



Universitat Autònoma de Barcelona

Regulació de les metal·lotionèines hepàtiques i cerebrals

Joaquim Hernández Martín

Memòria de la Tesi presentada per JOAQUIM HERNÁNDEZ MARTÍN per optar al grau de Doctor en Biologia per la Universitat Autònoma de Barcelona.

Defensada el 2 d'Abril de 1998.

Director de Tesi:

Dr. Juan Hidalgo Pareja

Professor Titular

Dept. Biologia Cel·lular i Fisiologia

Unitat Fisiologia Animal. Ciències.

Universitat Autònoma de Barcelona.

Als meus pares Isabel i Joaquim
per la seva enorme paciència i dedicació

La imaginació és més important que el coneixement

Albert Einstein

*One night thunder cracked
And she backed outside her windowsill
Dreamed I was flying high above the trees, over the hills
Looked down into the house of Mary
Terrible tunnel, newspaper-covered walls
And Mary rising above it all*

*Crazy Mary, Victoria Williams
Singer-songwriter and Multiple Sclerosis Patient*

AGRAÏMENTS - ACKNOWLEDGMENTS

Tot té un principi i un final. Ara toca el final d'una etapa. I és temps de recordar qui ha estat al teu costat en tot aquests anys de dedicació a la investigació.

En primer lloc he d'agrair molt especialment al Dr. Juan Hidalgo, per tothom Juanma, que em deixès participar en el seu grup de treball així com el seu encomanador esperit investigador sense el qual a vegades ens veuríem enfonsats. Ell ha sigut el "jefe" en aquesta història, en tot aquest llarg camí i sempre ha sigut un llibre obert per mi, mostrant-me tots els secrets del laboratori i la investigació.

En segon lloc vull mostrar el meu agraïment a tots els que amb el temps han anat passant per la Unitat de Fisiologia Animal i han deixat la seva empremta en mi. Així, vull donar les gràcies a tot el personal docent especialment al Dr. Lluís Tort, quelcom més que un professor i al Dr. Antonio Armario, l'home de les piles de papers i separates però amb les idees molt clares, sobretot en les discussions científiques i humanes.

Moltes gràcies a qui formen el personal de suport de la Unitat: Concha i Adela, les senyores de la neteja, Olga, la supersecretària i una gran amiga, en Marc, el laborant de peixos, un defensa en qui confiar en els partits de futbol dels dimarts i divendres, i en Josep, Pep per tothom, amic i company d'escalada i de muntanya, home de seny i de consells.

I no m'oblido de vosaltres, els matxaques i no tan matxaques del laboratori. Sou els millors i la ciència no us agrairà mai el vostre esforç. Espero no descuidar-me de ningú:

Gràcies a tots els components que han format el meu grup de treball, Eva (la hippie), Tere (la de Girona), Javier (el de l'Espanyol), Imma i Raquel (les noies de la Tere), Mercè (la mare), Maite (la meva primera alumna) i Amalia (amant de la lectura). Gràcies a tots els components d'ara i d'abans del grup del Dr. Armario pel seu companyerisme i les bones estones, Octavi (el mestre, glarr), Rosa (fiuuu), Paqui (amant dels animals), Silvina (que bueno que viniste), Arantxa (la atleta), Pilar (la de Campdevàrol), Astrid (la estimada dels Deus), Miquel (el pelao), Quim (gran ex-company de despatx), Xavi i Felip (els de les cànnules), Àlex (el del bàsket), Paco (el psicòleg), Abdel (el del CRF) i Lluís (tot un Pare). Al grup de peixos també vull agrair el seu sentit del treball i de l'amistat, Jordi Altimiras (l'altre mestre, manites per tot) i Sandra, Eladi (el de les peses) i Bea, Abbas (sempre al ordinador), Joan (el de les tortuges), Pep Rotllant (el de St. Hilari), Manel Feliu (el informàtic), Oriol Sunyer (l'americà), Lluís Rovira (el de Girona), Lluís Cubero (el Màquina), Eulàlia (la del museu), Maria Rosa (la veïna de la meva amiga), Anna Sola (la de Terrassa), Anna Llach (la del tatoo) i al seu pare de la empresa Servei Color per la digitalització de dispositives de fluorescència de forma desinteressada, Mila (la noia Swatch), Leif (el danès), Pedro Pablo (el noi d'Extremadura), Dr. Balasch i Dra. Rosa Fios.

Evidentment altre gent de la Universitat Autònoma mereixen el meu agraïment, com ara el Dr. Jaume Farrès per la seva ajuda quan l'he necessitat així com als companys del Departament de Bioquímica, Imma, Susanna, Chari, Bernat i Salva, el supertècnic del Servei d'Imatges. Tanmateix vull agrair el seu ajut i recolzament als companys del Departament de Neuroquímica del IBF, a la Dra. García, Marian, Luís, i Anna. Moltes gràcies també a tots els companys del Departament de Biologia Cel·lular, que tan bé m'han tractat sempre que els he necessitat, Maica (molt més que la Secretària del Macro), Paqui, Lúdia, Ester, Tomás, David, Mercè, Emma, Elena, Marc, Leo, Fani, Dolors, Josep Santaló i Dr. Josep Egozcue. Agrair també als companys del Departament de Citologia el seu recolzament, Lluís i Jacques especialment, l'Albert i altres companys del Departament de Microbiologia pel seu ajut amb la molecular així com a les becàries de Can Ruti del Departament d'Immunologia, Mireia, Marta, Mercè, Cesca i Sònia i naturament el Dr. Pujol-Borrell. I per últim vull agrair tot l'esforç i dedicació del personal del Servei d'Estabulari, en especial en Jordi Cantó i la secretària Glòria Gordillo.

Gràcies a Beatriz Romero, Daria Rebollo i el Dr. Jesús Santamaría del Centro de Investigaciones Energéticas Medioambientales y tecnológicas de Madrid pels marcatges radiactius realitzats per nosaltres de la MT.

També vull agrair a la Dra. Arbonès la cessió del seu ratolí IFN- γ R^{-/-}, amb el qual s'ha realitzat part d'aquesta tesi.

I am gratefully appreciated to Dr. Horst Bluethmann from Hoffmann-La Roche, Basel, Switzerland (Department of Biology, Pharmaceutical Research Gene Technology) for the gift of the IL-6^{-/-} mice to realize part of this work.

Thank you very much to Dr. Iain L. Campbell from Scripps Research Institute of La Jolla, USA (Department of Neuropharmacology) for the gift of GFAP-IL6 samples and his help in this work.

My acknowledgment to the Dr. Peter Kille from the University of Wales (College of Cardiff, School of Molecular and Medical Biosciences, Departament de Biochemistry) for the unforgettable three months in Cardiff. Thank-you very much to all the colleagues of the lab, Gayle, Stephen, Sam, Peter, Paul, Rachel, Tim, George and Professor J. Kay.

Gràcies a tota la gent amb la qual he compartit grans estones al SAF, ja sigui jugant a futbol, squash, badminton, bàsquet, al gimnàs i sobretot escalant. Han estat aquestes estones les que et fan agafar més energies per continuar.

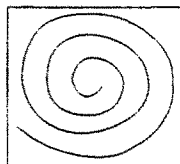
També vull agrair a tota la gent del Club Muntanyenc Sant Cugat el seu recolzament, tant a la muntanya com a la vella seu de la Plaça Barcelona. Tots plegats trebalem per la nostra passió, la muntanya.

I es clar, gràcies als meus amics per aguantar-me, ja que per culpa de la feina els he dit sovint no a moltes coses: Guille i Conchi (els esquiadors), Naty (la cantant), Migue (el trotamón), Juani (la germana), Toni (el d'immuno), David (el individu), Dani (el del tennis), Jordi (l'informàtic), Marta, Andreu, Carme i molts d'altres...

Moltes gràcies a totes les persones vinculades amb mi des de que vaig nèixer, allà en el llunyà Xile, i que molts anys després segueixen interessant-se per mi. En especial vull agrair a l'Ignasi Pujades el seu recolzament en la correcció de la llengua (ell sempre pensava que jo estudiava el semen dels crancs..!), la Monsterrat Vilaseca, en Lluís Portabella, la família Farràs al complet, la família Passalacqua repartida entre Chuquicamata (el meu poble!), Santiago i Pucón, i a tots els que van estar en aquella època a Xile.

Per fi donar gràcies a la meva família, tiets i cosins i especialment a les meves cosines Eli i Cristina, que continuen creixent. I sobretot dedico aquesta Tesi i aquests anys de treball als meus pares que tant estimo...

In Memoriam of Vicente Martín... el més gran ecologista que he conegut mai.



La vida es un sueño

Sumari

SUMARI

Aquesta Tesi ha estat estructurada en forma de recull de treballs i té el següent esquema:

SUMARI	1
INTRODUCCIÓ	5
1. Metal·lotionèines	5
1.1. Característiques, estructura i localització.....	5
1.1.1. Característiques.....	5
1.1.2. Estructura.....	5
Seqüència primària.....	5
Estructura (unió amb metalls).....	7
Contingut metàl·lic i propietats.....	9
1.1.3. Localització.....	10
Distribució i diversitat.....	10
2. Regulació	12
2.1. Gens.....	12
2.1.1. Organització. Introns i exons.....	14
2.1.2. Replicació i amplifcació.....	15
2.1.3. Regulació transcripcional.....	16
Promotor.....	16
Metilació.....	20
2.1.4. Regulació post-transcripcional.....	21
2.1.5. Regulació traduccional.....	22
2.1.6. Regulació post-traduccional.....	23
Estabilitat proteica i degradació.....	23
2.2. Inductors.....	24
2.2.1. Metalls.....	25
2.2.2. Hormones.....	26
Glucocorticoides.....	27
Altres hormones.....	28
2.2.3. Estrès.....	29
2.2.4. Endotoxines bacterianes.....	31
2.2.5. Citocines.....	32
Interleucina-1 (IL-1).....	35
Interleucina-6 (IL-6).....	37
Interferó (IFN).....	40
Factor de necrosi tumoral (TNF).....	42
2.2.6. Altres inductors.....	45
2.3. Interaccions entre inductors en situacions d'estrès i d'inflamació.....	47
3. Funcions	48
3.1. Homeòstasi del Zn i del Cu.....	48
3.2. Detoxificació de metalls pesants.....	50
3.3. Reservoiri de cisteïnes.....	51
3.4. Antioxidant.....	51
3.5. MT-III i MTs cerebrals.....	52
3.6. MT-IV.....	55
OBJECTIUS	57

TREBALLS	59
Treball 1	59
Hernández, J., Giralt, M., Belloso, E., Rebollo, D. V., Romero, B. and Hidalgo, J. (1996). Interactions between metallothionein inducers in rat liver and primary cultures of rat hepatocytes. <i>Chemico-Biological Interactions</i> , 100: 27-40.	
Treball 2	73
Belloso, E., Hernández, J., Giralt, M., Kille, P. and Hidalgo, J. (1996). Effect of stress on mouse and rat brain metallothionein I and III mRNA levels. <i>Neuroendocrinology</i> , 64: 430-439.	
Treball 3	83
Hernández, J., Belloso, E., Rebollo, D. V., Romero, B. and Hidalgo, J. Glucocorticoids mediate mouse liver metallothionein response to stress. <i>Manuscrit.</i>	
Treball 4	105
Hernández, J., Carrasco, J., Arbonés, M. and Hidalgo, J. (1997). IFN- γ R ^{-/-} mice show an enhanced liver and brain metallothionein-I+II response to endotoxin but not to immobilization stress. <i>J. End. Res.</i> 4 (5): 363-370.	
Treball 5	113
Hernández, J., Carrasco, J., Bluethmann, H. and Hidalgo, J. IL-6 and TNF receptor 1 deficient mice reveal essential physiological roles of IL-6 and TNF- α in liver metallothionein regulation. <i>Manuscrit.</i>	
Treball 6	139
Hernández, J., Bluethmann, H. and Hidalgo, J. Physiological role of IL-6 in brain metallothionein regulation in stress situations using a IL-6 deficient mice. <i>Manuscrit.</i>	
Treball 7	153
Hernández, J., Molinero, A., Campbell, I. L. and Hidalgo, J. (1997). Transgenic expression of interleukin 6 in the central nervous system regulates brain metallothionein-I and -III expression in mice. <i>Mol. Brain Res.</i> 48:125-131.	
Treball 8	161
Hernández, J. and Hidalgo, J. (1998). Endotoxin and intracerebroventricular injection of IL-1 and IL-6 induce rat brain metallothionein-I and -II. <i>Neurochem. Int.</i> En Premsa.	

Anex 1	167
Role of zinc, dexamethasone and IL-6 regulating metallothionein -I and -II in primary cultured astrocytes and neurons of mouse.	
DISCUSSIÓ	177
CONCLUSIONS	187
REFERÈNCIES	189

Portada: Tinció amb fluorescència que mostra la inducció de la MT(I+II) per Zn+Dex en cultiu primari de neurones de ratolí.

ABREVIACIONS UTILITZADES

aa: Aminoàcid
 AABS: Lloc d'unió de l'activador A
 ACTH: Hormona adrenocorticotròpica
 AD: Enfermetat d'Alzheimer
 ADX: Adrenalectomia
 AP-1: Factor de transcripció *trans* que s'uneix a BLE 1
 AP-2: Factor de transcripció *trans* que s'uneix a BLE 2
 ARE: Element *cis* de resposta antioxidant
 bp: Parell de bases de DNA
 Cd: Cadmi
 cDNA: DNA complementari codificant
 CHO: Cèl·lules ovàriques de hámster
 CORT: Corticosterona
 cpm: contes per minut
 Dex: Dexametasona
 End: Endotoxina o lipopolisacàrid (LPS)
 GFAP: Proteïna àcida fibrilar glial
 GIF: *Growth Inhibitory Factor* o MT-III
 GREs: Elements de resposta a glucocorticoides (*Glucocorticoid Regulatory Elements*)
 i.c.v.: Injecció intracerebroventricular
 KDa: KDaltons. Mesura pes molecular
 Knock-out: Ratolí transgènic amb una mutació nul·la en un gen
 hgcs: Seqüències comuns humanes gfa
 hMT: MT humana
 IL-1: Interleucina-1
 IL-6: Interleucina-6
 IFN- γ : Interferó- γ
 i.p.: Injecció intraperitoneal
 IRE: Element *cis* de resposta a l'interferó
 LPS: Endotoxina bacteriana
 MLTF: Factor *trans* de transcripció
 mMT: MT de ratolí
 MREs: Elements de resposta als metalls (*Metal Response Elements*)
 mRNA: RNA missatger
 MT: Metal·lotioneïna.
 MT-I: Metal·lotioneïna-I
 MT-II: Metal·lotioneïna-II
 MT-III: Metal·lotioneïna-III o GIF
 MT-IV: Metal·lotioneïna-IV
 NF-IL6: Element de resposta al factor nuclear de IL-6
 OVLT: Organ vascular de la làmina terminal
 RIA: Radioimmunoassaig
 rMT: MT de rata
 RU486: Bloquejant del receptor de glucocorticoides i de progesterona
 s.c.: injecció subcutànea
 SHAM: Simulació d'adrenalectomia
 Sp1: Factor de transcripció *trans*
 TNF- α : Factor de necrosi tumoral- α
 Zn: Zinc

Nota: En les abreviacions s'ha emprat la nomenclatura anglesa de la paraula per tal de mantenir el mateix criteri que s'utilitza habitualment en les publicacions internacionals.

Nomenclatura dels aa

A	Ala	Alanina	M	Met	Metionina
C	Cys	Cisteïna	N	Asn	Asparragina
D	Asp	Àcid aspàrtic	P	Pro	Prolina
E	Glu	Àcid glutàmic	Q	Gln	Glutamina
G	Gly	Glicina	R	Arg	Arginina
I	Ile	Isoleucina	S	Ser	Serina
K	Lys	Lisina	T	Thr	Treonina
			V	Val	Valina

Nomenclatura dels aa

A	Ala	Alanina
C	Cys	Cisteïna
D	Asp	Àcid aspàrtic
E	Glu	Àcid glutàmic
G	Gly	Glicina
I	Ile	Isoleucina
K	Lys	Lisina
M	Met	Metionina
N	Asn	Asparragina
P	Pro	Prolina
Q	Gln	Glutamina
R	Arg	Arginina
S	Ser	Serina
T	Thr	Treonina
V	Val	Valina

&

Regulació de les metal·lotioneïnes hepàtiques i cerebrals

Joaquim Hernández Martín

Bellaterra,
2 d'Abril de 1998

&

No podràs vijar por el camino
hasta que tú mismo seas el
camino.

Gantana Buddha

ABREVIACIONS UTILITZADES

aa: Aminoàcid
AABS: Lloc d'unió de l'activador A
ACTH: Hormona adrenocorticotròpica
AD: Enfermetat d'Alzheimer
ADX: Adrenalectomia
AP-1: Factor de transcripció *trans* que s'uneix a BLE 1
AP-2: Factor de transcripció *trans* que s'uneix a BLE 2
ARE: Element *cis* de resposta antioxidant
bp: Parell de bases de DNA
Cd: Cadmi
cDNA: DNA complementari codificant
CHO: Cèl.lules ovàriques de hamster
CORT: Corticosterona
cpm: contes per minut
Dex: Dexametasona
End: Endotoxina o lipopolisacàrid (LPS)
GFAP: Proteïna àcida fibrilar glial
GIF: *Growth Inhibitory Factor* o MT-III
GREs: Elements de resposta a glucocorticoides (*Glucocorticoid Regulatory Elements*)
i.c.v.: Injecció intracerebroventricular
KDa: KDaltons. Mesura pes molecular
Knock-out: Ratolí transgènic amb una mutació nul·la en un gen
hgcs: Seqüències comuns humanes *gfa*
hMT: MT humana
IL-1: Interleucina-1
IL-6: Interleucina-6
IFN- γ : Interferó- γ
i.p.: Injecció intraperitoneal
IRE: Element *cis* de resposta a l'interferó
LPS: Endotoxina bacteriana
MLTF: Factor *trans* de transcripció
mMT: MT de ratolí
MREs: Elements de resposta als metalls (*Metal Response Elements*)
mRNA: RNA missatger
MT: Metal·lotioneïna.
MT-I: Metal·lotioneïna-I
MT-II: Metal·lotioneïna-II
MT-III: Metal·lotioneïna-III o GIF
MT-IV: Metal·lotioneïna-IV
NF-IL6: Element de resposta al factor nuclear de IL-6
OVLT: Organ vascular de la làmina terminal
RIA: Radioimmunoassaig
rMT: MT de rata
RU486: Bloquejant del receptor dels glucocorticoides i de la progesterona
s.c.: injecció subcutànea
SHAM: Simulació d'adrenalectomia
Sp1: Factor de transcripció *trans*
TNF- α : Factor de necrosi tumoral- α
Zn: Zinc

Introducció

INTRODUCCIÓ

1. Metal·lotioneïnes

1.1. Característiques, estructura i localització

1.1.1. Característiques

Les metal·lotioneïnes (MTs) són una família de proteïnes entre 61 i 68 aminoàcids (aa). Tenen com a principal característica lligar metalls pesants com el Cd^{2+} , Zn^{2+} i Cu^+ , i tenir una quantitat elevada de residus de cisteïna (Cys) (30%), mentre que els aa aromàtics són absents en la seva composició (Kägi and Kojima, 1987b).

En el ratolí (animal utilitzat en el present treball) trobem fins a 4 isoformes diferents, anomenades MT-I, MT-II, MT-III i MT-IV. Les MT-I i MT-II han estat estudiades durant diverses dècades des del descobriment de la primera MT l'any 1957 (Margoshes and Vallee, 1957), mentre que la MT-III i la MT-IV han estat descobertes molt recentment (Uchida *et al.*, 1991; Palmiter *et al.*, 1992; Quaife *et al.*, 1994). Les MTs són presents a tota l'escala filogenètica com veurem més endavant.

1.1.2. Estructura

En aquest apartat ens referirem principalment a l'estructura de les MT-I i MT-II, ja que són les més conegudes. A cada apartat farem també referència a la de la MT-III i MT-IV, isoformes amb una estructura primària clarament diferenciada de les dues primeres.

Seqüència primària

Els estudis de la seqüència primària ens mostren una alta proporció de seqüències Cys-Cys, Cys-x-Cys o Cys-x-y-Cys (on x i y són qualsevol altre aa). Les Cys solen estar flanquejades per aa bàsics, com la Lys i l'Arg (Kojima *et al.*, 1976). Les seqüències de les MT-I, MT-II, MT-III i MT-IV de ratolí i les MT-I, MT-II i MT-III de rata es troben representades a la figura 1, on es pot observar 3 seqüències de

Cys-Cys, 7 seqüències del tipus Cys-x-Cys i 1 del tipus Cys-x-x-Cys. Aquestes seqüències s'han conservat considerablement al llarg de la evolució perquè són les que permeten la complexació dels metalls a la proteïna. A la figura 1 es mostren les Cys ombrejades.

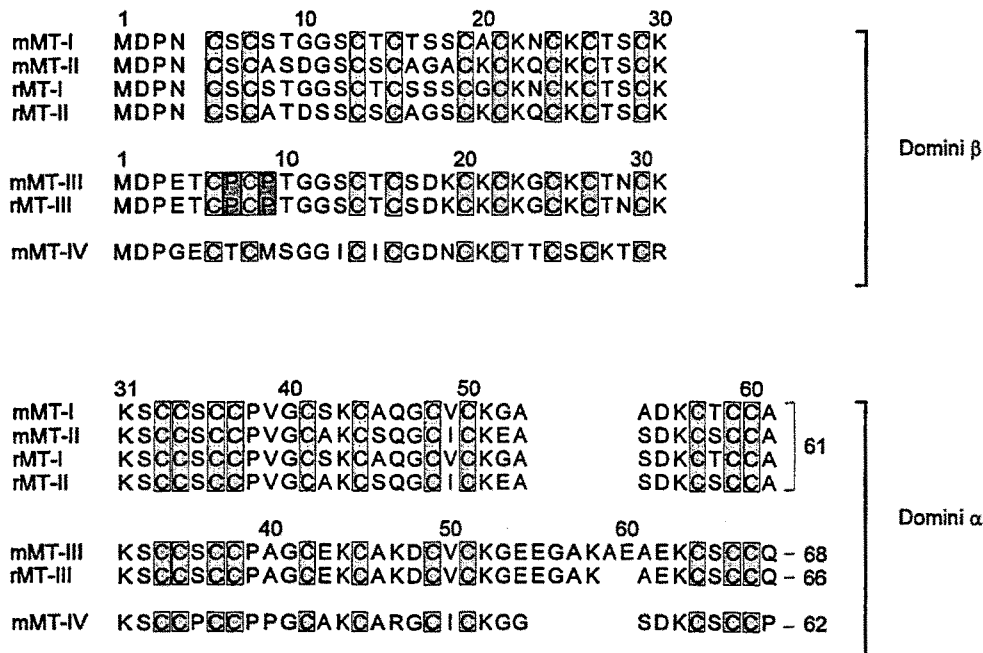


Figura 1. Seqüències primàries de les 4 isoformes presents en ratolins, MT-I, MT-II, MT-III i MT-IV (indicades amb una m), comparades amb les MT-I, MT-II i MT-III de rata (indicades amb una r). La cadena peptídica s'ha dividit en dos fragments, del aa 1 al 30 i del 31 fins el final, que corresponen als dos dominis de la proteïna, β i α , respectivament. Al final de cada proteïna està indicat el número total d'aa.

