT}$ en detriment de les espècies majoritàries Cd-MT inicials.

Per una altra banda, la monitorització d'aquest procés mitjançant l'acoblament d'un sistema cromatogràfic (*size exclusion*-HPLC) amb diferents tipus de detecció (UV-Vis, ESI-MS i ICP-MS) ha permès corroborar el comportament anteriorment descrit a partir de les dades espectroscòpiques, alhora que ha aportat noves dades sobre l'evolució de les espècies que contenen lligands sulfur addicionals. L'aparició de pics cromatogràfics que contenen espècies $\text{Cd}_x\text{S}_y\text{-MT}$ a temps de retenció superiors, en detriment dels pics inicials a temps més curts i que contenen bàsicament espècies Cd-MT, sembla indicar la formació d'espècies amb una major compactació.

Així, les dades obtingudes indiquen que la metodologia aplicada, i principalment l'acoblament SE-HPLC-UV-vis, resulta molt útil per poder identificar i monitoritzar l'evolució amb el temps de les Cu-tioneïnes.

Els resultats han permès corroborar com un marcat caràcter de Zn-tioneïna, caracteritzat per una absència o molt baixa presència de sulfurs addicionals en les bioproduccions Cd-MT d'aquestes MTs, està lligat amb l'estabilitat (no evolució) amb el temps les espècies Cd-MT formades *in vivo*. Així, les Zn-tioneïnes es caracteritzen pel fet que no requereixen de la incorporació de lligands sulfur addicionals per a la formació dels seus agregats Cd-MT, com tampoc per a la seva estabilització. Per altra banda, com més marcat és el caràcter de Cu-

tionèina d'una MT, major és el seu contingut en S^{2-} i major també és l'evolució amb el temps de les bioproduccions Cd-MT, observant-se pics cromatogràfics on bàsicament existeixen espècies Cd_xS_y -MT.