Com s'ha comentat en l'anterior apartat, a la composició d'aa predomina la conservació de Cys. En els mamífers trobem 20 Cys invariables, que representen aproximadament un 30% dels aa de la seqüència. No hi ha cap aa aromàtic i tampoc es troben His en la cadena polipeptídica. En totes les isoformes dels vertebrats és usual trobar a l'extrem N-terminal Met com primer aa.

Cal destacar la gran homologia de seqüència que presenten les MT-I, MT-II i MT-III en la part central de la proteïna, des del residu 25 fins al 43 aprox. Una altra part homòloga, més curta, és l'extrem N-terminal de les MT-I i MT-II, les quals tenen una gran homologia entre les posicions 1 i 8. Contràriament, la part més heterogènea entre les isoformes MT-I i MT-II de mamífers és el segment comprès entre les

posicions 8 i 11, que coincideix amb la regió d'interconnexió entre els dos primers exons (Kägi and Kojima, 1987a).

La MT-III i la MT-IV difereixen significativament de les MT-I i MT-II. Així, la MT-IV de ratolí presenta una inserció en la posició 5 de la proteïna. Aquesta inserció correspon a un Glu. La MT-IV d'humà i de ratolí només presenten 4 aa diferents a la seqüència (Quaife *et al.*, 1994).

Respecte a la MT-III, aquesta isoforma presenta més variacions en la seva seqüència. Per una banda presenta una inserció en la mateixa posició 5 que la MT-IV, essent en aquest cas una Thr (Palmiter *et al.*, 1992). Després, a l'extrem C-terminal trobem una inserció de 4 ó 6 aa segons l'espècie (Palmiter *et al.*, 1992; Tsuji *et al.*, 1992; Kobayashi *et al.*, 1993) (figura 1) que, com veurem més endavant, confereix una distribució espacial diferenciada. Però de fet, el canvi més important està localitzat, com veurem més endavant, en la estructura terciària i, a l'apartat de les funcions de la MT-III, en la presència de dues Pro en la posició 7 i 9 de la MT-III, com s'ha indicat a la figura 1 en sombrejat més fosc. La homologia entre la MT-III humana, la de rata i la de ratolí és al voltant del 70-80% en els seus aa.

La MT-I i MT-II presenten càrrega negativa a pH neutre i el seu pH-isoelectric és proper a 4 (Nordberg *et al.*, 1975). La presència de residus de glutamat a la seqüència de la MT-III la converteix en una proteïna àcida (la càrrega neta de la apoproteïna (la proteïna sense metall) es situa en -4) (Kille *et al.*, 1994).

Estructura (unió amb metalls)

Els estudis de la estructura secundària realitzats gràcies a la ressonància magnètica nuclear (Braun *et al.*, 1986), l'espectroscopia d'infraroig (Pande *et al.*, 1986) i difracció de raigs X (Furey *et al.*, 1986) van concloure que hi predominen els girs β amb algunes hèlix α i uns segments de llàmines β .

La complexació del metall confereix una conformació transicional a la proteïna consistent en girs β i segments estructurats a l'atzar (Pande *et al.*, 1986) per acabar de definir-se la estructura. Aquesta complexació del metall dóna lloc a la formació de 2 dominis ben definits, anomenats domini α i β . A cada domini els metalls es troben localitzats en un *cluster* o agrupació.

El domini β correspon a l'extrem N-terminal i compren els aa 1-30. Conté 9 Cys i pot unir fins a 3 àtoms de Zn^{2+} o Cd^{2+} o fins 6 àtoms de Cu^+ . El domini α correspon a l'extrem C-terminal i conté els aa 31-60 de la cadena polipeptídica. Conté 11 Cys i

pot unir 4 àtoms de ions metàl·lics bivalents (Zn^{2+} o Cd^{2+}) o 6 àtoms de ions metàl·lics monovalents (Cu^+).

El procés de formació dels *clusters* comença amb la unió dels àtoms metàl·lics en el *cluster* del domini α i continuaria amb la conformació del domini β (Nielson and Winge, 1984; Stillman *et al.*, 1987). En un primer model estequiomètric, veiem que per cada mol de MT, aquesta uneix fins a 7 mols de metall bivalent com el Zn o el Cd. En aquest cas, la coordinació geomètrica que presenta la MT segueix una simetria tetrahèdrica, i les unions comencen primer al domini α amb 4 àtoms metàl·lics.

En una Cu-MT el procés de formació començaria al domini β per acabar al domini α (Nielson and Winge, 1984; Stillman *et al.*, 1987). En aquest model cada mol de MT pot unir fins a 12 mols de metall monovalent com el Cu o Ag. En aquest cas, la coordinació geomètrica que presenta la MT segueix una geometria trigonal, on 6 àtoms metàl·lics s'uneixen a cada *cluster*, i la formació dels *clusters* comença al domini β (Otvos and Armitage, 1980).

D'aquesta forma, la MT enllaça en la seva estructura metalls pesants com Zn i/o Cu en condicions fisiològiques normals però també pot associar Cd (7 mols/mol MT), Fe (7 mols/mol MT), Hg (7 mols/mol MT), Pb (7 mols/mol MT), Ag (12 mols/mol MT), Au (12 mols/mol MT), Ni (7 mols/mol MT), i Co (7 mols/mol MT) en animals exposats a aquests metalls i/o *in vitro*.

La MT-III conserva perfectament els dos *clusters* d'unió amb metalls, a l'igual que la MT-IV (Pountney *et al.*, 1994; Quaife *et al.*, 1994; Winge *et al.*, 1994). Tanmateix existeixen probablement diferències en la MT-III respecte a les MT-I i MT-II com a conseqüència de les insercions d'aa a l'extrem N-terminal i C-terminal. Aquestes possibles conformacions són estudiades més endavant.

A la figura 2 està representat el model teòric de l'estructura terciària de dues MTs, la MT-II i la MT-III, per poder comparar les diferències existents en la seva estructura entre les MTs clàssiques (I i II) i la MT-III. En aquest model tridimensional es poden apreciar perfectament els dos *clusters* de metalls que són conservats a les dues isoformes. Els canvis de la seqüència primària que hem observat anteriorment es veuen reflexats en aquest model, a l'extrem N-terminal i al extrem C-terminal. S'ha postulat que els epítops antigènics de les MTs estarien localitzats en l'extrem N-terminal, format pels primers 6 aa, i possiblement al voltant de la regió rica en lisines (aa 20-25) (Winge and Garvey, 1983). Estudis posteriors han confirmat la idea de l'extrem N-terminal com la principal regió antigènica (Kay *et al.*, 1991; Kille *et*

al., 1992). Com veurem, aquesta regió sembla ser molt important en la funcionalitat de la MT-III degut a la seva diferent conformació.

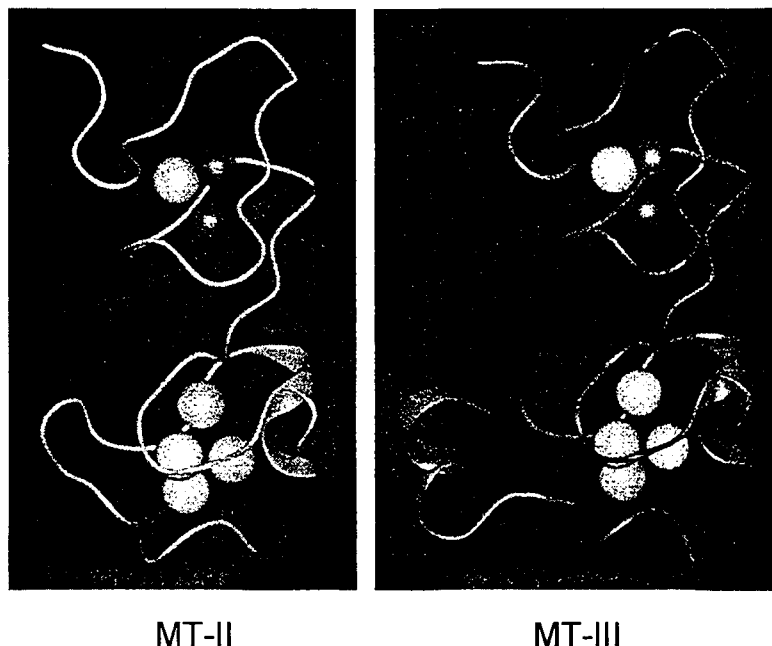


Figura 2. Models teòrics de l'estructura terciària de la MT-II i la MT-III. Cal destacar l'organització dels dos clusters on es troben els metalls, representats per les esferes. Les esferes més fosques corresponen al Zn i les més clares al Cd. Aquests 2 models són unes MTs Zn_2Cd_3 . Cal destacar el domini α (extrem C-terminal) amb 4 àtoms de metall i el domini β (extrem N-terminal) amb 3 àtoms de metall. Els dos trets diferencials més importants de la MT-III respecte a la MT-II són:

- 1). El doble gir a l'extrem C-terminal de la MT-III, on s'observa l'inserció dels 4-6 aminoàcids a la seqüència.
- 2). La possible configuració espacial de l'extrem N-terminal, on un aa més en la seqüència i dos substitucions d'aa li podrien conferir una disposició espacial diferent de les MT-I i -II. És aquí on resideix l'activitat de la MT-III (veure apartat de les funcions de les MTs).

Contingut metàl·lic i propietats

La afinitat per un o altre ió metàl·lic és específica de cada metall. L'ordre d'afinitat que podem establir és el següent: $Zn^{2+} < Pb^{2+} < Cd^{2+} < Cu^+, Ag^+, Hg^{2+}, Bi^{3+}$.

Així, el Cd per exemple presenta aproximadament 10.000 vegades més afinitat per unir-se a la cadena polipeptídica de la MT que el Zn (Kägi and Kojima, 1987b).

El contingut metàl·lic de les MTs en un organisme viu pot variar i poden produir-se substitucions, depenent de l'organisme, teixit i exposició als metalls. Així, la unió metàl·lica és reversible. *In vitro* podem observar la separació de metalls de la MT per exposició a un pH baix, resultant així la cadena polipeptídica sense metalls, donant lloc a la apoproteïna, anomenada tioneïna. El pH en el qual el 50% del metall està

dissociat de la proteïna es troba entre el pH 3.5 i 4.5 pel Zn, pH 2.5 i 3.5 pel Cd i pH per sota de 1 pel Cu (Rupp and Weser, 1979). L'apoproteïna és estable a baix pH però polimeritza gràcies a enllaços disulfurs quan s'ajusta a pH neutre sense metalls. Es pot reconstituir la conformació normal amb l'addició de metalls.

1.1.3. Localització

Les 4 isoformes tenen una localització diferencial segons la isoforma. Les MT-I i MT-II són presents a quasi tots els òrgans de mamífers, expressant-se de forma constitutiva sobretot en fetge, ronyó, intestí, pàncreas, estòmac, cor, múscul, pulmons, timus, gònades, cervell i placenta (Chen and Ganther, 1975; Waalkes and Klaassen, 1984; Heilmaier *et al.*, 1987). La MT-III és una isoforma bàsicament específica de cervell que ha estat recentment descoberta i que inicialment va ser anomenada *growth inhibitory factor* (GIF) (Uchida *et al.*, 1991; Palmiter *et al.*, 1992; Tsuji *et al.*, 1992; Erickson *et al.*, 1994). La MT-IV està present bàsicament a cèl.lules epitelials estratificades (Quaife *et al.*, 1994). Tanmateix, la MT-III i -IV poden expressar-se també en el decidium maternal (Liang *et al.*, 1996).

En cervell, la MT-I i MT-II ha estat localitzada tant en astròcits com en microglia i neurones, i és en els astròcits on hi ha més síntesi (Blaauwgeers *et al.*, 1994; Hidalgo *et al.*, 1994a; Vanguri, 1995). La MT-III s'ha vist que es localitza tant en astròcits com en neurones (Anezaki *et al.*, 1995; Belloso *et al.*, 1996; Kramer *et al.*, 1996a; Kramer *et al.*, 1996b).

Distribució i diversitat

Les MTs van ser descobertes per primera vegada en el ronyó del cavall (Margoshes and Vallee, 1957). S'han descobert posteriorment proteïnes similars en multitud d'organismes que abracen tota l'escala filogenètica. A la taula 1 trobem exemples d'organismes en els que s'han trobat MTs. Aquestes dades fan considerar la MT com una proteïna distribuïda de forma ubiqüa a la natura. Aquesta diversitat de MTs va originar-ne una classificació en tres grups per Fowler (Fowler *et al.*, 1987):

Tipus I: Inclou totes les proteïnes comparables a la MT descrita al ronyó del cavall, al voltant de 59-63 aa, amb la mateixa distribució de cisteïnes. Trobem en aquest grup les MTs de vertebrats.

Tipus II: Són proteïnes una mica més allunyades filogenèticament de les MTs de mamífers o de Tipus I, al voltant de 25-80 aa. Es troben en animals inferiors i fongs.

Tipus III: Són pèptids no proteics de curta cadena derivats de unitats de γ -glutamil-cisteïna o del glutatió. Es troben només en plantes.

Filogenia			Treball		
Procariotes			(Olafson <i>et al.</i> , 1979a) (Olafson <i>et al.</i> , 1988)		
Fongs			(Murasugi <i>et al.</i> , 1981) (Butt <i>et al.</i> , 1984a)		
Vegetals			(Evans <i>et al.</i> , 1990) (Tomney <i>et al.</i> , 1991)		
Animals	Invertebrats	Insectes	(Lastowski-Perry <i>et al.</i> , 1985)		
		Mol.luscs	(Howard and Nickless, 1977)		
		Crustacis	(Olafson <i>et al.</i> , 1979b)		
	Vertebrats	Peixos		(Kito <i>et al.</i> , 1982) (Ley <i>et al.</i> , 1983) (Hidalgo <i>et al.</i> , 1985) (Kille <i>et al.</i> , 1991)	
			Amfibis	(Mehra <i>et al.</i> , 1980) (Suzuki and Tanaka, 1983)	
			Rèptils	(Yamamura and Suzuki, 1984) (Fios <i>et al.</i> , 1986)	
		Aus		(Weser <i>et al.</i> , 1973) (Andrews <i>et al.</i> , 1996)	
		Mamífers	Ratolí		(Nordberg <i>et al.</i> , 1975)
			Rata		(Wisniewska <i>et al.</i> , 1970)
			Conill		(Nordberg <i>et al.</i> , 1972)
			Porc		(Webb and Daniel, 1975) (Bremner and Young, 1976a)
			Cabra		(Tanabe, 1980)
			Ovella		(Bremner and Young, 1977)
			Gos		(Amacher and Ewing, 1975)
			Simi		(Kimura <i>et al.</i> , 1979)
Home			(Pulido <i>et al.</i> , 1966) (Uchida <i>et al.</i> , 1991) (Quaife <i>et al.</i> , 1994)		

Taula 1. Exemples d'organismes en els quals s'han trobat MTs. A l'esquerra es troba l'escala filogenètica i a la dreta són destacats els primers treballs on es descriuen l'aïllament de les MTs.

La majoria de vertebrats presenten varies isoformes de la MT (Tipus I) i són aquestes les que s'han estudiat en el present treball. Existeix una certa heterogeneïtat en el número d'isoformes segons les espècies. Així, per exemple, es troben a la rata o al ratolí una MT-I i una MT-II, mentre que en humans, primats i ovelles es troben diverses MT-I, anomenades MT-Ia, MT-Ib, etc. En contrast, altres espècies com l'ànec o la gallina presenten una única isoforma de MT.

El nom originari de MT-I i MT-II ve donat per la seva mobilitat en columnes de bescanvi iònic.

2. Regulació

2.1. Gens de les MTs

Els gens que codifiquen les metal·lotioneïnes han estat força estudiats en els últims anys en part atès el gran desenvolupament de les tècniques moleculars. Així, el DNA complementari (cDNA) de diverses espècies ha pogut ser clonat i utilitzat per molts estudis, tant per comprendre els mecanismes moleculars del funcionament del gen com per estudiar l'expressió del gen i els seus productes, com el mRNA. Ens centrarem principalment en els estudis realitzats en mamífers.

A la taula 2 són destacats els principals gens de MTs clonats en diverses espècies de la filogènia. Entre els mamífers trobem una gran homologia entre les regions codificants al igual que succeeix amb l'estructura proteica. A més dels gens, existeixen en varies espècies pseudogens o gens no funcionals els quals també han estat clonats i estudiats. Aquests gens (identificats amb la sigla ψ) han estat localitzats en diverses espècies com ho mostra també la taula 2. Cal observar que les famílies gèniques de primats i bovins són molt més complexes que les de rosegadors i aus.

Espècie	Gen clonat	Treball	Localització genòmica	Gen funcional
Home	MT-Ia	(Richards <i>et al.</i> , 1984)	Cromosoma 16	Sí
	MT-Ib	(Heguy <i>et al.</i> , 1986)	Cromosoma 16	Sí
	ψMT-Ic	(Richards <i>et al.</i> , 1984)	Cromosoma 16	Pseudogen
	ψMT-Ib	(Richards <i>et al.</i> , 1984)	Cromosoma 16	Pseudogen
	MT-Ie	(Schmidt <i>et al.</i> , 1985)	Cromosoma 16	Sí
	MT-If	(Schmidt <i>et al.</i> , 1985)	Cromosoma 16	Sí
	MT-Ig	(Foster <i>et al.</i> , 1988)	Cromosoma 16	Sí
	MT-Ih	(Stennard <i>et al.</i> , 1994)	Cromosoma 16	Sí
	ψMT-Ii	(Stennard <i>et al.</i> , 1994)	Cromosoma 16	Pseudogen
	ψMT-Ij	(Stennard <i>et al.</i> , 1994)	Cromosoma 16	Pseudogen
	ψMT-Ik	(Stennard <i>et al.</i> , 1994)	Cromosoma 16	Pseudogen
	ψMT-Il	(Stennard <i>et al.</i> , 1994)	Cromosoma 16	Pseudogen
	MT-Ix	(Stennard <i>et al.</i> , 1994)	Cromosoma 16	Sí
	MT-IIa	(Karin and Richards, 1982)	Cromosoma 16	Sí
	ψMT-IIb	(Karin and Richards, 1982)	Cromosoma 16	Pseudogen
	MT-III	(Tsuji <i>et al.</i> , 1992)	Cromosoma 16	Sí
	MT-IV	(Quaife <i>et al.</i> , 1994)	Cromosoma 16	Sí
Ratolí	MT-I	(Dumam <i>et al.</i> , 1980)	Cromosoma 8	Sí
	MT-II	(Searle <i>et al.</i> , 1984)	Cromosoma 8	Sí
	MT-III	(Palmiter <i>et al.</i> , 1992)	Cromosoma 8	Sí
	MT-IV	(Quaife <i>et al.</i> , 1994)	Cromosoma 8	Sí
Rata	MT-I	(Andersen <i>et al.</i> , 1983)	Cromosoma 19	Sí
	ψMT-Ia	(Andersen <i>et al.</i> , 1986)		Pseudogen
	ψMT-Ib	(Andersen <i>et al.</i> , 1986)		Pseudogen
	ψMT-Ic	(Andersen <i>et al.</i> , 1986)		Pseudogen
Hàmster	MT-II	(Saijoh <i>et al.</i> , 1989)	Cromosoma 19	Sí
	MT-III	(Kobayashi <i>et al.</i> , 1993)		Sí
	MT-I	(Griffith <i>et al.</i> , 1983)	Cromosoma 3	Sí
Conill	MT-II	(Griffith <i>et al.</i> , 1983)	Cromosoma 3	Sí
	MT-I	(Tam <i>et al.</i> , 1988a)		Sí
Ovella	ψMT-II	(Tam <i>et al.</i> , 1988b)		Pseudogen
	MT-Ia	(Peterson <i>et al.</i> , 1984)		Sí
	MT-Ib	(Peterson and Mercer, 1988)		Sí
	MT-Ic	(Peterson and Mercer, 1988)		Sí
	ψMT-I	(Peterson <i>et al.</i> , 1988)		Pseudogen
Porc	MT-II	(Peterson and Mercer, 1988)	Cromosoma 18	Sí
	MT-III	(Bogumil <i>et al.</i> , 1996)		Sí
	MT-III	(Chen <i>et al.</i> , 1996)		Sí
Pollastre	MT	(Fernando and Andrews, 1989)		Sí
Ànec	MT	(Lee <i>et al.</i> , 1996)		Sí
Truita	MT-A	(Kille <i>et al.</i> , 1991)		Sí
	MT-B	(Zafarullah <i>et al.</i> , 1988)		Sí
Lluç	MT	(Kille <i>et al.</i> , 1991)		Sí
Peixos de colors	MT	(Chan, 1994)		Sí
Eriçó de mar	MT	(Nemer <i>et al.</i> , 1984)		Sí
Nemàtodes	MT-I	(Imagawa <i>et al.</i> , 1990)	Cromosoma V	Sí
	MT-II	(Imagawa <i>et al.</i> , 1990)	Cromosoma V	Sí
Mosca	MT	(Lastowski-Perry <i>et al.</i> , 1985)	Cromosoma III	Sí
Lievadures (<i>Sacc.</i>)	MT	(Butt <i>et al.</i> , 1984b)	Cromosoma VIII	Sí
<i>Neurospora</i>	MT	(Munger <i>et al.</i> , 1985)	Cromosoma VI	Sí
Blat	MT	(Snowden and Gardner, 1993)		Sí
Blat de Moro	MT	(De Framond, 1991)		Sí
Arròs	MT-1	(Hsieh <i>et al.</i> , 1995)		Sí
	MT-2	(Hsieh <i>et al.</i> , 1996)		Sí
Tabac	MT	(Choi <i>et al.</i> , 1996)		Sí
Pèssol	MT-A	(Evans <i>et al.</i> , 1990)		Sí

Taula 2. Relació dels principals gens de les MTs clonats en les espècies més representatives. Es presenta l'espècie, el gen clonat, el treball on es mostra el gen per primera vegada, la seva localització genòmica coneguda i si es tracta d'un gen funcional o un pseudogen.

2.1.1. Organització, Introns i exons.

En eucariotes els gens de les MTs tenen una longitud de menys de 2 kilobases (Kb). La organització dels gens segueix en general una estructura tripartita conservada. Segueixen una estructura composta de 3 exons amb dos introns intercalats, tal com es mostra a la figura 3.

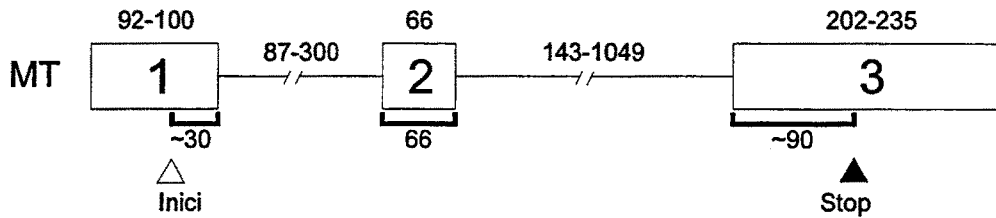


Figura 3. En aquesta figura es mostra una representació de la estructura del gen de la MT. Les mides dels exons (marcats com 1, 2 i 3) i introns són donades en parelles de bases de DNA i els intervals són aproximadament el rang que trobem a diferents espècies d'eucariotes superiors. El triangle blanc (\triangle) marca l'inici de transcripció del gen i el triangle negre (\blacktriangle) el codon de stop. Les parelles de bases indicades sota cada exon indiquen les bases codificants de cada un.

El primer exon codifica per a la regió 5' no transcrita i pels primers aa del domini β de la proteïna. El lloc d'interrupció del primer exon no és fixe, varia segons la espècie. El segon exon codifica per a la resta del domini β i la interrupció es dona sempre en la regió codificant d'un aa concret, una serina. Finalment, el tercer exon codifica el domini α i seqüències no transcrites 3'.

Els pseudogens descrits en la taula 2 presenten seqüències codificants però que no són transcrites i traduïdes a una proteïna funcional. Així, alguns pseudogens de la hMT-I presenten insertades seqüències repetides i mutacions que originen codons de terminació de transcripció (Varshney and Gedamu, 1984). Un pseudogen d'ovella presenta un únic exon (Peterson *et al.*, 1988).

Hi ha casos com el pollastre i l'ànec (veure taula 2) en que trobem un únic gen de la MT. En eucariotes superiors generalment trobem al menys 2 gens funcionals de la MT. Aquests gens solen trobar-se agrupats o units en un mateix cromosoma. Així, els de ratolí es troben en el cromosoma 8, estant el gen de la MT-II separat 6 kb del de la MT-I (Searle *et al.*, 1984). En humans els gens de les MTs es troben en un *locus* (lloc) bastant ampli en el braç q del cromosoma 16 (Sutherland *et al.*, 1987; Scherer *et al.*, 1989). La família gènica de la MT en ovella segueix el mateix patró que la dels humans. Els gens funcionals de la MT-II en aquest *locus* presenten una

sola còpia, mentre que diferents creuaments deuen haver originat múltiples gens de la MT-I.

2.1.2. Replicació i Amplificació

Els gens de les MTs es repliquen a l'inici de la fase S i la prolongació d'aquesta fase incrementa la seva replicació (Stallings *et al.*, 1986). La replicació és precedida d'un escurçament de la longitud dels nucleosomes en el gen de la MT (D'Anna and Tobey, 1989)

Un altre aspecte dels gens de la MT és la seva capacitat d'amplificació preferencial. Aquest fenomen ha estat observat *in vitro*. Així, cèl.lules de ratolí resistents al Cd mostren unes 10 vegades més còpies del gen de la MT-I (Beach and Palmiter, 1981; Mayo and Palmiter, 1982). A més, cèl.lules de hámster (cèl.lules CHO) resistents al Cd amplifiquen de forma coordinada el gen de la MT-I i la MT-II unes 20 vegades i les còpies amplificades són agrupades després d'una reorganització cromosomal (Crawford *et al.*, 1985). Tanmateix aquest fenomen es dona també en cèl.lules resistents al Cd i Cu en llevats (Welch *et al.*, 1989; Mehra *et al.*, 1990) e inclús en *Drosophila* (Maroni *et al.*, 1987). El que es desconeix és el mecanisme de regulació però aquest mecanisme d'amplificació és produït per poder incrementar el número de transcrits en resposta a un inductor encara que en alguns casos, com en cèl.lules de ratolí, l'amplificació implica una pèrdua d'inducció per glucocorticoides (Mayo and Palmiter, 1982).

2.1.3. Regulació transcripcional

L'expressió gènica és regulada generalment en varies etapes, a nivell de transcripció, post-transcripcional, traducció i post-traducció. Aquests nivells són els que a continuació s'expliquen.

La gran majoria de gens es troben regulats a nivell transcripcional i és en aquest nivell on hi ha hagut més estudis. L'activació dels gens de la MT com de quasi tots els gens del genoma es realitza a nivell del promotor i requereix de les seqüències *cis* i els factors *trans* que hi interaccionen. Un dels controls transcripcionals que també té lloc és la metilació de bases del DNA. A continuació estudiarem el promotor del gen de les MTs així com els factors que interaccionen amb ell i posteriorment la metilació.

Promotor

El promotor de les MTs és complex i ha estat estudiat per conèixer la regulació de les MTs i ha estat bastant utilitzat com eina en biologia molecular en la elaboració de construccions gèniques per crear transgènics.

El promotor conté múltiples seqüències específiques anomenades seqüències *cis* les quals estan involucrades en l'expressió del gen a l'interaccionar amb proteïnes reguladores (factors *trans*). A la figura 4 es mostra una representació esquemàtica de diferents promotors de rata, ratolí i home.

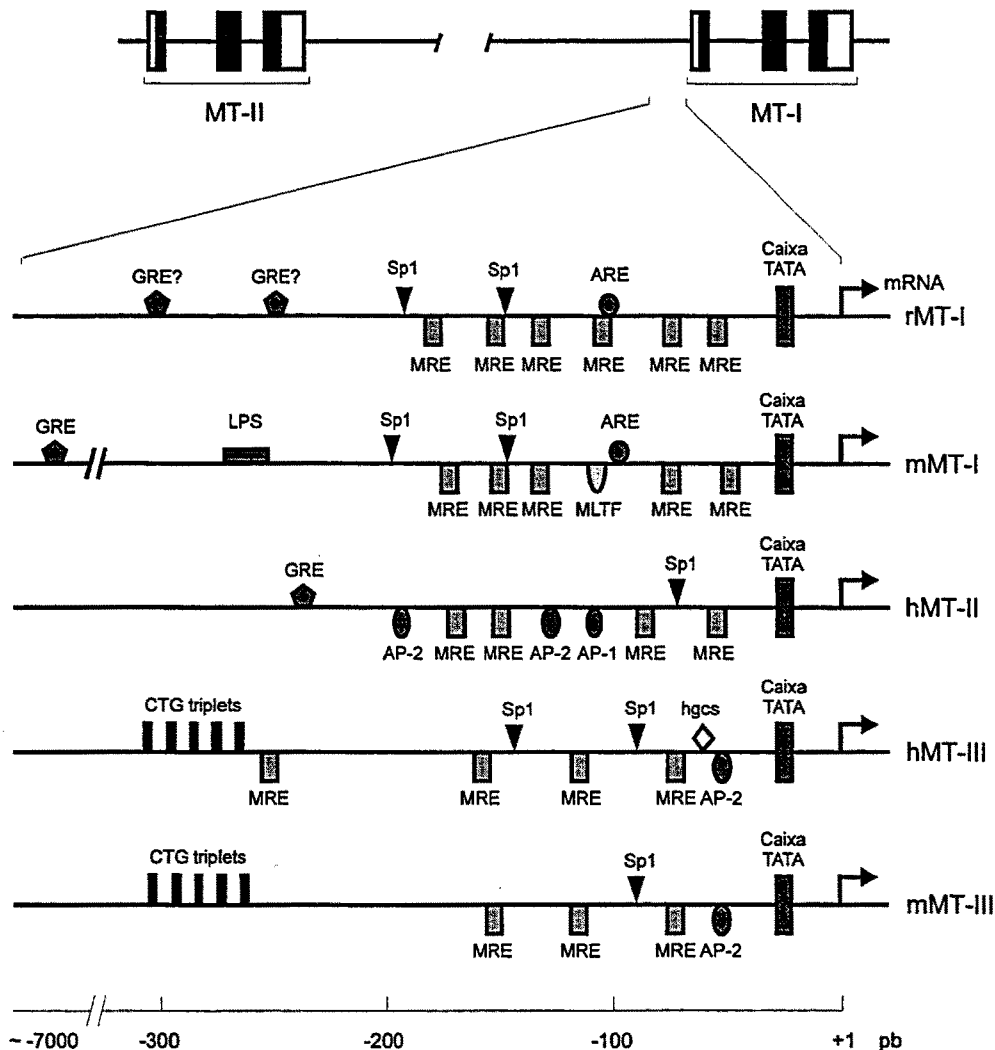


Figura 4. Representació esquemàtica dels promotors de diferents gens de MTs, mostrant l'organització general dels diferents elements reguladors dels gens i la disposició d'aquests respecte l'inici de transcripció i la caixa TATA.

Les seqüències *cis* i els factors *trans* varien segons el promotor encara que són sovint comuns. Així destaquem les següents:

- **MREs** (*metal response elements*). Els trobem en tots els promotors de la MT, tant en mamífers com en espècies inferiors. Els MREs consten de la següent seqüència, TGCRNCX (on R representa G o A, X representa G o C i N pot ser qualsevol base). Aquesta seqüència seria la central o el cor dels MREs (Stuart *et al.*, 1984; Stuart *et al.*, 1985). Podem trobar diverses còpies en un mateix promotor, les quals s'anomenen MREa, MREb, etc... Es caracteritzen per poder funcionar independentment de la seva posició i orientació, encara que els MREs són més

efectius quan es troben al voltant de 100 bp respecte la caixa TATA (Searle *et al.*, 1987). Actuant cooperativament aconseguen una inducció més eficient que no pas quan hi són individualment (Stuart *et al.*, 1984; Searle *et al.*, 1985).

S'han trobat diversos factors *trans* que actuen com reguladors transcripcionals de la resposta als metalls d'aquestes seqüències, anomenats *metal binding factors* (MBFs) (Seguin *et al.*, 1984; Imbert *et al.*, 1989; Seguin, 1991; Radtke *et al.*, 1993; Palmiter, 1994), encara que l'anomenat *metal-responsive transcription factor-1* (MTF-1) sembla ser el més important (Westin and Schaffner, 1988; Palmiter, 1994; Radtke *et al.*, 1995; Dalton *et al.*, 1996). Aquest i altres factors *trans* que s'uneixen als MREs estan descrits a la taula 3. Aquests factors són estimulats per diferents metalls, Zn, Cd e inclús s'ha n'ha vist algun que no respon a metalls exògens.

Nom	Origen	Metall al qual respon	Treball
MTF-1	HeLa	Cd +	(Westin and Schaffner, 1988)
p39	Fao hepatoma	Cd +	(Andersen <i>et al.</i> , 1990)
ZAP	Fetge rata	Zn +	(Searle, 1990)
MBF-I	L-50	-	(Imbert <i>et al.</i> , 1989)
MRE BF1	HepG2	-	(Czupryn <i>et al.</i> , 1992)
MRE BF2		-	
MREBP	HeLa	Cd i Zn +	(Koizumi <i>et al.</i> , 1992a)
MEP-1	L-50	-	(Labbe <i>et al.</i> , 1991)
ZRF	HeLa	Zn +	(Koizumi <i>et al.</i> , 1992b)
M96	Ratolí	Zn +	(Inouye <i>et al.</i> , 1994)

Taula 3. Llistat dels diferents factors *trans* que s'uneixen a MREs coneguts fins avui. El pes molecular i l'efecte dels metalls en la seva unió als MREs és bastant variable. + indica estimulació i - indica no estimulació.

- **GREs** (*glucocorticoid responsive elements*). Va ser trobat en humans (Karin *et al.*, 1984b) i recentment ha estat identificat en el ratolí (Kelly *et al.*, 1997). La seqüència central, 5' GGTACACTGTGTCCT 3' es troba a uns 250 bp de l'inici de transcripció del gen en humans. És el lloc d'interacció del receptor dels glucocorticoides. En ratolí estan localitzats a 1 Kb i 7 Kb respecte el gen de la MT-II i MT-I, respectivament (Kelly *et al.*, 1997). L'anàlisi dels GREs en altres gens no ha estat possible per la poca inducció dels glucocorticoides als sistemes *in vitro* utilitzats. El problema no és la llunyania de l'inici de transcripció com la sospita de que quelcom més que la seqüència i el receptor són necessaris per la resposta (Mayo and Palmiter, 1982; Searle *et al.*, 1984). Altres treballs mostren GREs en el promotor de ratolí i d'hàmmster (Plisov *et al.*, 1994; Yu and Lin, 1995) però la seva inducció és molt baixa i suggereix que quelcom és essencial entre els receptors i els GREs per intervenir en la resposta transcripcional. A més, s'ha provat la inducció simultànea dels GREs i dels MREs en resposta al receptor dels glucocorticoides (Filmus *et al.*, 1992).

• **Altres seqüències *cis* i factors *trans*.** A més dels MREs i els GREs existeixen altres seqüències d'unió a diferents elements *trans* que s'han trobat a promotors de de MT de rata, ratolí i humà. Aquestes seqüències són:

- **Regió d'unió a Sp1.** La seqüència TCGCCCA és reconeguda pel factor Sp1. S'ha identificat al gen de la MT d'humà (Lee *et al.*, 1987a), rata (Andersen *et al.*, 1987) i ratolí (Mueller *et al.*, 1988) i estaria implicada en el control de la transcripció basal del gen. És un factor bastant comú en vertebrats.
- **Regió d'unió a MLTF (*major late transcription factor*).** Aquest factor contribueix també a la transcripció gènica de la MT (Carthew *et al.*, 1987) i a més pot actuar sinèrgicament amb altres elements com Sp1 o els MREs (Mueller *et al.*, 1988). Molt recentment s'ha vist que el factor *trans* de transcripció USF podria reconèixer aquesta mateixa regió (Datta and Jacob, 1997).
- **BLE 1 o TRE (regions d'unió a AP-1).** El factor de transcripció AP-1 s'uniria a elements *enhancers* del promotor anomenats BLE 1 (basal level enhancers) i la seva acció podria venir modulada per la proteïna Kinasa C (Angel *et al.*, 1987; Lee *et al.*, 1987b). Aquestes seqüències també s'anomenen TRE (*12-o-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)- responsive element*) perquè interviendria en la inducció del gen per esters de forbol. Se n'ha vist en cèl·lules humanes. AP-1 és el producte de dos oncogens, *c-fos* i *c-jun*, dels quals forma un homodímer (Jun/Jun) o heterodímer (Fos/Jun) (Abate *et al.*, 1990).
- **BLE-2 (regions d'unió a AP-2).** De forma similar a AP-1, AP-2 s'uniria a elements BLE 2. La seva acció tindria lloc després de la inducció d'agents (com el TPA) involucrats en l'activació de la proteïna Kinasa C i la proteïna Kinasa A mitjançant l'AMPc (Imagawa *et al.*, 1987; Nebes *et al.*, 1988).
- **ARE (*antioxidant response element*).** Seria la regió responsable de la inducció de la MT per peròxid d'hidrogen o H₂O₂ (Dalton *et al.*, 1994). No es coneixen encara factors *trans* implicats en aquesta seqüència.
- **IRE (*interferon responsive element*).** S'ha vist en cèl·lules de la MT-II_A humana la presència d'aquest element el qual interviendria en la resposta cel·lular a l'interferó α (situat a -760 bp de l'inici de transcripció) (Friedman and Stark, 1985)
- **Regió de resposta a LPS.** S'ha definit també una regió requerida per la inducció per endotoxina bacteriana (LPS) del gen de la MT en ratolí (Dumam *et*

al., 1984). Estaria situada entre -200 i -300 bp. No hi ha estudis sobre com podria actuar aquest mecanisme però seria independent dels metalls.

- **AABS** (*A-activator binding site*). Aquest element s'ha trobat en el promotor de la isoforma MT-I_x humana (a la posició -126) (Stennard *et al.*, 1994) i és interessant per estar associat a gens involucrats en la resposta de fase aguda en el fetge mitjançant la interleucina-6.
- **NF-IL6** (nuclear-factor-interleukin-6-responsive element). Aquest element ha estat trobat en truita (situat a uns -950 bp) i sembla respondre a la inducció per H₂O₂ del gen de la MT-A (Olsson *et al.*, 1995). Es desconeix la seva presència en el gen de la MT de mamífers, però l'hem inclòs a la llista per la seva importància, ja que està present a diversos gens de citocines (Koj, 1996).

- **Promotor de la MT-III**. Per acabar caldria comentar breument l'estructura del gen de la MT-III d'humà i ratolí. Se n'ha descrit el promotor i la seva seqüència indica la presència de MREs, regions per la unió de Sp1 i per la unió de AP-2, a més de la corresponent TATA box (Naruse *et al.*, 1994).

A més d'aquestes seqüències se n'ha identificat una altra que es troba en altres gens d'expressió específica en cèl·lules glials com ara el gen *gfa* que codifica per la *glial fibrillary acidic protein* o GFAP o el gen de la S100β. Aquestes seqüències s'han denominat hgcs (*human gfa common sequence*) (Naruse *et al.*, 1994).

Per una altre banda s'ha pogut descriure un triplet de bases CTG que es troba repetit fins a 25 vegades en el promotor de la MT-III de ratolí (triplets situats entre -477 i -257) el qual podria estar relacionat amb mecanismes de repressió del gen en òrgans diferents del cervell mitjançant repressors (*silencers*) específics de teixit (Imagawa *et al.*, 1995). A la figura 4 està representat el promotor de la MT-III humana i de ratolí.

Metilació

En els eucariotes superiors es presenten sovint modificacions en les bases del DNA. Així, una de les modificacions que poden presentar els gens són metilacions a les citosines, que donen com a resultat la base modificada, una 5'-metil citosina. Aquest tipus de modificacions pot alterar la transcripció gènica inhibint-la, atès que queden alterades les interaccions de diferents proteïnes amb la regió del promotor. Sembla clar que el patró d'expressió del gen de la MT en determinats teixits vindria

determinat per la metilació dels residus de citosines. Els diferents efectes de les metilacions que s'han vist són:

- Els metalls i els glucocorticoides no indueixen el gen de la MT-I de ratolí en algunes línies de cèl.lules T. En canvi, el tractament d'aquestes cèl.lules amb radiació ultraviolada (UV) o 5-azacitidina causa la demetilació de la regió gènica de la MT i conseqüentment adquireixen competència per respondre a aquests inductors (Compere and Palmiter, 1981; Lieberman *et al.*, 1983).
- El gen de la MT-I_B humana és inactiu en moltes línies cel.lulars però el tractament amb 5-azacitidina activa la seva expressió. A més, el gen es troba hipometilat en certes línies cel.lulars, un fet que permet que s'expressi normalment. Aquesta característica és extensiva a altres gens humans com els de la MT-I_F, MT-I_G i MT-II_A, els quals no s'expressen en certes línies si no són tractades amb 5-azacitidina (Heguy *et al.*, 1986; Jahroudi *et al.*, 1990).
- Activació del gen de la MT en cèl.lules ovàriques d'hàmmster (CHO) o de salmó en resposta a metalls després del tractament amb 5-azacitidina (Stallings *et al.*, 1986; Price-Haughey *et al.*, 1987).

2.1.4. Regulació post-transcripcional

Els estudis post-transcripcionals no són tan abundants com els transcripcionals. El tall dels dos introns i unió dels exons (fenomen de *splicing*) del transcrit primari de la MT ha de succeir ràpidament i amb eficàcia ja que condueix a una ràpida acumulació del mRNA de la MT poc després de la seva inducció (Palmiter, 1987). Així, una elevada proporció de mRNA es troba ja dintre de la primera hora després d'una estimulació amb metalls o glucocorticoides (Durnam and Palmiter, 1981; Mayo and Palmiter, 1981).

El patró de *splicing* del transcrit primari en cèl.lules ovàriques d'hàmmster sembla suggerir que és el segon intró el que primer és eliminat (Grady *et al.*, 1987). Els estudis sobre l'estabilitat del mRNA indiquen que la seva vida mitjana és de unes 2 hores i arriba a un màxim a les 6-8 hores després de l'exposició a un inductor (Durnam and Palmiter, 1981; Mayo and Palmiter, 1981; Yagle and Palmiter, 1985). Tot i això, en cèl.lules CHO s'ha suggerit una vida mitjana de fins a 12 hores (Morris and Huang, 1987).

El bloqueig de la transcripció gènica sembla estabilitzar els transcrits de la hMT-II_A i la hMT-I_G en hepatoblastomes (Sadhu and Gedamu, 1989). Curiosament la inhibició de la síntesi proteica amb cicloheximida també estabilitza el mRNA de la

MT de pollastre (De *et al.*, 1991). Tot sembla indicar que el mRNA de les MTs necessita d'un important control post-transcripcional de la acumulació del mRNA atès a la seva relativa inestabilitat. Aquesta estabilitat varia entre el teixit examinat i l'inductor utilitzat. Així, en hepatoblastoma humà s'ha observat un efecte estabilitzador del Cu respecte el Zn i el Cd (Sadhu and Gedamu, 1988), mentre que s'ha vist un efecte estabilitzador del Cd respecte el Zn en el mRNA de MT de cèl.lules de pollastre però no en cèl.lules de ratolí (De *et al.*, 1991).

La cua de poly-A sembla ser important en la estabilitat del mRNA i s'ha suggerit que l'increment de la mida del poly-A confereix més estabilitat (al menys 30 nucleotids són necessaris) després de la inducció per Cu i glucocorticoides (Mercer and Wake, 1985), LPS o citocines (De *et al.*, 1990)

2.1.5. Regulació traduccional

S'ha observat que els nivells de mRNA són sovint directament proporcionals als nivells de proteïna, la qual cosa suggereix l'absència d'un control traduccional prou important. Tot i això, s'han trobat algunes evidències que indiquen que la regulació de les isoformes de la MT-I i MT-II per Cu i Cd en el fetge estan sotmeses a un diferent control traduccional. També s'han observat increments diferents de cada isoforma per tractament amb glucocorticoides en rata. Aquests mecanismes serien desconeguts fins el moment (Lehman-McKeeman *et al.*, 1991; Vasconcelos *et al.*, 1996). Un control diferencial de la traducció podria regular la síntesi de cada isoforma en el fetge suggerint una implicació diferent per cada isoforma en la seva funcionalitat (Vasconcelos *et al.*, 1996). Aquest control seria diferent segons les espècies i segons el desenvolupament. Per exemple, la MT-I hepàtica és més abundant que la MT-II durant el desenvolupament del ratolí, mentre que no hi ha pràcticament diferències entre les dues isoformes al fetge de rata. A nivell de concentració total s'observa 3 vegades més MT a rata que a ratolí (Lehman-McKeeman *et al.*, 1991)

2.1.6. Regulació post-traducciona

Estabilitat proteica i degradació

S'han realitzat estudis sobre la vida mitjana de la proteïna els quals indiquen que el grau de degradació de la MT ve determinat pel tipus de metall que està lligat a la proteïna. Així, el temps de vida mitjana de MT induïda amb Cd, Zn i Cu és d'unes 80, 20 i 17 hores aproximadament (Feldman and Cousins, 1976; Bremner *et al.*, 1978; Held and Hoekstra, 1984). En cultiu d'hepatòcits de rata el grau de degradació de MT és inversament proporcional al contingut cel.lular de Zn. D'aquesta manera, en un medi amb baix contingut de Zn, la vida mitjana de la proteïna és d'unes 11 hores (Chen and Failla, 1989). *In vivo* també s'ha pogut observar una diferència respecte a la vida mitjana de les dues isoformes principals, essent la MT-II més estable que la MT-I (Andersen *et al.*, 1978; Lehman-McKeeman *et al.*, 1988b). És clar el paper del metall per mantenir estable la MT, ja que incubacions de la proteïna amb diferents quantitats de metall indiquen menys degradació que l'apoproteïna (Choudhuri *et al.*, 1992). S'ha vist que la dissociació del metall de la MT provocada per proteases com catepsina B es dona en més proporció en els lisosomes que en el citosol i que és un fenomen que ve donat pel pH lisosomal (~4.7) (Choudhuri *et al.*, 1992; McKim *et al.*, 1992; Klaassen *et al.*, 1994).

2.2. Inductors

La MT és una proteïna multiregulada e induïda per molts factors. La llista d'inductors és molt àmplia i variada (taula 4). Inclús s'ha intentat establir una certa classificació que engloba els inductors en dos grans grups, inductors directes i els indirectes (Andrews, 1990). Es consideren inductors directes aquells que poden induir l'expressió gènica en l'animal *in vivo* així com *in vitro*, mentre que els inductors indirectes no podrien actuar *in vitro* però sí *in vivo*. A més, la regulació de la MT pot donar-se per la interacció entre varis factors els quals resulten difícils d'avaluar *in vitro*. Només en alguns casos s'han pogut clarificar els mecanismes pels quals un inductor pot actuar (elements reguladors en el promotor o d'altres) ja que en la majoria dels casos els mecanismes moleculars no són clars.

Relació de factors que indueixen la síntesi de MT <i>in vivo</i> i/o <i>in vitro</i>		
Metalls Cd, Zn, Cu, Hg, Au, Ag, Co, Ni, Bi Hormones i segons missatgers Glucocorticoides Progesterona Estrogen Catecolamines Glucagon Angiotensina II Vasopresina Adenosina cAMP Dialcílglícerol Ca Factors de creixement Factors sèrics IGF-1 EGF Vitamines Acid ascorbid Retinoat 1 α ,25-Dihidroxitamina D ₃	Agents inflamatoris i citocines Lipopolisacàrid o endotoxina Galactans Dextrà Turpentina Interleucina-1 α i β Interleucina-6 Interferó- α i γ Factor de necrosi tumoral Promotors de tumors i oncogens Esters de forbol ras Condicions associades a estrès Inanició Infecció Inflamació Laparotomia Exercici físic Estrès psicològic Fred Calor Immobilització Exposició al soroll Radiació X Radiació UV	Agents citotòxics: <ul style="list-style-type: none"> • Agents alquilants Bromobenzè Dietil maleat Iodoacetat • Herbicides Paraquat Diquat • Solvents Alcohols Formaldehid Tetraclorid de carbó n-Hexà Cloroform • Agents oxidatius Peròxid d'hidrogen Menadiona Alta pressió de O₂ Hidroperòxid tert-butílic • Altres drogues i agents Estreptozotocina Cicloheximida Mitomicina Acid kainic cis-Platí Penicilamina Indometacina Uretà EDTA

Taula 4. Llistat dels inductors principals de la MT tant *in vivo* com *in vitro* (cultius cel·lulars). Aquesta relació és una llista parcial adaptada de (Bremner, 1987), (Kägi, 1993) i (Moffatt and Denizeau, 1997).

Intentar abordar cada un dels factors de la amplia i extensa llista de la taula 4 seria impracticable. Així, en aquest apartat se n'expliquen els inductors clàssics més importants, com són els metalls, les hormones, els agents inflamatoris, les citocines i les situacions d'estrès, que són els factors sobre els quals s'ha desenvolupat la part experimental i que coincideix que són els principals inductors coneguts. S'ha procurat centrar els efectes de cada factor en els òrgans més importants per a nosaltres com són el fetge i el cervell sense deixar de banda els efectes més importants en altres teixits.

2.2.1. Metalls

Els metalls són els inductors de la MT més potents i coneguts. Piscator (1964) va ser el primer en veure que la síntesi de MT era induïda per Cd. Així, metalls administrats *in vivo* com Cd, Zn, Cu, Hg, Mn, Co, Pb, Ni i Bi indueixen la síntesi de mRNA i de proteïna de la MT-I i MT-II en totes les espècies d'eucariotes superiors que s'han estudiat i en diferents òrgans estudiats. Els òrgans més induïbles són el fetge, el ronyó i el pàncreas (Dumam and Palmiter, 1981). Molts són els treballs que ens mostren la inducció per metalls en diferents òrgans i teixits. Mostrem a la taula 5 alguns exemples.

Metall	Treball	Metall	Treball
Cd	(Piscator, 1964)	Co	(Piotrowski and Szymanska, 1976)
Zn	(Bremner and Davies, 1975)	Bi	(Piotrowski and Szymanska, 1976)
Cu	(Bremner and Young, 1976b)	Mn	(Waalkes and Klaassen, 1985)
Hg	(Cherian and Clarkson, 1976)	Pb	(Waalkes and Klaassen, 1985)
Au	(Mogilnicka and Piotrowski, 1979)	Cr	(Waalkes and Klaassen, 1985)
Fe	(Piotrowski and Szymanska, 1976)	Ni	(Waalkes and Klaassen, 1985)
Al	(Jeffery <i>et al.</i> , 1987)	Se	(Iwai <i>et al.</i> , 1988)

Taula 5. Referències que mostren inducció de la MT-I i MT-II *in vivo* per administració de metalls, en diferents òrgans com ara el fetge, ronyó o pancreas en eucariotes superiors (principalment rata, ratolí i conill).

Curiosament, tant la MT-III com la MT-IV no són induïdes *in vivo* ni per Cd ni Zn (Palmiter *et al.*, 1992; Liang *et al.*, 1996).

No obstant, alguns d'aquests metalls no mostren aquest efecte en cèl·lules *in vitro*. Així, Cd, Zn, Cu, Hg, Co i Ni tenen un efecte directe ja que també indueixen la MT *in vitro* (Webb and Daniel, 1975; Karin *et al.*, 1980; Bracken and Klaassen, 1987b), característica que no mostren el Mn i el Pb (Bracken and Klaassen, 1987b) o el Fe en hepatòcits primaris de pollastre (Fleet *et al.*, 1990).

En ratolí el Cd mostra una major inducció respecte Zn i Cu i la seva inducció és coordinada per les dues isoformes MT-I i MT-II al fetge (Yagle and Palmiter, 1985), així com al hámster (Griffith, 1985). Malgrat això, la MT-II de rata sembla ser la isoforma predominant en fetge induït amb Zn (Lehman-McKeeman *et al.*, 1988b). Aquesta heterogeneïtat en algunes isoformes s'accentua en les MTs humanes. D'aquesta forma, la MT-II_A respon per igual al Cd, Zn o Cu i és el transcrit més abundant *in vitro* (Sadhu and Gedamu, 1988). El Cd és el inductor més pobre de la MT-I_G (Sadhu and Gedamu, 1988), contràriament a la MT-I_A, la qual respon només al Cd (Richards *et al.*, 1984).

En el cervell trobem que l'administració perifèrica de metalls *in vivo* no afecta pràcticament els nivells de MT-I i MT-II (Durnam and Palmiter, 1981; Itoh *et al.*, 1983; Heilmaier and Summer, 1985). Això és conseqüència de la protecció de la barrera hematoencefàlica. Llavors una bona aproximació per estudiar la inducció dels metalls *in vivo* és la injecció intracerebroventricular (i.c.v.) amb la qual sí es veu aquest efecte, tant en el mRNA com en els nivells proteics (Paliwal *et al.*, 1990; Gasull *et al.*, 1994b; Hao *et al.*, 1994). Els metalls també han estat estudiats *in vitro* en cultius cel·lulars d'astròcits i neurones mostrant un efecte inductor sobre els nivells de MT-I i MT-II (Kikuchi *et al.*, 1993; Hidalgo *et al.*, 1994a; Kramer *et al.*, 1996a; Kramer *et al.*, 1996b).

Com ja s'ha mencionat en l'apartat del gen, la inducció dels metalls ve donada per la presència dels MREs en el promotor del gen, a través de la interacció amb els factors de transcripció *trans* (veure taula 3).

2.2.2. Hormones

Les hormones són uns inductors de la MT bastant estudiats, tant *in vivo* com *in vitro*. Són varies les hormones que poden regular la MT (veure taula 4).

Glucocorticoides

Els glucocorticoides endògens (cortisol en humans i corticosterona en rosegadors) i el sintètic dexametasona són considerats inductors directes de la MT, ja que indueixen el gen de la MT tant *in vivo* (Etzel *et al.*, 1979; Etzel and Cousins, 1981; Hager and Palmiter, 1981) com *in vitro* (Failla and Cousins, 1978; Karin and Herschman, 1979; Karin and Herschman, 1980; Karin *et al.*, 1984a).

L'efecte dels glucocorticoides és variable i depen de les espècies que s'estudien i dels gens. Així, en el ratolí la regulació de la MT-I i MT-II per glucocorticoides és coordinada (Yagle and Palmiter, 1985), però en canvi el seu efecte varia en les isoformes humanes (Karin *et al.*, 1984a; Richards *et al.*, 1984) i les d'ovella (Peterson and Mercer, 1988). A més de variable, l'efecte dels glucocorticoides és modest ja que moltes vegades dosis fisiològiques no indueixen la MT i són necessàries dosis farmacològiques (Bracken and Klaassen, 1987a; Lehman-McKeeman *et al.*, 1988a; Klaassen and Liu, 1991).

Malgrat aquesta variació d'efectes el que si és cert és la existència d'elements GREs en el promotor de la hMT-II_A com s'ha descrit en l'apartat del promotor, que controlen l'expressió gènica per glucocorticoides (Karin *et al.*, 1984b), en el ratolí (Kelly *et al.*, 1997) i en hámster (Yu and Lin, 1995).

És en el fetge on sembla que els glucocorticoides exerceixen predominantment la seva acció, ja que la seva administració exògena incrementa els nivells hepàtics de MT (Etzel *et al.*, 1979; Cousins and Coppen, 1987). Malgrat això, en rates adrenalectomitzades (ADX) o tractades amb bloquejants dels receptors dels glucocorticoides, la síntesi de MT es troba incrementada, tant de forma basal com en situacions d'estrès (DiSilvestro and Cousins, 1984; Hidalgo *et al.*, 1988c). El paper dels glucocorticoides en aquest sentit seria contrari a l'esperat, estarien inhibint la síntesi. Aquest paper dels glucocorticoides serà tractat en el corresponent apartat de la Discussió. Dos són els treballs en la present tesi que estudien el paper dels glucocorticoides (treball 2 (Belloso *et al.*, 1996) i treball 3).

En el cervell els estudis realitzats *in vivo* amb glucocorticoides (administrats perifèricament) mostren una inducció de la MT-I i MT-II en diferents àrees cerebrals, tant del mRNA com de la proteïna (Gasull *et al.*, 1994b; Zheng *et al.*, 1995). Els glucocorticoides semblen tenir un paper en el control dels nivells basals de la MT, ja que en rates adrenalectomitzades els nivells de la MT es troben disminuïts i són revertits després d'una teràpia amb corticosterona (Gasull *et al.*, 1994b; Hidalgo *et al.*, 1997), al contrari de l'efecte observat al fetge.

En cultius *in vitro* d'astròcits i neurones de rata i ratolí s'observa també un efecte inductor en els nivells del mRNA i de la proteïna de la MT-I i MT-II (Hidalgo *et al.*, 1994a; Kramer *et al.*, 1996a; Kramer *et al.*, 1996b).

Respecte a les isoformes MT-III i MT-IV, només hi ha estudis de l'efecte dels glucocorticoides sobre l'expressió de la MT-III. *In vivo* sembla no estar induïda després de l'administració de dexametasona i de l'administració perllongada d'ACTH (Palmiter *et al.*, 1992; Belloso *et al.*, 1996). Inclús, en un altre estudi s'ha vist una disminució en hipocamp (Zheng *et al.*, 1995). En rates adrenalectomitzades s'ha vist aquesta disminució en diferents àrees cerebrals (Belloso *et al.*, 1996), revertida parcialment per una teràpia amb corticosterona (Hidalgo *et al.*, 1997). En cultius d'astròcits i de neurones trobem diferències. Mentre es induïda en cèl·lules gials de rata i parcialment en ratolí (Belloso *et al.*, 1996; Kramer *et al.*, 1996a), en cultius neuronals els nivells de mRNA de la MT-III semblen estar disminuïts tant en rata com en ratolí (Belloso *et al.*, 1996; Kramer *et al.*, 1996b). En conjunt, els resultats suggereixen una regulació diferenciada segons el tipus cel·lular.

Altres hormones

A més dels glucocorticoides, altres hormones exerceixen un efecte inductor *in vivo* sobre el gen de la MT, resumides a la taula 6.

Homona	Via d'actuació	Teixits	Treball
Adrenalina	AMPC	Fetge	(Brady and Helvig, 1984)
Angiotensina II	Protein Kinasa C	Fetge	(Helvig and Brady, 1984)
Estradiol	GRES	Fetge i ronyó	(Nishiyama <i>et al.</i> , 1987)
Glucagó	AMPC	Fetge	(Helvig and Brady, 1984)
Noradrenalina	Protein Kinasa C	Fetge	(Brady <i>et al.</i> , 1987)
Progesterona	GRES	Ronyó	(Bremner <i>et al.</i> , 1981)

Taula 6. Resum de diferents hormones inductores de la MT. S'hi assenyala la seva via d'acció, el teixit on s'ha vist aquest efecte i el treball on es va descriure.

Cal senyalar que les hormones sexuals, com els estrogens i la progesterona, poden estar utilitzant els mateixos elements reguladors en el gen de la MT que els glucocorticoides (Slater *et al.*, 1988).

In vitro, la dopamina, noradrenalina i serotonina incrementen els nivells proteics de MT en cultius primaris de neurones, però la disminueixen en astròcits (Gasull *et al.*, 1994a). També podem destacar l'efecte de la morfina sobre la MT, cosa que suggereix que els opiàcis endògens podrien estar-hi implicats (Hidalgo *et al.*, 1991b).

2.2.3. Estrès

L'estrès és un concepte que engloba moltes situacions amb diferents components. La MT, sobretot la hepàtica, es troba incrementada notablement davant un gran nombre d'agents estressants, com es mostra a la taula 7. Els mecanismes involucrats en la inducció de la MT per l'estrès són estudiats ampliament en la part experimental d'aquest treball.

Tipus d'estrès	Treball
inanició	(Bremner and Davies, 1975)
infecció	(Sobocinski <i>et al.</i> , 1978)
inflamació	(Sobocinski and Canterbury, 1982)
laparotomia	(Piletz <i>et al.</i> , 1983)
exercici físic	(Oh <i>et al.</i> , 1978)
fred	(Oh <i>et al.</i> , 1978)
calor	(Oh <i>et al.</i> , 1978)
immobilització	(Hidalgo <i>et al.</i> , 1988a)
exposició al soroll	(Sugawara <i>et al.</i> , 1983)
radiació X	(Koropatnick <i>et al.</i> , 1989)
radiació UV	(Fornace <i>et al.</i> , 1988)

Taula 7. Agents estressants que indueixen la síntesi de MT i treballs on es descriu l'acció de l'agent.

El concepte que utilitzem per enumerar els diferents tipus d'estrès és bastant ampli. Entre els diferents conceptes que s'hi han aportat (des dels originaris de Mason i Selye) podem destacar la definició que va donar Vigas (Vigas, 1980), el qual defineix l'estrès com la resposta de l'organisme, desenvolupada al llarg de la filogènia, en els agents que de forma simbòlica o real posen en perill la seva integritat. Els mecanismes d'acció envers l'estrès han de ser, segons es desprèn d'aquesta definició, amplis i generalitzats. Els estudis realitzats fins ara s'han centrat sobretot en dos eixos endocrins que són activats davant l'estrès, l'eix hipotalàmic-pituitari-adrenal (eix HPA) i l'eix simpàtic-medul.lo-adrenal (eix SMA).

En síntesi, l'activació dels eixos HPA i SMA és originada al sistema nerviós central (CNS) i en resulta al final de l'activació que els nivells de glucocorticoides i catecolamines estan molt incrementats en sang.

D'aquesta forma, i atès que els glucocorticoides són inductors directes de la MT, s'ha estudiat força el paper dels glucocorticoides en la inducció hepàtica i cerebral. També hem de dir que l'estrès indueix la MT en altres teixits com el cervell, a més del fetge i el cor de rata (Hidalgo *et al.*, 1990a). Aquestes dades indiquen la MT involucrada en la adaptació de l'organisme a l'estrès.

Utilitzant com a model d'estrès la immobilització, ja que els canvis metabòlics són més generals que amb altres tipus d'estrès, s'ha observat que l'increment dels

nivells de la MT-I i MT-II ve condicionat per la duració i la intensitat del tipus d'immobilització (Hidalgo *et al.*, 1994b).

Curiosament, ni els glucocorticoides, ni les catecolamines ni opioïds endògens semblen intervenir en l'efecte de l'estrès sobre els nivells de MT hepàtics en rata (Hidalgo *et al.*, 1988c) (Hidalgo *et al.*, 1988b; Hidalgo *et al.*, 1991b). Un dels treballs presentats en aquesta tesi estudia el paper dels glucocorticoides en la inducció hepàtica de la MT per l'estrès en ratolí, observant-se un paper mediador.

En el cervell de rata, l'increment dels nivells de mRNA i proteïcs de la MT sembla estar produït pels glucocorticoides en algunes àrees cerebrals (Belloso *et al.*, 1996; Hidalgo *et al.*, 1997), però no per catecolamines (Gasull *et al.*, 1994a), cosa que suggereix que existeixen altres factors implicats.

En els últims anys s'ha incrementat molt l'estudi de les relacions entre el sistema immunitari i l'estrès. Així, recentment s'ha demostrat que en situacions d'estrès físic i psicològic poden incrementar els nivells circulants d'algunes citocines com ara la interleucina-6 (IL-6) (Lemay *et al.*, 1990; Zhou *et al.*, 1993). Per una altra banda se sap que les citocines, mediadors solubles que coordinen o regulen la comunicació intercel·lular, poden activar l'eix HPA (Turnbull and Rivier, 1995; Turnbull *et al.*, 1997). Les interrelacions entre el sistema immunitari i endocrí semblen essencials en la resposta a l'estrès (Harbuz and Lightman, 1992).

Tot indica que, en efecte, hi ha un cert paper del sistema immunitari en les situacions d'estrès, i de fet les citocines podrien ser un dels factors implicats en la resposta a l'estrès. Dos són els treballs inclosos en la present tesi que aporten noves dades sobre el paper de dues citocines com la IL-6 i l'interferó- γ (IFN- γ) en l'activació de la MT hepàtica i cerebral en situacions d'estrès.

Per últim farem referència a la MT-III durant l'estrès. Els resultats obtinguts respecte a la inducció o no del mRNA de la MT-III durant l'estrès en rata i ratolí són certament contradictoris, diferències degudes possiblement a problemes metodològics entre anàlisis (Belloso *et al.*, 1996; Hidalgo *et al.*, 1997). Experiments analitzats amb hibridació *in situ* semblen aclarir aquestes discrepàncies (dades no publicades), suggerint que el mRNA de la MT-III està clarament incrementat en el cervellet. En la resta d'àrees sembla existir una gran variació.

Els glucocorticoides semblen intervenir en la resposta a l'estrès de la MT-III en experiments realitzats amb rates ADX i analitzats amb Northern-blot i dot-blot en diferents àrees cerebrals (Belloso *et al.*, 1996; Hidalgo *et al.*, 1997), si bé aquesta regulació seria diferent en algunes àrees respecte a la MT-I.

2.2.4. Endotoxines bacterianes

Les endotoxines són lipopolisacàrids (LPS) que es troben en la superfície de les membranes bacterianes gram-negatives. Les membranes bacterianes estan formades fonamentalment pel lípid A, al qual es troben ancorats els LPS. Una de les parts de què està formada el LPS és l'anomenat Antigen-O tal com es pot veure a la figura 4. L'antigen-O, que es troba en la part més exposada a l'exterior de l'estructura, són varis oligosacàrids repetits i formen una estructura altament variable que possiblement facilita evadir al sistema immune per part de la bacteria (veure revisió de (Raetz, 1990)).

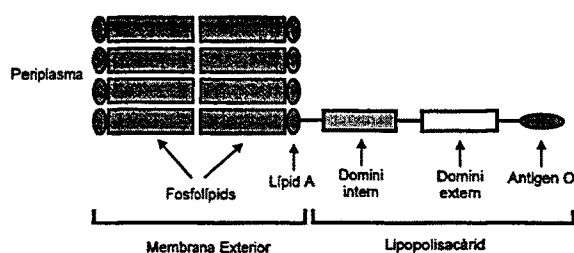


Figura 4. Representació esquemàtica molecular de la membrana externa de la bacteria *E. Coli* mostrant-se la membrana, la situació del lípid A i del LPS.

El LPS és sovint anomenat també endotoxina. Aquest terme va ser introduït en el segle XIX per descriure el component de les bactèries gram-negatives responsables de certs fenòmens fisiopatològics relacionats amb les infeccions de bactèries gram-negatives. Avui és coneguda la potent acció del lípid A i del LPS per activar macròfags desencadenant la ràpida inducció de citocines i altres proteïnes en la resposta que s'anomena de fase aguda o *acute-phase response* (Heinrich *et al.*, 1990; Baumann and Gauldie, 1994; Laskin and Pendino, 1995).

La MT, sobretot la hepàtica, es troba molt incrementada en resposta a infeccions bacterianes causades per endotoxina. Aquest efecte s'ha vist *in vivo* en moltes espècies com rata (Sobocinski and Canterbury, 1982), (Suzuki and Yamamura, 1980), ratolí (Dumam *et al.*, 1984; De *et al.*, 1990), hámster (Etzel *et al.*, 1982), pollastre (Wei and Andrews, 1988) o humans (Grider *et al.*, 1989).

La inducció de la MT per la endotoxina és independent dels glucocorticoides, ja que la inducció s'explica en part per l'acció de la seqüència *cis* trobada per la endotoxina en ratolí (Dumam *et al.*, 1984), tot i que els glucocorticoides tenen un paper permissiu en la resposta *acute-phase* (Baumann and Gauldie, 1994).

Tot i això la inducció de la MT per endotoxina s'explica per l'activació dels macròfags, essent la inducció de la MT molt disminuïda per exemple en la soca de ratolins C3H/HeJ (Maitani *et al.*, 1986; De *et al.*, 1990) que tenen la característica que els seus macròfags són resistents a l'acció de la endotoxina (Glode and Rosenstreich, 1976; Rosenstreich *et al.*, 1978). C3H/HeJ presenta una mutació en el gen *Lps* del cromosoma 4 que provoca una menor resposta a la endotoxina i una menor producció de citocines (Vogel, 1992). Així, com a resultat d'aquesta activació es posa en marxa tot el sistema immunitari, i hi destaca la alliberació de citocines com la interleucina-1 (IL-1- α i - β), interleucina-6 (IL-6), l'interferó (IFN- α , - β i - γ), el factor de necrosi tumoral (TNF- α) i una gran varietat de factors de creixement. Els efectes d'aquestes citocines sobre l'expressió de la MT s'explicaran en els pròxims apartats.

In vitro també s'ha vist una inducció de MT i dels nivells de Zn per efecte de la endotoxina en cultiu primari d'hepatòcits (Fukushima *et al.*, 1988) i en cèl·lules humanes (Oberbarnscheidt *et al.*, 1988).

En el cervell s'ha observat l'increment de l'expressió del mRNA en ratolins i rates injectades amb endotoxina: mRNA en cervell de ratolí (Searle *et al.*, 1984; De *et al.*, 1990; Palmiter *et al.*, 1992; Choudhuri *et al.*, 1993; Zheng *et al.*, 1995) i rata (Choudhuri *et al.*, 1993), mRNA en hibridacions *in situ* de ratolí (Zheng *et al.*, 1995) i rata (Itano *et al.*, 1991) i mRNA en àrees cerebrals de ratolí (Choudhuri *et al.*, 1995). Respecte a la proteïna, en un estudi inicial en rates, la MT no era induïda 8 hores després d'injectar LPS (Gasull *et al.*, 1994b), però en canvi dos dels treballs aportats en aquesta tesi mostren una clara inducció de la MT a les 24 hores d'injectar LPS en ratolí i en rata (Hernández *et al.*, 1997b; Hernández and Hidalgo, 1998).

No s'han fet molts estudis respecte la inducció de la MT-III per endotoxina. En un principi no es van trobar efectes en el mRNA de cervell de ratolí (Palmiter *et al.*, 1992). Posteriorment s'ha vist que els nivells de mRNA de la MT-III decreixen amb el tractament de LPS en ratolí en ser analitzats per Northern-blot (Zheng *et al.*, 1995; Hernández *et al.*, 1997b) i per hibridació *in situ*, a l'hipocamp (Zheng *et al.*, 1995).

2.2.5. Citocines

Les citocines són un grup de molècules que es coneixen des dels anys 60. S'ha proposat la següent definició (Balkwill and Burke, 1989):

"Citocina és un terme aplicat a un grup de pèptids o proteïnes cel·lulars reguladores denominades limfocines, monocines, interleucines i interferons, les quals són produïdes per una gran varietat de tipus cel·lulars en l'organisme, com limfòcits, monòcits, cèl·lules epitelials, fibroblasts i altres, i que tenen un important paper en moltes respostes fisiològiques, estan involucrades en la fisiopatologia de moltes enfermetats i tenen un important potencial terapèutic". Així, les citocines son potents mediadors de les respostes immunològiques i inflamatories i també intervenen en una sèrie de fenòmens no immunològics com creixement i diferenciació cel·lular. A la taula 8 hem establert les característiques representatives de les citocines.

Característiques de les citocines	
Propietats bioquímiques	
•	Són polipèptids o glicoproteïnes amb un pes molecular ≤ 30 KDa (per això algunes formen oligòmers d'alt pes molecular)
•	Generalment presenten glicosilacions, que no són necessàries per la seva activitat biològica
•	Moltes citocines estan estabilitzades per un o més ponts disulfúrics
•	Algunes citocines presenten un alt contingut de hèlix α a la seva estructura
Propietats biològiques	
•	Expressió constitutiva molt baixa o absent. La seva expressió és regulada per varis estímuls inductors a nivell de transcripció o de translació
•	La producció de citocines és temporal o transitòria i el seu radi d'acció és curt, és a dir, tenen una acció típicament autocrina o paracrina, no endocrina
•	Exerceixen les seves accions per unió a específics receptors d'alta afinitat de membrana (K_d entre 10^{-9} - 10^{-12} M)
•	Una citocina pot obrar diversos efectes (són pleiotròpiques) i a la vegada, diverses citocines poden tenir el mateix efecte (són redundants)
•	Moltes accions de les citocines poden ser atribuïdes a un patró alterat de l'expressió gènica en les cèl·lules on exerceixen el seu efecte. Les citocines afecten la transcripció de molts gens

Taula 8. Trets fonamentals de les citocines. Taula adaptada de (Trotta, 1991) i de (Vilcek and Le, 1991).

Es creu que durant l'evolució dels organismes es va fer necessari el desenvolupament de missatgers intercel·lulars com les hormones i les citocines per coordinar les respostes cel·lulars. L'homologia estructural entre proteïnes d'adhesió que intervenen en interaccions cèl·lula-cèl·lula i els receptors de citocines suggereix que les citocines van sorgir de les senyals associades a comunicacions entre cèl·lules.

El grup que engloba les citocines és molt i molt ampli i està en contínua expansió. Actualment són més del centenar les descrites. Només per citar un exemple, existeixen ja 17 interleucines. Per una altra banda la nomenclatura clàssica de cada citocina no es correspon moltes vegades amb l'actual. A més, el fet que diferents citocines exerceixen efectes similars fa difícil classificar-les. Moltes han estat les classificacions que se n'han fet, i qualsevol classificació de citocines pot ser

discutida per la seva arbitrarietat. Entre aquestes classificacions hi figuren les de Arai et al. (Arai et al., 1990), Lies i Van Voorhis (Liles and Van Voorhis, 1995) i una altra de Cohen i Cohen (Cohen and Cohen, 1996). A la taula 10 està descrita una classificació resumida d'aquesta última segons la seva funcionalitat (Cohen and Cohen, 1996).

Citocines		
Grup	Nom	Abreviació
Interferons	Interferó	IFN- α
		IFN- β
		IFN- γ
Citocines inflamatòries (inclou moltes Monocines)	Factor de Necrosi Tumoral	TNF- α
		TNF- β o LT- α
	Interleucina-1	LT- β
		IL-1 α
		IL-1 β
Interleucina-6	IL-6	
Receptor antagonista de la IL-1	IL-1Ra	
Limfocines (mediadors derivats de limfòcits)	Interleucina-2	IL-2
	Interleucina-3	IL-3
	Interleucina-4	IL-4
	Interleucina-5	IL-5
	Interleucina-9	IL-9
	Interleucina-10	IL-10
	Interleucina-13	IL-13
	Interleucina-14	IL-14
Citocines derivades de macròfags (inclou altres Monocines)	Interleucina-12	IL-12
	Interleucina-15	IL-15
Quimocines	Interleucina-8	IL-8
	Interleucina-16	IL-16
	Proteïna inflamatòria de macròfag	MIP-1 α
		MIP-1 β
	Proteïna quimotàctica de monòcits	MCP-1
		MCP-2
		MCP-3
RANTES	-	
Factors de creixement hematopoètics	Factors estimuladors de colònies	CSFs
	Granulòcit-macròfrag-CSF	GM-CSF
	Granulòcit-CSF	G-CSF
	Macròfrag-CSF	M-CSF
	Multi-CSF	-
	Eritropoietina	EPO
Factor transformant de creixement- β	Interleucina-7	IL-7
	Interleucina-11	IL-11
Factor transformant de creixement- β	Factor transformant de creixement- β	TGF- β 1
		TGF- β 2
		TGF- β 3

Taula 10. Classificació resumida de citocines segons la seva funcionalitat. Taula adaptada de la classificació de Cohen i Cohen (Cohen and Cohen, 1996).

Algunes citocines indueixen les MTs. S'han estudiat únicament les citocines inflamatòries i els interferons, tant *in vivo* com *in vitro*, que mostren així el seu efecte directe. En els últims anys i gràcies a les clonacions de nous gens de la MT s'han

començat a veure alguns elements reguladors que podrien esclarir el mecanisme pel qual actuen.

A continuació analitzarem les característiques de la IL-1, IL-6, IFN i TNF, que són les quatre citocines que han estat estudiades en aquesta tesi, i els efectes sobre la MT coneguts fins ara.

Interleucina-1 (IL-1)

La interleucina-1 (IL-1) és una citocina composta de dues isoformes, la IL-1 α i la IL-1 β . Va ser identificada l'any 1972 com un factor produït pels macròfags que incrementava la resposta de les cèl·lules T contra antigens (Gery and Waksman, 1972). Si bé es tracta de dos gens diferents, reconeixen el mateix receptor de membrana. Les dues formes de la IL-1 són sintetitzades per macròfags, però també per monòcits, cèl·lules endotelials, fibroblasts, queratinocits, limfòcits B i T, cèl·lules del múscul llis, astròcits, microglia i altres. La IL-1 és expressada com un precursor anomenat pro-IL-1 d'uns 31 KDa. Posteriorment es generen les formes biològicament actives després de ser tallada la pro-IL-1 per proteases i donar així la IL-1 α i IL-1 β de 17 kDa (152 aa). Entre la IL-1 α i IL-1 β només hi ha un 26% d'homologia en la seqüència, i entre humans i ratolí un 70% (veure revisions de (Oppenheim *et al.*, 1986; Dinarello, 1991; Dinarello, 1996)). A més, existeix un tercer membre de la IL-1, el receptor antagonista de la IL-1 (IL-Ra), expressat a l'organisme de forma natural. El IL-1Ra va ser descobert al 1984 per Dayer i Arend practicament a la vegada (veure revisió de (Arend, 1991)), i té com característica bloquejar l'activitat biològica de la IL-1 α i la IL-1 β limitant la seva acció. Els gens de la IL-1 α , β i IL-Ra es troben al cromosoma 2 humà. A la taula 11 hi ha un resum de les principals activitats biològiques de la IL-1.

La IL-1 és un inductor directe de la MT. *In vivo* s'ha demostrat la inducció de la MT en fetge per IL-1 (DiSilvestro and Cousins, 1984; Cousins and Leinart, 1988; De *et al.*, 1990; Liu *et al.*, 1991). *In vitro* s'ha vist que la IL-1 α induïx l'expressió de la MT en algunes línies cel·lulars d'humà, però no en altres (Karin *et al.*, 1985). A més, també s'ha observat la inducció de la MT en diferents cultius cel·lulars, com línies cel·lulars tumorals humanes (Kondo *et al.*, 1994), cèl·lules endotelials vasculares (Kaji *et al.*, 1993), així com en astrocitomes (Kikuchi *et al.*, 1993) i neuroblastomes d'humà (Bauer *et al.*, 1993). En canvi, en altres sistemes *in vitro* com cultius primaris d'astròcits de ratolí no s'observen canvis en els nivells proteics de la MT quan la IL-1

és incorporada al medi de cultiu (Kramer *et al.*, 1996a). El mateix succeeix en cultiu primari d'astròcits de rata (Hidalgo *et al.*, 1994a).

No s'han realitzat estudis sobre la MT-III i el possible paper de la IL-1 en la seva possible regulació al cervell.

Si bé la IL-1 resulta una bona inductora de la MT-I i MT-II al fetge, al cervell s'ha mostrat una inducció *in vitro* -en línies cel·lulars-, però no en cultiu primari (millor aproximació a la situació fisiològica de l'organisme). No obstant un dels treballs presentats en aquesta tesi mostra un clar efecte inductor *in vivo* de la MT-I i MT-II (MT-I+II) al cervell, mitjançant injecció i.c.v. (Hernández and Hidalgo, 1998). No se sap si el seu paper inductor seria directe sobre el gen (no es coneixen seqüències *cis* per la IL-1) o estaria realitzat per altres molècules, ja que la IL-1 induïx factors nuclears com la AP-1 (Dinarello, 1991) o si el seu efecte es realitzaria a través de la IL-6, citocina induïda per la IL-1 (De Simoni *et al.*, 1990; Romero *et al.*, 1993; Norris *et al.*, 1994).

Accions de la IL-1	
Efectes en el sistema immunitari	Efectes en el fetge
Activació de les cèl.lules T	Regulació de les proteïnes <i>acute-phase</i>
Inducció de IL-6, TNF	Metabolisme dels aa i proteïnes
Increment de cèl.lules de la médula	Metabolisme mineral: ↓ Zn en sèrum
Activació de les cèl.lules B via IL-6	↑ Cu en sèrum
Activitat de les cèl.lules Natural Killer	Metabolisme de lípids: ↑ síntesi àcids grassos
Expressió gènica de limfocines (també IL-2R) i de factors hematopoïètics	Inhibició de la gluconeogenesi
Increment de l'activitat procoagulant a cèl.lules endotelials	Efectes en el cervell
Altres efectes	Febre, son i alteracions conductuals
Increment síntesi fibroblasts	Alteració de EEG i de l'activitat neuronal
Activació d'osteoblasts	Alliberació de neurotransmissors
Efectes beneficiosos en diverses malalties: Malària, diabetis, infeccions bacterianes, quimioteràpia, trasplantaments...	Inducció de NGF
Implantació uterina de l'embrió	Inducció de la pròpia IL-1β
Regulació de la fam	Astrogliosi i resposta inflamatòria en resposta a trauma o infecció
	Activació de l'eix HPA (CRF, ACTH)
	Increment de citocines en neuropatologies com AIDS, Alzheimer o esclerosi múltiple

Taula 11. Principals efectes o funcions de la IL-1. Les hem dividit en: Efecte en el sistema immunitari, efectes en el fetge, efectes en el cervell i altres efectes.

El possible paper de la IL-1 en situacions d'estrès no ha estat estudiat encara. Recentment s'ha vist que en certes situacions estressants la IL-1 es troba incrementada en sang (Dobbin *et al.*, 1991). Aquest augment podria significar un paper en la regulació de la MT en situacions d'estrès tant al fetge com al cervell, ja que l'estrès d'immobilització incrementa l'expressió del mRNA de la IL-1 al cervell (Minami *et al.*, 1991). Si bé s'han desenvolupat bastants ratolins transgènics *knock-*

outs per diverses citocines (Ryffel, 1995), el *knock-out* per la IL-1 s'ha fet fa poc temps per dos grups (Kuida *et al.*, 1995; Li *et al.*, 1995), i seria una eina molt bona per estudiar el paper regulador de la IL-1 sobre la MT en diverses circumstàncies com l'estrès o la inflamació. També seria una bona eina el model que ha estat publicat en l'últim any per dos grups, un ratolí transgènic sobreexpressant la IL-1Ra i que bloqueja d'aquesta manera l'acció de la IL-1 endògena (Hirsch *et al.*, 1996; Yang *et al.*, 1997). No obstant, no ens ha estat possible obtenir cap d'aquests ratolins per efectuar els nostres estudis sobre la MT.

La IL-1 podria ser considerada com la desencadenant de la regulació de la MT en la resposta *acute-phase* del fetge a un estímul com la endotoxina. La IL-1 lideraria aquesta resposta en cascada per part de les citocines, ja que desencadena la inducció d'altres citocines com el TNF o la IL-6, que és l'activadora més potent de les proteïnes *acute-phase* (Baumann and Gauldie, 1994).

A la pàgina 46 i 47 es troba representada esquemàticament (figura 5a i 5b) les interaccions entre inductors, com els glucocorticoides i les citocines IL-1, IL-6, IFN i TNF, i la MT, en resposta a un estímul com l'estrès i la inflamació.

Interleucina-6 (IL-6)

La interleucina-6 (IL-6) tal com la coneixem ara va ser descoberta i clonada a l'any 1980 (Weissenbach *et al.*, 1980). En principi se la va denominar interferon- β_2 atès a la seva activitat antiviral. Posteriorment es va purificar una molècula que va ser denominada factor 2 estimulador de cèl.lules B (BSF-2) i també es va descobrir la implicació d'un factor denominat factor estimulador d'hepatòcits (HSF) en la regulació de la resposta de fase aguda de l'organisme (Gauldie *et al.*, 1987). La concordància entre totes aquestes molècules i l'aïllament del cDNA va portar a designar aquesta molècula entre els anys 1987-1988 com IL-6.

La IL-6 humana és una glicoproteïna de 184 aminoàcids i un pes molecular entre 21-28 KDa en funció de les modificacions post-translacionals de la seva cadena. És sintetitzada com una proteïna precursora de 212 aa, amb 28 aa d'un pèptid senyal per donar posteriorment la molècula activa de 184 aa. La IL-6 de rata i ratolí consta d'un precursor de 211 aa i una molècula activa de 187 aa. La homologia de seqüències entre ratolí i humà del cDNA és d'un 65% i a nivell de proteïna d'un 42%. La part central de la proteïna és molt més conservada (57%). Els gens de la IL-6 d'humà, rata i ratolí han estat trobats als cromosomes 7, 4 i 5 respectivament. Les

cèl.lules que sintetitzen la IL-6 són variades, com fibroblasts, cèl.lules endotelials, monòcits, macròfags, cèl.lules B i T, hepatòcits, cèl.lules endometrials, microglia, astròcits, neurones i diverses línies cel.lulars.

La IL-6 actua a través d'un receptor específic de membrana d'un 80 KDa, i aquest receptor és present a moltes cèl.lules incloses les del CNS menys cèl.lules B activades i cèl.lules T (per revisió de la IL-6 veure (Kishimoto, 1989; Arai *et al.*, 1990; Heinrich *et al.*, 1990; Van Snick, 1990; Hirano, 1991; Plata-Salaman, 1991)).

A la taula 12 hi ha un resum dels efectes biològics de la IL-6.

Accions de la IL-6	
Efectes en el sistema immunitari	Efectes en el fetge
Activació de les cèl.lules T	Regulació de les proteïnes <i>acute-phase</i>
Maduració de les cèl.lules B	Metabolisme mineral: ↑ Cu en sèrum
Activació de cèl.lules tot-i-potents hematopoètiques	Alliberació de glucosa
Activació de factors CSF	Interacció amb hormones
Altres efectes	Efectes en el cervell
Increment síntesi fibroblasts	Activitat pirogènica
Activació d'osteoclasts i osteoblastogènesi	Diferenciació de cèl.lules nervioses
Inhibició de carcinomes, leucèmies i de limfomes i activació de mielomes	Alliberació hormonal (CRF, GH, LH, PRL, TRH, ACTH)
Increment de IL-6 en enfermetats com reuma, artritis glomerulonefritis i enfermetats autoimmunitaries	Inducció de NGF
	Astrogliosi i resposta inflamatoria en resposta a trauma o infecció
	Increment de citocines en neuropatologies com AIDS, Alzheimer o esclerosi múltiple, meningitis i encefalitis

Taula 12. Principals efectes de la IL-6. A igual que la IL-1, els hem dividit en: Efectes en el sistema immuntari, efectes en el fetge, efectes en el cervell i altres efectes.

Al igual que succeix amb la IL-1, la IL-6 és un inductor directe de la MT. Així la MT hepàtica és induïda *in vivo* per la IL-6 (De *et al.*, 1990; Liu *et al.*, 1991; Itoh *et al.*, 1994; Sato *et al.*, 1995; Sato *et al.*, 1996). *In vitro*, la MT és induïda en cèl.lules hepàtiques per la IL-6 (Coyle *et al.*, 1993) essent incrementada la inducció amb la presència de Dex i/o Zn (Schroeder and Cousins, 1990; Coyle *et al.*, 1993). Com que la IL-6 és la inductora més important de les proteïnes *acute phase* a la MT se l'ha denominat moltes vegades una proteïna *acute phase*.

Altres teixits perifèrics no mostren una inducció de la MT per la IL-6, com l'ovari (De *et al.*, 1990). En canvi, algunes línies cel.lulars sí mostren efecte, com a cèl.lules amniòtiques humanes i en presència de Dex (Snyers and Content, 1994).

En el cervell s'han fet diversos estudis *in vitro* sobre l'acció de la IL-6 en la MT. S'hi ha observat un augment de la síntesi de MT en línies cel.lulars glials i neuronal (Bauer *et al.*, 1993; Sawada *et al.*, 1994). En cultius primaris d'astròcits de ratolí i

ratolí i rata no s'observen canvis substancials (Hidalgo *et al.*, 1994a; Kramer *et al.*, 1996a), però s'observa un petit efecte en cultius primaris de neurones de ratolí en presència de Dex i Zn (Kramer *et al.*, 1996b)

Respecte a la MT-III no existeixen estudis que indiquin el paper de la IL-6 en la seva regulació, com passa amb la IL-1.

En aquesta tesi s'han realitzat tres treballs que aporten noves dades sobre el paper de la IL-6 en la regulació de la MT *in vivo*, en el fetge i el cervell. En el fetge s'ha estudiat el paper de la IL-6 en la regulació de la MT en situacions d'estrès i d'inflamació, com es veurà a la Discussió. Per això s'han realitzat estudis amb un ratolí transgènic deficient pel gen de la IL-6, un *Knock-out* cedit gentilmente pel Dr. Bluethmann (Kopf *et al.*, 1994), que aporta un paper principal de la IL-6 en la inducció hepàtica de la MT en situacions d'estrès i d'inflamació. També s'ha estudiat la regulació de la MT-I+II en el cervell amb aquest *Knock-out*, en situacions d'estrès i d'inflamació. A títol d'informació, el 1994 va aparèixer un altre *knock-out* per la IL-6 (Fattori *et al.*, 1994) amb característiques similars.

Per una altra banda s'han fet estudis sobre la MT-I+II i la MT-III amb un ratolí que sobreexpressa la IL-6 en cèl·lules glials (Campbell *et al.*, 1993; Hernández *et al.*, 1997b). Aquest treball suggereix el possible paper de la MT com una proteïna *acute phase* en el cervell, suggerint un paper protectiu de la MT. També estudis amb rata injectant i.c.v. IL-6 han mostrat una inducció de la MT-I+II en algunes àrees cerebrals (Hernández and Hidalgo, 1998). A més s'han realitzat cultius primaris d'astròcits i neurones de ratolí que s'han incorporat en un annex, mostrant una certa inducció dels nivells de MT-I+II en neurona per IL-6 en presència de Dex i Zn, com succeix en varis models de cultius hepàtics citats anteriorment.

Com s'ha comentat amb la IL-1, la IL-6 seria la principal responsable de la resposta de fase aguda en el fetge, i segons els resultats presentats en aquesta tesi, possiblement també en el cervell. Els mecanismes d'acció de la IL-6 en la inducció de la MT també seràn discutits més endavant, però ara podem dir que el fet d'haver-se trobat seqüències *cis* per l'element de resposta al factor nuclear de la IL-6 (NF-IL6) i seqüències associades a gens involucrats en la resposta de fase aguda (com les AABS, descrites a l'apartat del promotor) pot aclarir en certa forma el mecanisme d'acció de la IL-6 i implicar molt més encara a la MT en aquesta resposta de fase aguda de l'organisme.

Per una altra banda hi ha una certa controvèrsia respecte a la possibilitat que citocines com IL-1 ó IL-6 alliberades en la perifèria puguin entrar en el cervell. S'han identificat mecanismes de transport actiu per la IL-1 i IL-6 en el cervell (Banks *et al.*, 1991; Luheshi *et al.*, 1994). Una altra hipòtesi gira entorn la possibilitat d'entrar en el

cervell a través d'una àrea on la barrera hematoencefàlica es troba debilitada, l'organ vascular de la llàmina terminal (OVL) (Blatteis, 1990). Una tercera via que sembla més acceptada actualment seria a través de l'activació de nervis sensorials perifèrics, sense excloure les anteriors hipòtesis (Dantzer, 1994; Luheshi and Rothwell, 1996).

Interferó (IFN)

L'any 1957 Issacs i Lindenmann (Isaacs and Lindenmann, 1957) van descriure per primera vegada un factor que tenia la propietat d'interferir en la replicació viral en embrions de pollastre, i que vaq anomenar interferó (IFN).

Actualment s'ha definit bastant bé la família dels interferons, composta per interferons de tipus I, on s'inclouen els IFN- α i β , i interferons de tipus II on es localitza el IFN- γ .

L'IFN- α està produït per leucòcits, és un polipèptid d'uns 165 aa, pes molecular entre 18-22 KDa, i el seu gen està localitzat al cromosoma 9 humà i al cromosoma 4 de ratolí. Trobem fins a 16 subtipus d'IFN- α a l'home.

L'IFN- β es produeix als fibroblasts, compost per 166 aa i un pes d'uns 20-25 KDa, i el seu gen està localitzat també al cromosoma 9 humà i al cromosoma 4 de ratolí. L'IFN- α i β competeixen pel mateix receptor per exercir les seves accions.

Respecte a l'IFN- γ , aquest està produït pels limfòcits T, conté uns 133-136 aa i té un pes molecular variable entre 15-25 KDa, en funció de la glicosilació de la cadena. El gen està localitzat al cromosoma 12 humà i al cromosoma 10 de ratolí. El seu receptor és diferent de l'utilitzat pels IFNs de tipus I.

S'ha vist que cèl.lules glials poden ser productores de IFNs, i certes neurones de rata poden produir IFN- γ i astròcits de ratolí poden expressar IFN- α , β i γ durant infeccions víriques.

Les accions dels tres tipus d'IFNs són diferents. Així, els IFN- α i β es poden considerar com la primera línia de defensa en la resistència de l'hoste a una infecció vírica, abans que els sistemes immunitaris s'activin, mentre que l'IFN- γ seria produït quan els limfòcits estiguessin sensibilitzats a l'antigen viral i tindria com funció principal l'activació de diferents mecanismes immunitaris a més del propi efecte antiviral. Així, activarien cèl.lules immunitàries, el complex de alta histocompatibilitat (MHC) i receptors d'alta afinitat per immunoglobulines (Fc) (revisions sobre el IFN (Pestka *et al.*, 1987; Plata-Salaman, 1991; Williams *et al.*,

1993)). A la taula 13 estan indicades les principals accions biològiques dels diferents tipus d'IFN.

Els IFNs també són inductores directes de la MT. Així, l'administració de IFN- γ incrementa la síntesi de MT hepàtica *in vivo* (De *et al.*, 1990), al igual que l'administració d'agents inductors de l'IFN- α (Bell *et al.*, 1987).

Accions dels IFNs	
Efectes en el sistema immunitari (IFN-γ)	Efectes en el fetge
Activitat antiviral, antitumoral i antimicrobial	Regulació de les proteïnes <i>acute-phase</i> (γ)
Activació de macròfags, limfòcits i cèl.lules endotelials	Metabolisme de lípids: \uparrow síntesi colesterol (γ)
Modulació d'antigens MHC	Inhibició del citocrom P-450 (α, β i γ)
Activació de l'expressió del receptor Fc	Efectes en el cervell
Activació cèl.lules <i>Natural Killer</i>	Activitat pirogènica (α i γ)
Activació de neutròfils polimorfonucleats	Estimulació hormonal (CRF i ACTH) (γ)
Altres efectes	Inhibició de la proliferació d'astròcits (α)
Inducció cortisol a l'adrenal (α)	Modulació efecte de l'activitat neuronal (α)
Increment dels nivells sèrics de IFNs en enfermetats com rubeola (α) i AIDS (α i β)	Alteració de l'ona lenta del son (α)
Ús clínic en malalties com cancer (γ), a dosis baixes. Dosis altes creen efectes adversos	Increment de IFNs en neuropatologies com esclerosi múltiple, meningitis vírica i herpes encefàlica

Taula 13. Efectes més destacats dels IFNs. A igual que les altres citocines, els hem dividit en: efectes en el sistema immunitari, efectes en el fetge, efectes en el cervell i altres efectes. Entre parèntesi està indicat quin tipus d'IFN realitza l'efecte especificat, IFN- α (α), IFN- β (β) o IFN- γ (γ).

També s'han realitzat estudis *in vitro*. Així, fibroblasts humans mostren inducció del mRNA de la MT-II per IFN- β (Sciavolino and Vilcek, 1995), línies cel.lulars de macròfags induïdes amb IFN- γ mostren també més MT-II (Farber, 1992), al igual que en cultius primaris de cèl.lules glials de rata (Vanguri, 1995). Cèl.lules CHO tractades amb IFN- α mostren un increment dels mRNAs de les MT-I i MT-II (Morris and Huang, 1987). En un dels treballs més destacats sobre la inducció de la MT-II humana per IFN- α en neuroblastomes es va mostrar també l'existència d'una seqüència específica en el promotor humà de la MT (Friedman and Stark, 1985). És possible que aquest mecanisme sigui aquell amb què l'IFN induïx la MT en altres espècies i teixits però no està clar.

Malgrat això, en cultiu primari d'hepatòcits de rata l'IFN no mostra ser inductor de la MT, ni en presència de Dex i Zn (Coyle *et al.*, 1993). En un dels treballs aportats en aquesta tesis s'ha mostrat un efecte bifàsic d'inducció, essent inhibidor a dosis baixes i incrementant la inducció a dosis més altes (Hernández *et al.*, 1996a).

Si bé és conegut el paper de l'IFN en infeccions virals, poc és conegut el seu possible paper en situacions d'estrès. Se sap que l'IFN γ es troba disminuït en la

sang en situacions d'estrès (Dobbin *et al.*, 1991), però no se sap si té algun paper en la inducció de la MT en aquestes situacions. Un dels treballs aportats en aquesta tesi estudia el possible paper de l'IFN en la regulació de la MT en situacions d'estrès i d'inflamació (Hernández *et al.*, 1997a). Per aquest motiu s'ha utilitzat un ratolí transgènic deficient pel receptor de l'IFN- γ , IFN- γ R. Aquest *Knock-out* ha estat cedit gentilmente per la Dra Maria L. Arbonés (Arbonés *et al.*, 1994) per realitzar aquests estudis. Si bé l'IFN- γ no té cap paper en la inducció de la MT hepàtica ni cerebral durant l'estrès, sembla tenir un cert efecte inhibitori en la via d'activació de la MT per LPS. En l'apartat corresponent es realitzarà la discussió. A més del *knock-out* utilitzat aquí existeixen altres, un amb una interrupció del gen de l'IFN- γ (Dalton *et al.*, 1993), un segon amb la deficiència localitzada en el receptor de l'IFN- γ (Huang *et al.*, 1993) i un tercer amb la deficiència en el receptor de l'IFN- α (Muller *et al.*, 1994).

Finalment, respecte la MT-III tampoc es tenen estudis sobre un possible paper dels IFNs en la seva regulació la cervell.

Factor de necrosi tumoral (TNF)

El factor de necrosi tumoral (TNF) va ser descobert l'any 1975 en observar-se un factor sèric que causava la necrosi de tumors (Carswell *et al.*, 1975). Ja el segle passat es coneixien els efectes del TNF, quan es describien els efectes de cultius bacterians en la necrosi de tumors humans. Malgrat aquest efecte observat, els efectes tòxics associats van fer abandonar aquesta teràpia. Avui sabem que la endotoxina d'aquests cultius era la responsable de la inducció de TNF en aquests tumors inhibint el seu creixement.

El TNF tal com es coneix avui és una citocina pleiotròpica. Són tres els gens que conformen el grup dels TNFs, el TNF- α i les limfotoxines (LT) α (anomenada també TNF- β) i β , productes d'una duplicació gènica. Només comentarem els efectes del TNF- α i del TNF- β .

El TNF- α , denominat també caquectina per haver-se observat en estudis de caquèxia (fenomen relacionat amb l'alteració nutricional en enfermetats cròniques bacterianes, parasitàries o càncer), és un polipèptid de 157 aa en els humans (17350 KDa) i de 156 aa en ratolí, derivats d'un precursor de 233 aa (humans) i 235 aa (ratolí) respectivament. La molècula activa és un trímer. El TNF- α és produït per macròfags, i també pot ser produït als macròfags de molts teixits com pulmó, fetge,

mèdulla o astòcits i microglia al cervell. També limfòcits T o cèl·lules Natural Killer poden produir TNF- α .

El TNF- β és denominat també limfotòxina- α per ser produït per limfòcits. També pot ser produït per leucòcits i algunes línies cel·lulars, a més d'astròcits i microglia. Té uns 20-25 kDa de pes molecular, amb 171 aa a l'home i 169 aa al ratolí.

Els gens del TNF- α i el TNF- β estan localitzats en el cromosoma 6 humà i murí.

El receptor a través del qual els TNFs exerceixen les seves accions és el mateix. De receptors pel TNF hi ha dos diferents, denominats TNFR1 i TNFR2, ja que tenen un pes molecular de 55 kDa i 75 kDa respectivament (per veure revisions sobre TNF (Le and Vilcek, 1987; Beutler and Cerami, 1988; Plata-Salaman, 1991; Rink and Kirchner, 1996)). A la taula 14 estan descrites les principals accions biològiques del TNF.

Accions del TNF	
Efectes en el sistema immunitari	Efectes en el fetge
Activitat antitumoral i antiviral (α i β)	Regulació de les proteïnes <i>acute-phase</i> (α)
Activatada citotòxica (α i β)	Metabolisme dels aa i proteïnes (α)
Inducció a IL-1 i IL-6 i altres citocines (α)	Metabolisme mineral: \downarrow Zn en sèrum (α)
Activació de neutròfils i de molècules d'adhesió (α)	Metabolisme de lípids:
Efecte quimiotàctic en monòcits (α)	\uparrow síntesi àcids grassos (α)
Increment de toxicitat en eosinòfils (α)	\uparrow síntesi colesterol (α i β)
Activació de granulòcits (α)	Interacció amb hormones (α)
Modulació d'antigenes MHC (α)	Inhibició del citocrom P-450 (α i β)
Increment de l'activitat procoagulant a cèl·lules endotelials (α)	
Altres efectes	Efectes en el cervell
Activació d'osteoclasts (α i β)	Febre (activant prostaglandines) (α)
Estimulació de reabsorció de l'os (α i β)	Regulació neuroendocrina:
Regulació de la fam (α)	\uparrow CRF, ACTH i PRL (α); \downarrow TRH i TSH (α)
Increment dels TNFs en diverses malalties: Malària, diabetis, infeccions bacterianes, artritis, AIDS, càncer i transplantaments	Diferenciació d'astròcits (α i β)
	Astrogliosi i resposta inflamatoria en resposta a trauma o infecció (α i β)
	Regulació de l'activitat neuronal i sinàptica (α)
	Increment dels TNFs en neuropatologies com AIDS, Alzheimer o esclerosi múltiple

Taula 14. Principals efectes o funcions del TNF. Les hem dividit, com a les anteriors citocines, en: efectes en el sistema immunitari, efectes en el fetge, efectes en el cervell i altres efectes. Hem destacat entre parèntesi si l'efecte es produït pel TNF- α (α) o pel TNF- β (β).

El TNF s'ha mostrat com una citocina amb moltes funcions solapades a les de la IL-1. Les dues citocines són pleiotròpiques per les seves variades accions biològiques.

El TNF- α és un inductor directe de la síntesi de la MT hepàtica *in vivo* (De *et al.*, 1990; Liu *et al.*, 1991; Sato *et al.*, 1992), a més del pulmó i cor però no és induïda al

In vitro el TNF- α és capaç d'incrementar també els nivells de MT, com a fibroblasts humans (Sciavolino and Vilcek, 1995), però necessita de la presència de dex i Zn en cultiu primari d'hepatòcits (Coyle *et al.*, 1993). En certes línies cel·lulars s'ha determinat un paper protector de la MT envers els efectes citotòxics causats pel TNF *in vitro* (Sciavolino *et al.*, 1992; Leyshon-Sorland *et al.*, 1993).

En el cervell no hi ha estudis sobre el possible paper del TNF en la regulació de la MT-I+II, ni tampoc de la MT-III.

En un dels treballs de la present tesi també s'han realitzat estudis sobre la inducció de la MT per TNF en cultiu primari d'hepatòcits de rata, amb una certa inducció (Hernández *et al.*, 1996a). A més d'aquest treball, se'n presenta un altre on s'han realitzat estudis sobre la regulació de la MT hepàtica en ratolins *knock-out* pel receptor de tipus 1, TNFR1, tant en situacions d'estrès com d'inflamació. Aquests animals han estat cedits gentilmente pel Dr. Horst Bluethmann (Rothe *et al.*, 1993), i resulten ser uns animals resistents a baixes dosis de LPS.

Aquesta deficiència no sembla atribuir cap paper al TNF en la inducció hepàtica de la MT durant l'estrès, si bé es coneix que l'estrès pot incrementar els nivells de TNF en sang (Yamasu *et al.*, 1992), però sí té un cert paper en episodis d'inflamació. Aquest treball serà tractat a la discussió. Actualment existeix un altre *knock-out* pels dos receptors, d'aquesta forma sí s'aconsegueix bloquejar totalment les accions dels TNFs (Bruce *et al.*, 1996).

De moment es desconeixen els possibles mecanismes del TNF per poder induir la MT, però en vista a la seva pleiotropia, és possible que puguin realitzar aquests efectes a través de la IL-1 o la IL-6. Aquest punt serà tractat també a la discussió.

2.2.6. Altres inductors

Molts altres compostos són inductors, directes o no, de la MT (veure taula 4). Cal destacar-hi l'AMPC i la proteïna kinasa C o PKC els quals ja han estat citats com a mediadors de la resposta hormonal intracel·lular, i que *per se* també tenen un efecte inductor de la MT (Imbra and Karin, 1987; Nebes *et al.*, 1988).

Altres agents inflamatoris, apart de la endotoxina, també indueixen la MT, com ara galactans (Maitani and Suzuki, 1981), polímers com el dextrà (Maitani and Suzuki, 1982) o la turpentina (Sobocinski *et al.*, 1981) que incrementen a la vegada els nivells de metall.

Apart d'aquests inductors, hi podem destacar altres que no han estat examinats en els anteriors apartats. Així, molts agents citotòxics exerceixen un efecte inductor, el qual no és directe, ja que el que provoquen aquestes substàncies és un estrès associat mitjançant una toxicitat cel·lular, augment de radicals lliures, etc... Compostos com els agents alquilants (Kotsonis and Klaassen, 1979), el paraquat (Sato *et al.*, 1989), el tetraclorur de carbó o CCl₄ (Oh *et al.*, 1978), etanol (Waalkes *et al.*, 1984), cloroform (Sas and Bremner, 1979) o àcid kainic (amb forts efectes convulsius) (Dalton *et al.*, 1995) tenen aquest efecte.

El peròxid d'hidrogen sembla tenir un efecte directe després d'haver-se observat les seqüències ARE i NF-IL6 al promotor del gen de la MT (rata i truita) les quals serien induïdes pel H₂O₂, encara que també podria interaccionar amb els MREs.

Altres drogues com la estreptozotocina (Failla and Kiser, 1981), la indometacina (Sobocinski *et al.*, 1979) i agents quelants (Goering *et al.*, 1985) tenen un efecte inductor sobre la MT.

Promotors de tumors i oncògens presenten també inducció de la MT. Així, els esters de forbol (Brady *et al.*, 1987) indueixen la MT (mitjançant la PKC), i també oncògens com *Ha-ras* (Schmidt and Hamer, 1986) i *c-jun* (Bauknecht *et al.*, 1993).

2.3. Interaccions entre inductors en situacions d'estrès i d'inflamació

A la figura 5a i 5b podem veure representades les principals interaccions citocines (IL-1, IL-6, IFN i TNF), l'eix HPA (CRF, ACTH i glucocorticoides) i la MT en situacions d'estrès (5a) i d'inflamació (5b).

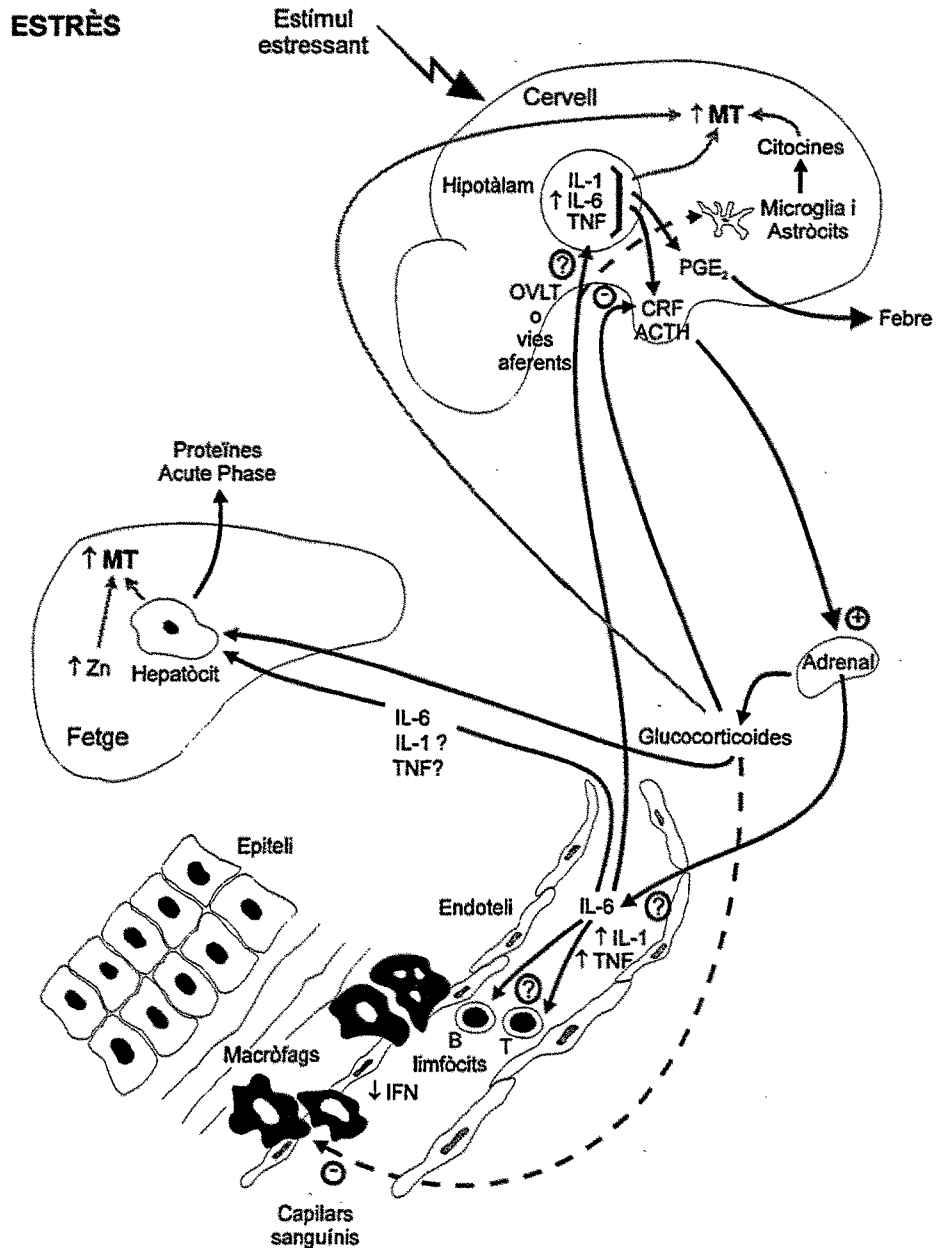


Figura 5a. Esquema de les principals interaccions entre les citocines estudiades, l'eix HPA i la inducció de la MT en l'organisme en una situació d'estrès. L'estímul estressant incrementaria en el començament de totes les interaccions el CRF i l'ACTH.

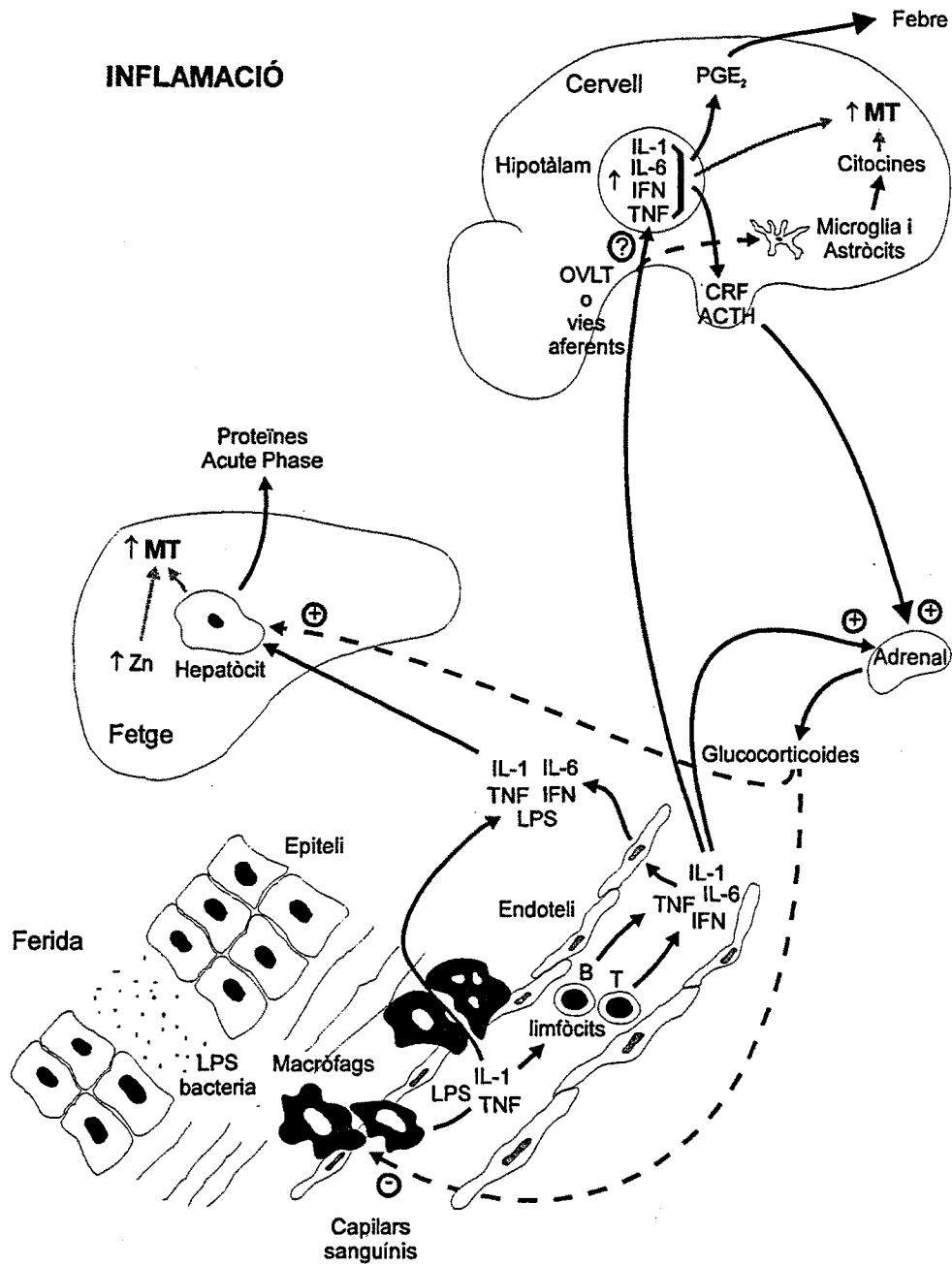


Figura 5b. Esquema de les principals interaccions entre les citocines estudiades, l'eix HPA i la inducció de la MT en l'organisme en una situació d'inflamació, en aquest cas causada per una ferida. El principi de totes les interaccions tindria lloc a l'epiteli on es produiria la interiorització del LPS o d'una bacteria.

3. Funcions

Vàries són les funcions en què s'impliquen les MTs. Avui segueix sense estar molt definit el perquè una proteïna tan altament conservada al llarg de l'evolució no tingui una funció clara i definida a l'organisme. Es pensava que el fet d'estar tan conservada podia ser clau, assignant a la MT un paper indispensable a l'organisme. Dos fets han reobert el debat sobre la funcionalitat de les MTs:

- 1.) L'aparició de la MT-III, l'única MT amb una funció clarament definida, al menys *in vitro*.
- 2.) La creació d'animals transgènics *knock-outs*, per les MT-I i MT-II, els quals sobreviuen perfectament, i per la MT-III, que també neixen i viuen normalment.

Tots els estudis realitzats fins ara han portat a la conclusió generalitzada que les MTs tenen una sèrie de funcions sense que cap d'elles sigui més remarcable que les altres per la seva singularitat, potser exceptuant la MT-III. D'aquesta forma, les implicacions funcionals otorgades a les MTs s'exposen a continuació, ordenades de la següent forma: Homeòstasi del Zn i del Cu; Detoxificació de metalls pesants; Reservori de cisteïnes; Antioxidant; MT-III; MT-IV. En aquests dos últims apartats farem referència a les dues MT específiques de teixit, mentre la resta de funcions són explicades en referència a les MT-I i MT-II.

3.1. Homeòstasi del Zn i del Cu

El Zn i el Cu són elements traça essencials a l'organisme. És molt destacable que el Zn, per exemple, formi part de llocs actius en més de 300 enzims i proteïnes en tot l'organisme. Així, és de gran importància que existeixi un sistema regulador del magatzem, transport i distribució intracel·lular del Zn i el Cu a l'organisme, més quan la "alliberació" dels metalls en els teixits o cèl·lules ocasiona la majoria de les vegades toxicitat cel·lular. La MT està implicada en aquest control dels metalls de diverses formes.

En etapes fetals i en nounats de moltes espècies s'han vist nivells elevats de MT en el fetge (Waalkes and Klaassen, 1984; Webb, 1987). S'atribueix a la MT un paper de reservori cel·lular de Zn, pels processos de diferenciació o proliferació cel·lular, ja que en aquestes etapes de ràpid creixement s'utilitza Zn en processos de divisió cel·lular que involucra síntesi de DNA, RNA i proteïnes. Un paper similar

podria atribuir-se al Cu en el fetge fetal. En la vida adulta, trobem la MT generalment en concentracions més baixes que en la vida fetal o noutatal, on sol estar bastant incrementada. En ratolí és la MT-I la isoforma més incrementada i en rata no hi ha practicament variacions (Lehman-McKeeman *et al.*, 1991).

També s'implica la MT en el control de l'absorció intestinal de Zn i Cu, amb una relació inversa entre l'eficiència d'absorció del metall i la unió del metall a la MT intestinal (Menard *et al.*, 1981; Cousins, 1985). La MT present al teixit intestinal és induïda per la presència de Zn o Cu a la dieta (Richards and Cousins, 1977; Hall *et al.*, 1979). Per una altra banda, la MT podria actuar com transportadora de Cu de la dieta ja que s'ha observat que la MT entra a la circulació des del fetge unida al Cu (Hartmann *et al.*, 1993). Les dietes deficientes en Zn fan disminuir els nivells de MT en diferents òrgans de l'organisme (Waalkes, 1986; Gasull *et al.*, 1994b).

Si bé la MT és una proteïna típicament citoplasmàtica, també pot trobar-se extracel·lularment, ja que pot creuar la membrana cel·lular.

Els nivells incrementats de MT que s'han observat en diferents situacions sembla que són conseqüència dels canvis que es presenten en els nivells de MT dels òrgans com fetge o ronyó. *In vitro* s'ha vist aquest fenomen (Hidalgo *et al.*, 1991a) en cultiu primari d'hepatòcits incubats amb Zn i Cu, i els nivells creixents de MT observats extracel·lularment són deguts a la mort cel·lular que ocasionen els metalls. Tot i això, *in vivo* s'ha suggerit una acció permisiva per part dels glucocorticoides per secretar MT des del fetge a la circulació (Hidalgo *et al.*, 1988c).

Són molts els enzims que requereixen Zn i Cu per desenvolupar la seva activitat i una de les implicacions funcionals de la MT podria ser la de donar metalls a altres enzims (Petering and Fowler, 1986). En aquest sentit s'ha vist com alguns apoenzims com ara la anhidrasa carbònica, la fosfatasa alcalina o la superòxid dismutasa poden ser reactivats *in vitro* després d'incubar-les amb Zn-MT o Cu-MT (Li *et al.*, 1980; Udom and Brady, 1980; Geller and Winge, 1982). La capacitat donadora dels metalls sembla ser vàlida *in vitro*, mentre que *in vivo* no està del tot estudiada i necessita encara més demostracions.

L'administració d'un inhibidor de la síntesi del GSH, com la sulfoximina de butionina (BSO), incrementa els nivells de MT en fetge i ronyó *in vivo* (Hidalgo *et al.*, 1990b; Suzuki and Cherian, 1990; Giralt *et al.*, 1993), així com amb dosis baixes de BSO en cultiu primari d'hepatòcits (dades submeses a publicació). Una possible explicació de l'augment de la MT amb l'administració de BSO seria que la modificació dels nivells de GSH produïrien un canvi en el metabolisme del Zn i/o del Cu, ja que el GSH és considerat com el primer captador de metall quan aquest entra a la cèl·lula, i és una mol·lècula d'acció immediata en la protecció cel·lular (Shimizu

and Morita, 1990). D'aquesta forma deixa més Zn i Cu lliure intracel·lularment, i es pot així induir transcripcionalment a la MT. El GSH pot transferir Cu altres proteïnes com la MT (Freedman *et al.*, 1989; Brouwer and Brouwer-Hoexum, 1991; Brouwer and Brouwer-Hoexum, 1992; Ferreira *et al.*, 1993), controlant així els nivells intracel·lulars de metall.

Totes aquestes dades impliquen un paper regulador de la MT en el metabolisme del Zn i del Cu, al menys a nivell intracel·lular.

3.2. Detoxificació de metalls pesants

Una de les implicacions funcionals més clares de la MT és en la toxicitat per metalls pesants. Donada l'alta conservació dels llocs o elements reguladors de metalls que s'observa en la seqüència gènica es pot afirmar que un dels principals papers de les MTs és la resposta cel·lular enfront ion metàl·lics, que protegeix la cèl·lula dels seus efectes tòxics i que confereix a la cèl·lula resistència envers l'estrès ocasionat en molts tipus cel·lulars.

El fet que la MT actua com un agent detoxificant de metalls tòxics, com el Cd, el Hg, l'Au o el Bi, està clarament demostrat, per exemple a través de cèl·lules no productores de MT que són sensibles al Cd (Compere and Palmiter, 1981) o en línies cel·lulars que sobreexpressen la MT i conseqüentment tenen una gran resistència al Cd (Karin *et al.*, 1983). No tan sols ha estat demostrat *in vitro*, si no també *in vivo*, després de la recent generació de ratolins transgènics *knock-outs* pels gens de la MT-I i la MT-II (Michalska and Choo, 1993; Masters *et al.*, 1994a). Així, aquests ratolins exposats a dosis tòxiques de Cd moren al cap de poc a causa principalment de necrosi hepàtica. Així, en condicions d'intoxicació per metalls s'ha demostrat el paper protector de la MT, ja que els metalls utilitzats són bastant similars químicament (Zn, Cd, ...), si bé el fet que evolutivament la MT sigui tan conservada fa pensar més que el seu paper lògic a l'organisme hauria de ser més proper a la participació en el metabolisme de metalls essencials que no pas de metalls tòxics.

Una vegada ja s'ha establert la unió Cd-MT, el complexe resulta ja inert. El complexe és secretat a la circulació; la Cd-MT és altament tòxica en el ronyó després de seva reabsorció tubular (Cherian *et al.*, 1976). El complexe és ràpidament degradat pels lisosomes de les cèl·lules proximals tubulars (Foulkes, 1978) alliberant el Cd el qual indueix la MT renal. De totes formes el Cd alliberat sempre causa llesions cel·lulars al ronyó.

3.3. Reservori de cisteïnes

Una altre de les implicacions funcionals de la MT és deguda a la seva gran proporció de cisteïnes presents a la seva cadena polipeptídica (un 30% dels seus aa). D'aquesta forma la MT podria ser font i reservori de cys (Kägi and Nordberg, 1979), en especial durant el desenvolupament, ja que és quan els nivells de la MT es mantenen alts. S'ha observat l'augment dels nivells de MT en el fetge quan s'administra cisteïna en animals (Hidalgo *et al.*, 1990b) o amb l'administració de glutatió (GSH), la reserva de cisteïnes no proteiques més important de la cèl.lula (Hidalgo *et al.*, 1990b; Giralt *et al.*, 1993). Per una altra banda l'administració de BSO incrementa els nivells de MT en fetge i ronyó *in vivo* (Hidalgo *et al.*, 1990b; Suzuki and Cherian, 1990; Giralt *et al.*, 1993), així com amb dosis baixes de BSO en cultiu primari d'hepatòcits (dades submeses a publicació). El mecanisme a través del qual la cisteïna pot incrementar els nivells de la MT és desconegut encara, però una interrelació entre el GSH i la MT sembla clara.

3.4. Antioxidant

S'ha mostrat en moltes ocasions la capacitat de la MT com proteïna antioxidant. El fet de ser induïda per gran quantitat d'agents que provoquen un estrès oxidatiu important a la cèl.lula fa que se li atribueixi aquest paper. El metabolisme cel.lular produeix un increment de productes tòxics com els radicals lliures d'oxigen que ocasionen dany oxidatiu important intracel.lularment en situacions com exposicions a radiacions ionitzants, llum ultraviolada o agents alquilants (Sato and Bremner, 1993).

A la cèl.lula es troben altres tipus de molècules antioxidants com la vitamina C i E o el GSH, i tot un sistema enzimàtic antioxidant, com catalases, peroxidases,... (Meister and Anderson, 1983; Slater, 1984; Camhi *et al.*, 1995). La MT ha estat sovint implicada en funcions antioxidants com per exemple inhibint la peroxidació lipídica en membranes cel.lulars amb agents prooxidants (Thomas *et al.*, 1986), que segresta radicals hidròxils (Thornalley and Vasak, 1985) o que mostra un efecte protector envers la degradació de DNA per radicals hidròxils (Abel and de Ruiter, 1989). Altres proves per comprovar el paper de la MT han estat realitzades en línies cel.lulars d'hàmmster que mostren una major protecció del DNA envers el radical hidroxil quan s'incrementen els nivells de MT, especialment en el nucli, situació que és revertida quan les cèl.lules expressen un plàsmid *antisense* per a la MT

(Chubatsu and Meneghini, 1993). Els treballs més clars en aquest sentit són els realitzats amb *knock-outs* pels gens de la MT-I+II. Així, *in vitro*, cèl·lules embrionàries d'aquests ratolins *knock-outs* mostren una sensibilitat més acusada a l'estrès oxidatiu ocasionat per *tert*-butilhidroperòxid i paraquat (Lazo *et al.*, 1995).

Tots aquests estudis han estat fets *in vitro*, però *in vivo* s'ha observat també aquest efecte. Així, en rates sotmeses a un estrès important com la privació hídrica i de menjar s'incrementa sensiblement la peroxidació lipídica en el fetge causada per l'alliberament de radicals lliures (Hidalgo *et al.*, 1988a). Els nivells de MT són elevats en aquestes situacions. Altres treballs mostren un paper protector de la MT en altres teixits, com en el cor envers la peroxidació lipídica (Sato *et al.*, 1988), o en el cervell (Shiraga *et al.*, 1993),

Estudis sobre la inducció de la MT per endotoxina bacteriana i citocines fan considerar la MT com una proteïna de la resposta aguda de l'organisme o *acute phase* (com hem vist en la regulació de citocines i com comentarem a la discussió) en part degut a la producció de radicals lliures que generen els monòcits i granulòcits. El recent descobriment de l'efecte directe del H₂O₂ sobre el promotor del gen de la MT en rata i truita (veure apartat del promotor) sembla implicar definitivament la MT com una proteïna induïda durant l'estrès oxidatiu i amb una funció antioxidant intracel·lular.

3.5. MT-III i MTs cerebrals.

El descobriment de la MT-III a l'any 1991 (Uchida *et al.*, 1991) i la seva posterior caracterització (Palmiter *et al.*, 1992) va ocasionar un gir important en la investigació de les metal·lotioneïnes. Per primera vegada s'havia implicat directament una MT a una funció ben definida, com era la inhibició del creixement de neurones *in vitro* (Uchida *et al.*, 1991). Per aquest motiu va ser anomenada en un principi com factor d'inhibició del creixement (*growth inhibitory factor*) o GIF. Posteriorment es va poder identificar la regió responsable d'aquest efecte, resident a la regió N-terminal (Sewell *et al.*, 1995; Uchida and Ihara, 1995), a causa principalment de la substitució de dues serines per dues prolines a les posicions 7 i 9. A més, aquesta regió tenia una inserció d'un aa a la posició 5. Es va suggerir que aquesta diferent disposició espacial li confereix la seva funció biològica, sense que estigui determinat el mecanisme a través del qual s'efectua. Com es va apuntar a l'introducció aquesta regió podria ser un dels llocs antigènics de la proteïna.

Cal comentar que el descobriment de la MT-III es va produir quan els seus descobridors, Uchida *et al.*, buscaven un factor cerebral inhibitor en cervell humà diagnosticat amb la malaltia d'Alzheimer (AD). Així, la MT-III sembla estar disminuïda en cervells diagnosticats amb AD, dèficit que no ha estat posteriorment confirmat per altres grups (Erickson *et al.*, 1994) (dades del nostre laboratori). A partir d'aquest descobriment s'han realitzat una sèrie d'estudis sobre la MT-III que resumirem a continuació.

La MT-III és expressada predominantment en neurones que segreguen Zn en les seves vesícules sinàptiques (Masters *et al.*, 1994b). La localització de la MT-III en aquestes neurones, anomenades neurones Zn-èrgiques i situades a l'hipocamp, suggereix un paper de la MT-III en aquestes neurones, ja que podria facilitar el transport del Zn fins la vesícula sinàptica i fins i tot s'ha suggerit que podria estar implicada en funcions superiors del SNC com l'aprenentatge i la memòria.

S'han realitzat altres estudis amb diferents models de lesions cerebrals. Així, s'ha vist com la MT-III té un patró diferenciat en traumes cerebrals, segons el tipus de lesió. En conjunt s'observa un decreixement inicial de l'expressió de la MT-III per veure's dies després del trauma un increment de la MT-III en el voltant de la lesió provocada en el cervell, especialment en els astròcits reactivats (Anezaki *et al.*, 1995; Hozumi *et al.*, 1995; Yuguchi *et al.*, 1995; Inuzuka *et al.*, 1996). Amb aquests estudis s'ha relacionat la MT-III en un paper reparador del teixit cerebral per trauma o lesió, així com en el control del creixement de neurites després de la lesió.

No s'han estudiat les altres isoformes en aquests experiments, MT-I i MT-II, si bé s'ha vist un increment d'aquestes isoformes en AD (Duguid *et al.*, 1989; Uchida, 1993; Nakajima and Suzuki, 1995), danys causats per àcid kainic (Dalton *et al.*, 1995; Zheng *et al.*, 1995), isquemia (Neal *et al.*, 1996), 6-hidroxidopamina (Rojas *et al.*, 1996) i envelliment (Suzuki *et al.*, 1992). En resum, tots aquests resultats suggereixen que la MT-I i MT-II cerebral podria participar en la protecció cel·lular prevenint l'efecte dels radicals lliures en el cervell.

La generació de ratolins transgènics va permetre establir altres estudis sobre la MT-III. D'aquesta forma, es van desenvolupar dos transgènics, l'un de sobreexpressió de la MT-III humana (hMT-III) (Erickson *et al.*, 1995) i l'altre *knock-out* pel gen de la MT-III (també denominat MT-III^{-/-}) (Erickson *et al.*, 1997).

Les característiques més importants dels estudis realitzats amb aquests dos models són:

- 1.) Aquests dos models de ratolins semblen ser completament normals en el seu desenvolupament i creixement.

- 2.) El ratolí MT-III^{-/-} mostra un 10% menys de Zn total en el cervell i el hMT-III mostra un 40% més.
- 3.) La MT-III no influeix en la toxicitat per Zn o Cd en el cervell.
- 4.) Ni la falta ni l'excès de MT-III influeixen en l'aprenentatge i la memòria.
- 5.) La MT-III sí sembla protegir en situacions excitotòxiques. Així, convulsions induïdes per àcid kainic comporten una alliberació del Zn de les vesícules de les neurones Zn-èrgiques, alliberació que comporta que juntament amb glutamat s'activin receptors post-sinàptics, i que es produeixi una excitació neuronal i un augment considerable del contingut de Zn a les neurones. Així, presenta més mort neuronal el ratolí MT-III^{-/-}, només a CA3 de l'hipocamp. El ratolí hMT-III presenta menys lesió. La MT-III podria també funcionar com antioxidant cel·lular.

Per una altra banda, en estudis *in vitro* de línies cel·lulars amb expressió constitutiva de la MT-III però no de la MT-I, la MT-III inhibia el creixement d'aquestes en situacions de dèficit de Zn, i a més competia pel Zn amb altres metal·loproteïnes depenents de Zn, efecte que no es veia amb la MT-I, la qual no competia (Palmiter, 1995). A causa de la importància adquirida per la MT-III i el nou enfoc que han sofert les MTs cerebrals hem elaborat la següent taula d'implicacions funcionals descrites per les MTs cerebrals (taula 15).

Implicacions funcionals de les MTs cerebrals	
Fisiològiques	
<ul style="list-style-type: none"> • Unió i distribució d'ions metàl·lics com Zn i Cu • Regulació de la biosíntesi i activitat de les metal·loproteïnes • Citoprotecció envers dany ocasionat per metalls pesants • Citoprotecció contra la alliberació de radicals lliures • Compartimentació del Zn, enzims depenents de Zn i factors de transcripció entre astròcits i neurones • Eliminació de metalls pesants del fluid cerebrospinal i de l'espai extracel·lular entre epitel·li del plexus cloroide, cèl·lules endodurals i astròcits • Neuromodulació de la transmissió glutamatèrgica i GABAèrgica, particularment en les cèl·lules neuronals Zn-èrgiques productores de MT-III 	
Patològiques	
<ul style="list-style-type: none"> • Regulació decreixent de la MT-III en situacions perturbadores de la homeostàsi del Zn, associades amb un ràpid creixement de neurites i la formació de nusos neurofibrilars característics de les plaques amiloïdes en l'enfermetat d'Alzheimer • Regulació creixent de la MT-III en llesions o traumes del CNS, que suggereixen a la MT-III en un paper reparador de teixit, que s'implica en el control del creixement de les neurites • Reducció de la MT en situacions de reduït potencial redox i increment de de la sensibilització cel·lular a l'estrès oxidatiu així com al dany neurotòxic dels metalls pesants 	

Taula 15. Principals efectes o implicacions funcionals de les MTs en el cervell. Moltes d'elles ja han estat comentades en el text. Taula adaptada de (Aschner *et al.*, 1997).

3.6. MT-IV

La MT-IV va ser descoberta a l'any 1994 (Quaife *et al.*, 1994). Només s'ha fet una estudi posterior (Liang *et al.*, 1996). El que s'ha conegut sobre ella és la seva expressió específica a l'epiteli escamós estratificat, i és present a la pell, llengua i part de l'estómag, peu i cua de ratolí. *In vivo* lliga Zn i Cu, per la qual cosa s'ha suggerit que la MT-IV podria participar de diverses formes en la protecció d'aquestes estructures estratificades de queratinòcits:

- 1.) Podria participar en la diferenciació dels queratinòcits, ja que alguns estudis proven que el Zn accelera la unió de la queratina. Estudis amb dietes deficientes de zinc van mostrar que la apo-MT formada era majoritàriament degradada i en part podria ser responsable de la no diferenciació del queratinòcit.
- 2.) Podria participar en mecanismes de protecció contra la toxicitat per metalls. L'expressió de MT-IV és incrementada en les parets estomacals de ratolins exposats a alts nivells de Zn en la seva beguda. També podria protegir l'organisme de l'accés d'alts nivells de metall a la circulació.

S'ha observat l'expressió de les 4 isoformes en el teixit decidual maternal de ratolí (Liang *et al.*, 1996). Així, la MT-IV és expressada temporalment en aquest teixit on es veu una expressió coordinada dels 4 gens i es suggereix que la MT-IV podria estar participant en el metabolisme de metalls durant l'embrac, encara que la raó per la qual les 4 isoformes són expressades d'aquesta forma redundant no se sap. A més, el fet que ratolins *knock-outs* per la MT-I i MT-II tinguin un desenvolupament aparentment normal obre interrogants sobre la essencialitat de les 4 isoformes en el teixit decidual.

Objectius

OBJECTIUS

L'objectiu d'aquest treball és l'estudi de la regulació de les MTs per diversos factors:

- Paper del Zn, glucocorticoides i citocines en l'expressió de les MTs hepàtiques i cerebrals de rata i ratolí, durant situacions fisiològiques com la inflamació i l'estrès.

Treballs

Treball 1

**Hernández, J., Giralt, M., Beloso, E., Rebollo, D. V., Romero, B.
and Hidalgo, J. (1996).**

**Interactions between metallothionein inducers in rat liver and
primary cultures of rat hepatocytes.**

***Chemico-Biological Interactions*, 100: 27-40.**



Interactions between metallothionein inducers in rat liver and primary cultures of rat hepatocytes

J. Hernandez^a, M. Giralt^a, E. Belloso^a, D.V. Rebollo^b,
B. Romero^b, J. Hidalgo^{*a}

^a*Departamento de Biología Celular y Fisiología, Unidad de Fisiología Animal, Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de Barcelona, Bellaterra, Barcelona 08193, Spain*

^b*División de Isótopos, Centro de Investigaciones Energéticas Medioambientales y Tecnológicas, Avenida Complutense 22, Madrid 28040, Spain*

Received 27 July 1995; revision received 13 November 1995; accepted 16 November 1995

Abstract

The interaction of Zn, stress and endotoxin on liver metallothionein (MT) regulation has been studied in the rat. Zn, stress and endotoxin increased liver MT levels significantly, by 12-, 5- and 8-fold, respectively. The previous administration of Zn to stress or endotoxin treatments increased MT levels by 35- and 42-fold, respectively, indicating a synergistic effect in both cases. In contrast, when liver MT was preinduced by stress, MT levels were further increased by endotoxin only in an additive manner. In another experiment where liver MT induction by stress was studied in control rats and in rats with preinduced MT by Zn, endotoxin or stress, it was found that Zn pretreated animals had higher MT-I mRNA levels than endotoxin- or stress-pretreated ones. No synergisms between dexamethasone, Zn, TNF and IFN were observed in primary culture of hepatocytes. These results suggest that the observed synergisms between Zn and other MT inducers *in vivo* in the liver is a consequence of increased Zn levels in the body and mobilization capacity, with concomitant MT synthesis.

Keywords: Metallothionein; Zinc; Stress; Endotoxin; TNF; IFN; Primary culture; Hepatocytes; Liver; mRNA

1. Introduction

Metallothionein (MT) is an ubiquitous protein that binds Zn and Cu in physiological conditions [1]. Liver MT induction by Zn [1], stress [2] and endotoxin

* Corresponding author.

[3] is a well-known phenomenon. When known, it appears that these factors act through different mechanisms. Thus, Zn induces liver MT synthesis through *cis*- and *trans*-acting factors [4]. Stress may do it through glucocorticoids and catecholamines [4,5], although the method is not fully understood [6,7]. Endotoxin induces MT synthesis through a mechanism that does not involve either metals or glucocorticoids [8], a process in which endotoxin-mediated cytokines release is likely to participate [9–11].

Such a strong regulation of MT suggests an important function for this protein. However, no significant conclusions have yet been reached about the actual physiological function [1]. A recent report suggests that the apoform of the protein could also have a significant role [12]. Previously we had observed that the preinduction of MT by Zn administration not only did not reduce the effect of stress on liver MT but potentiated it, indicating that there is not down-regulation of MT synthesis by preexisting protein levels [13]. In the present report we study the putative interactions of Zn, stress and endotoxin in liver MT regulation.

2. Materials and methods

2.1. Animals

Male adult Sprague–Dawley rats (300–400 g) were maintained under standard conditions (lights on from 07:00 to 19:00 h, temperature 22°C, food and water provided *ad libitum*) for 1 week before used. The experimental protocols were approved by the appropriate institutional review committee of the Autonomous University of Barcelona and meet the European guidelines for animal research activities.

2.2. Materials

Recombinant human IFN- γ (specific activity of 2×10^7 U/mg) and TNF- α (specific activity of 6×10^7 U/mg), both obtained from *E. Coli* recombinant sources and kindly provided by G.R. Adolf (Boehringer Institute, Vienna) through R. Pujol-Borrell (Hospital Germans Trias i Pujol, Badalona, Spain), were added to cultures at 1–500 U/ml final concentration.

ZnSO₄, CdSO₄, dexamethasone, β -mercaptoethanol and phenol were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Endotoxin (lipopolysaccharide from *E. coli* 0127:B8), BSA, insulin, HEPES, and phenyl methyl sulfonyl fluoride (PMSF) were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA). Penicilline, Streptomycin and Gentamicine were from Biological Industries (Israel). Collagenase was from Worthington (New Jersey, USA).

DMEM-F12 and fetal calf serum were from Biowhittaker (Walkersville, MD, USA), RPMI-1640 from Gibco. Cell culture plates were from Costar (Denmark). Guanidin thiocyanate was from Boehringer Mannheim (Mannheim, Germany). Nylon membranes and ³²P were from Amersham (Amersham International, Bucks, UK). Oligolabelling kits were from Pharmacia Biotech (Uppsala, Sweden).

2.3. Animal experiments

Experiment 1

The experimental design was as follows. At 10.00 h on day 1, the rats were injected i.p. with saline or ZnSO₄ (10 mg/kg). In addition, some of the rats were subjected to 4 h of immobilization stress [16] 1 h after the saline or Zn administrations. Twenty-four h after the saline or ZnSO₄ injections, the rats were injected i.p. with saline or endotoxin (1 mg/kg). The rats were killed by decapitation 72 h after the first injection, and the livers were immediately frozen at -70°C.

Experiment 2

At 10.00 h on day 1, liver MT was induced by means of i.p. injections of ZnSO₄ (10 mg/kg), endotoxin (1 mg/kg) or 8 h of immobilization stress; control rats received saline. Twenty-four h after the injections or the onset of stress, rats from all groups were either killed without further disturbance or subjected to 2 or 4 h of immobilization stress before being killed by decapitation. From each individual liver a portion of 100 mg was immediately frozen in liquid nitrogen for mRNA determinations, and the remaining was frozen at -70°C for MT and Zn measurements.

Primary cultures experiments

Isolated liver parenchymal cells were prepared from adult male Sprague–Dawley rats using the 3-step perfusion technique of Garvey and Heil [14] as modified [15]. The collagenase was perfused in RPMI 1640. The hepatocytes were washed 3 times with Dulbecco's Minimum Eagle Medium (DMEM F-12) containing 20 mmol/l HEPES, 14 mmol/l NaHCO₃, 100 µg/ml penicillin, 60 µg/ml streptomycin and 50 µg/ml gentamycin to remove non-parenchymal cells. Parenchymal cells were finally suspended (1.1×10^6 cells/ml) in DMEM F-12 medium supplemented with 20 mmol/l HEPES, 14 mmol/l NaHCO₃, 100 µg/ml penicillin, 60 µg/ml streptomycin, 50 µg/ml gentamycin, 1 µg/ml insulin and 10% fetal calf serum. Three ml of this suspension were pipetted onto 35-mm plastic culture dishes, which were previously coated with collagen following the instructions of the manufacturer. Viable cells were allowed to attach selectively for a 4-h incubation period at 37°C in a 5% CO₂, H₂O-saturated atmosphere. The medium was then removed and the cells were washed once with 2 ml of DMEM F-12 supplemented with 20 mmol/l HEPES, 14 mmol/l NaHCO₃, 100 µg/ml penicillin, 60 µg/ml streptomycin and 50 µg/ml gentamycin. Two ml of fresh DMEM F-12 supplemented with 20 mmol/l HEPES, 14 mmol/l NaHCO₃, 100 µg/ml penicillin, 60 µg/ml streptomycin, 50 µg/ml gentamycin, 10 µM ZnSO₄ to approximate a physiological plasma Zn concentration and 2 mg/ml bovine serum albumin (BSA), were added to the dishes. The hepatocytes were incubated for ~20 h at 37°C in a 5% CO₂, H₂O-saturated atmosphere. For the experimental treatments, the medium was removed, the plates washed with DMEM F-12 and 2 ml of fresh DMEM F-12 supplemented with 20 mmol/l HEPES, 14 mmol/l NaHCO₃, 100 µg/ml penicillin, 60 µg/ml streptomycin, 50 µg/ml gentamycin, 10 µM ZnSO₄ and 2 mg/ml bovine serum albumin (BSA) were added. Zn,

dexamethasone, TNF- α , IFN- γ were then added in a volume of 25 μ l to reach the desired final concentrations and the cells incubated for 24 h. The medium was then removed and the cells were gently washed with 1 ml of 10 mM Tris-HCl (pH 8.2), scraped with a spatula in 2 ml of the same buffer, and sonicated for 20 s at 4°C. After centrifugation (3000 \times g, 15 min, 4°C), the supernatant was stored at -20°C until required for MT assay.

Assays

For MT assay, the livers were homogenized with ice-cold 10 mM Tris-HCl, pH 8.2, containing 0.25 M sucrose, 2 mM 2- β -mercaptoethanol, 1 mM phenyl methyl sulfonyl fluoride and 10 mM sodium azide in a Potter-Elvehjem. The homogenates were centrifuged at 50 000 \times g (30 min, 4°C). MT levels were measured in the cytosols by a radioimmunoassay developed in our laboratory [17]. Zn levels were measured by atomic absorption spectrophotometry.

MT mRNA

All solutions, glassware and water used for RNA work were made RNase-free by treating with 0.1% diethyl pyrocarbonate (DEPC) and autoclaving. Total mRNA was extracted from livers by the method of Chomczynski and Sacchi [18]. Livers (100 mg) were homogenized with a Polytron in 1 ml of guanidin thiocyanate solution, and 0.1 volume of 2 M sodium acetate, pH 4.0, 1 volume of phenol (water saturated), and 0.2 volume of chloroform-isoamyl alcohol mixture were added to the homogenates to remove proteins. The upper phase was transferred to another tube and RNA was precipitated using isopropanol (1:1) and washed in 70% ethanol. RNA was dissolved in sterile RNase-free water and the concentration and purity determined using A_{260} and A_{260}/A_{280} ratio, respectively.

The specificity of the probes was confirmed by Northern blot hybridization. For Northern blot hybridization the RNA samples (10 μ g RNA) were denatured for 5 min at 65°C in a solution of MOPS buffer (0.2 M MOPS, 5 mM sodium acetate, 1 mM EDTA, pH 7.0), 50% formamide and 2.2 M formaldehyde. Denatured RNAs were electrophoresed in a 1% agarose gel containing 1 \times MOPS buffer and 2.2 M formaldehyde. RNAs were then transferred to nylon filters in 20 \times SSC (3 M NaCl and 0.3 M sodium citrate, pH 7.0) by capillary elution as described by Sambrook et al. [19]. RNAs were fixed exposing the nylon membrane to ultraviolet irradiation. The membranes were kept dry until the hybridization.

For Dot Blot the RNA samples (10 μ g RNA) were denatured in 6 \times SSC (1.2 M sodium chloride, 0.12 M sodium citrate pH 7.0) containing 2.5 M formaldehyde; 100 μ l were applied onto a dry nylon membrane using a Dot-Blotting minifold. RNAs were fixed as described for the Northern blot analysis.

We used a mouse MT-I cDNA, kindly provided by Dr. Richard Palmiter (University of Washington, Seattle, WA), for the hybridization probes. The cloned MT-I gene was used as template for the synthesis of 32 P (Amersham International, Amersham, Bucks, UK) DNA probes using an Oligolabelling Kit (Pharmacia Biotech). The specific activity of each probe was 1-2 \times 10⁹ disintegrations/min/ μ g. A labelled γ -actin probe (cDNA kindly provided by Dr. Albert Boronat, University of

Barcelona, through Dr. X. Avilés, Universidad Autónoma de Barcelona) was used to normalize the hybridization data. The labelled probes were purified by chromatography (Quick Spin Columns Sephadex G-50, Boehringer Mannheim, Germany).

Prehybridization and hybridization were identical for Northern blot and Dot Blot. The filters were prehybridized at 42°C for 2 h in a mixture containing 6 × SSPE (20 × SSPE: 3 M NaCl, 0.2 M sodium phosphate, 20 mM EDTA), 5 × Denhardt's solution (50 × Denhardt's: 50 mg each of polyvinylpyrrolidone, Ficoll and bovine serum albumin per ml), 0.5% SDS, 50% formamide and 100 µg/ml of denatured herring sperm DNA. Hybridization incubation was done at 42°C for 18 h containing the labelled probe in a mixture solution of 6 × SSPE, 0.5% SDS, 50% formamide, 10% dextran sulphate and 100 µg/ml of denatured herring sperm DNA. Following hybridization, filters were washed for 30 min in 1 × SSC containing 0.1% SDS. Autoradiographs were developed by exposing X-Ray film (XAR-05, Kodak, Rochester, NY) with a high-plus intensifying screen (Wolf X-Ray Corporation, NY) for 4–5 h at –70°C. For the dots, the radioactivity was quantitatively determined by scintillation counting of each dot after their excision.

2.4. Statistical analysis

The culture results were expressed as percent of control cells, were analyzed with one- or two-way ANOVA. When necessary, the data were subjected to logarithmic transformation to achieve homogeneity of variance.

3. Results

Table 1 shows liver MT and cytosolic Zn levels of the experimental groups of experiment 1. Zn ($P < 0.05$), immobilization stress ($P < 0.001$) and endotoxin ($P < 0.001$) significantly increased liver MT levels. Rats treated with Zn and later

Table 1
Effect of Zn, stress and endotoxin on liver cytosolic Zn

	Liver cytosolic Zn (µg/g)	Liver MT (µg/g wet tissue)
Saline	16.9 ± 0.4	7.2 ± 1.5
Zn	21.9 ± 3.2 ^a	87.8 ± 49.0 ^a
Endotoxin	20.9 ± 1.5 ^a	57.2 ± 7.3 ^a
Zn + endotoxin	37.3 ± 4.1 ^{a,b}	302 ± 75.0 ^{a,c,d}
Stress	18.7 ± 0.9 ^a	34.0 ± 3.7 ^a
Stress + endotoxin	24.0 ± 1.6 ^{a,c}	96.2 ± 15.0 ^{a,b,c}
Zn + stress	37.3 ± 4.1 ^{a,d}	254.0 ± 49.0 ^{a,b,d}

Data are mean ± S.E. of 6–8 rats.

Liver cytosolic zinc: ^a P at least <0.05 vs. saline rats. ^b P < 0.05 vs. Zn or endotoxin rats. ^c P < 0.05 vs. stress rats. ^d P < 0.05 vs. Zn or stress rats.

Liver MT: ^a P < 0.05 vs. saline rats. ^b P < 0.01 vs. stress rats. ^c P < 0.05 vs. endotoxin rats. ^d P < 0.05 vs. Zn rats.

subjected to stress or injected with endotoxin had further increased liver MT levels synergistically (P at least <0.05). In contrast, rats subjected to stress and later injected with endotoxin had further increased liver MT levels only additively ($P < 0.05$). Liver cytosolic Zn levels followed the same trend as MT. Endotoxin and stress decreased body weight, reflecting the voluntary restriction of food intake (not shown). Although this alone can induce liver MT, it is well-known that stress and endotoxin induce liver MT independently of food restriction (see [1,7–11]). Nevertheless, it must be acknowledged that MT induction by food restriction will add to the other MT inducers in these experiments.

Fig. 1 shows the effect of liver MT preinduction by Zn, endotoxin and immobilization stress on liver MT and MT-I mRNA response to acute immobilization stress. As expected, liver MT levels were increased by all 3 treatments (P at least < 0.05). Acute immobilization stress progressively increased liver MT levels, with significant (but small given the short time of induction for MT protein) increases at 4 h, but the induction was higher in Zn-pretreated rats (P at least < 0.05). Liver MT-I mRNA levels followed the same trend; thus, they were higher in the animals treated with Zn, endotoxin or stress, somewhat surprisingly, 24 h after their administration, and were significantly increased by acute stress in all cases ($P < 0.05$) but especially in the Zn-pretreated rats ($P < 0.05$ vs. the other groups).

The effect of Zn pretreatment was also noticeable in serum and liver Zn levels (Table 2), since those animals showed higher serum Zn levels in all cases ($P < 0.05$) and tended to it for the latter.

The effect of TNF and IFN on MT levels of cultured hepatocytes alone or combined, and with or without dexamethasone, is shown in Fig. 2. In the absence of dexamethasone, both cytokines showed an apparent biphasic effect, with tendency to decrease MT levels at low doses, and to increase them at high doses. A significant effect of the cytokines was obtained if the 3 treatments (TNF, IFN and TNF+IFN) were analyzed together with two-way ANOVA ($P < 0.01$). If analyzed separately, the effect was significant only for TNF ($P < 0.05$).

The presence of dexamethasone increased MT levels additively in all cases ($P < 0.05$), without changing substantially the pattern of response to cytokines, in that these again tended to decrease MT levels at low concentrations, and to increase them progressively at high ones. However, dexamethasone appeared to drop off MT levels at the highest cytokine (IFN and specially TNF+IFN) levels.

On the other hand (Table 3), Zn and dexamethasone addition increased MT levels as expected ($P < 0.05$), and the combination of both factors additively increased MT levels. In contrast, no synergisms were apparent when Zn, dexamethasone and IFN and TNF were combined together. Dexamethasone again tended to drop off MT levels in hepatocytes incubated with high concentrations of IFN.

4. Discussion

Zn, immobilization stress and endotoxin significantly increased liver MT levels, which is consistent with the current literature. It is unclear why such different situations cause a similar MT response, but it could be related to the control of Zn metab-

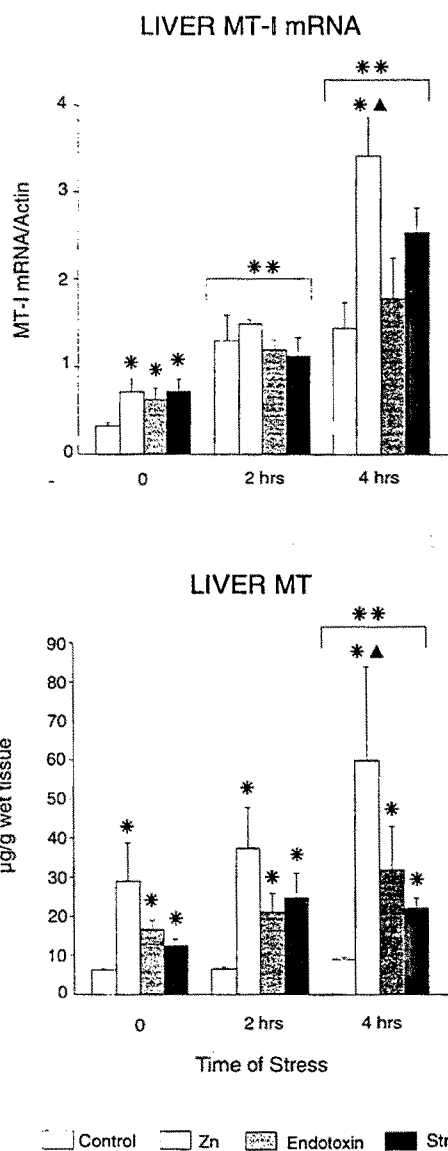


Fig. 1. Effect of liver MT preinduction by Zn, endotoxin and stress on liver MT and MT-I mRNA response to acute immobilization stress. The rats were injected or subjected to immobilization stress on day 1. Twenty-four h after the injections, the rats were either killed without further disturbance (0 h of stress) or subjected to 2 or 4 h of acute immobilization stress and then killed. Results are mean \pm S.E. of 5-6 rats.

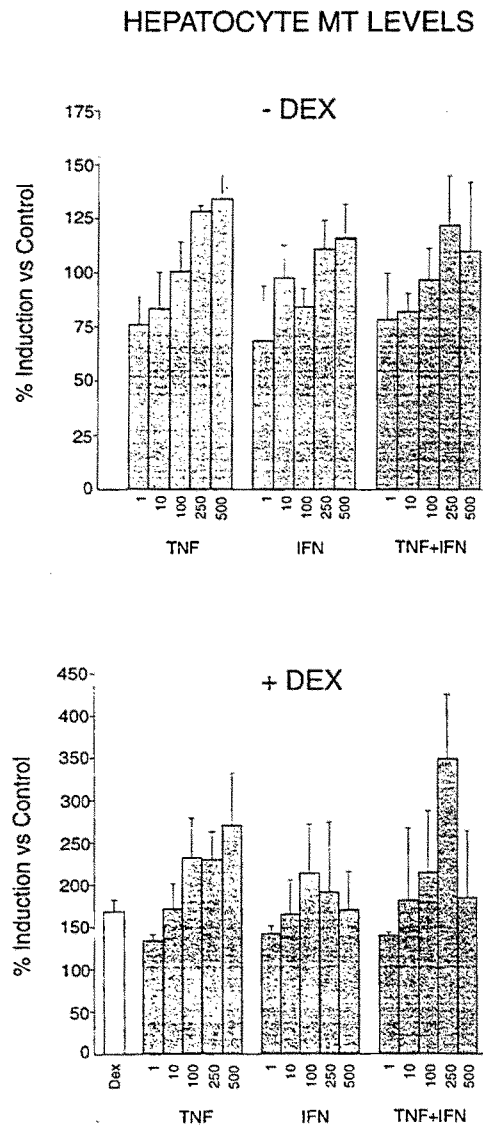


Fig. 2. Effect of TNF and IFN on MT levels of cultured hepatocytes, alone or combined, in the presence (+Dex) or absence (-Dex) of dexamethasone. Cells were incubated for 24 h with the MT inducers. Results are mean \pm S.E. ($n = 2-4$ separate preparations).

Table 2
Effect of Zn, endotoxin and stress on serum and liver cytosolic Zn

	Serum ($\mu\text{g/ml}$) and liver cytosolic Zn ($\mu\text{g/g}$)					
	Basal		Stress 2 h		Stress 4 h	
	Serum	Liver	Serum	Liver	Serum	Liver
Control	2.36 \pm 0.06 ^a	20.2 \pm 0.96 ^a	2.34 \pm 0.06 ^a	21.1 \pm 0.81 ^a	2.02 \pm 0.13 ^a	22.3 \pm 1.09 ^a
Zn	2.97 \pm 0.15 ^b	32.3 \pm 3.39 ^b	3.36 \pm 0.08 ^b	36.1 \pm 3.57 ^c	2.89 \pm 0.04 ^b	38.5 \pm 6.30 ^b
Endotoxin	1.44 \pm 0.16 ^c	25.7 \pm 2.63 ^{a,b}	1.54 \pm 0.08 ^c	26.0 \pm 2.13 ^{a,b}	1.46 \pm 0.06 ^c	29.7 \pm 2.51 ^b
Stress previous	1.58 \pm 0.08 ^c	28.3 \pm 1.05 ^b	1.67 \pm 0.08 ^c	29.5 \pm 2.85 ^{b,c}	1.39 \pm 0.06 ^c	29.8 \pm 0.82 ^b

Data: mean \pm S.E. of 5-6 rats. Rows and files were evaluated with one-way ANOVA; different letters (rows) indicate statistical differences between treatments (SNK test; $P < 0.05$).

Table 3
Effect of Zn, TNF and IFN on MT levels in primary culture of hepatocytes

	% MT induction vs. control	
	-Dex	+Dex
Control	100.0 ± 10.9	168.4 ± 13.6
50 μM Zn	402.8 ± 78.7 ^a	472.4 ± 62.8 ^a
100 μM Zn	405.8 ± 93.2 ^a	567.0 ± 22.5 ^{a,b}
50 μM Zn + 250 U TNF	527.2 ± 189.6 ^a	655.3 ± 401.0 ^a
100 μM Zn + 250 U TNF	601.4 ± 115.8 ^a	625.2 ± 316.1 ^a
50 μM Zn + 250 U IFN	633.2 ± 245.6 ^a	466.8 ± 150.9 ^a
100 μM Zn + 250 U IFN	700.8 ± 134.2 ^a	446.2 ± 126.2 ^a
50 μM Zn + 250 U TNF + 250 U IFN	581.5 ± 125.7 ^a	568.7 ± 219.5 ^a
100 μM Zn + 250 U TNF + 250 U IFN	604.7 ± 118.9 ^a	714.2 ± 58.9 ^{a,c}

Data are mean ± S.E. of 2-8 experiments. Different letters indicate statistical differences between treatments (SNK test; $P < 0.05$). ^avs. control cells. ^bvs. 50 μM Zn. ^cvs. 100 μM Zn.

olism, the acute-phase response, or the antioxidant capacity of the liver, which may not necessarily be physiologically separate responses.

As stated in the introduction, Zn, immobilization stress and endotoxin appear to act on liver MT regulation through different mechanisms, and therefore it might be expected that the combination of these factors should have an additive effect on MT levels. This has been demonstrated, for example, for glucocorticoids and Zn [20]. Indeed, this appears also to be the case for the effect of stress and endotoxin: they caused a 5- and 8-fold increase, respectively, in MT over the control values, whereas the combined treatments increased MT levels by 13-fold, clearly suggesting an additive effect of stress and endotoxin on MT levels. This in principle suggests that they act on liver MT regulation through different mechanisms, but this can not be deduced from the present data; for example, each inducer alone might not be having its maximum possible effect, and since the precise mechanisms of MT induction by stress and endotoxin are really not known the convergence of both stimuli can not be ruled out.

In contrast, the results for the other combinations, i.e. Zn + immobilization stress and Zn + endotoxin, were completely different to that of immobilization stress + endotoxin, since a clear synergistic effect was observed in both cases. Thus, Zn and immobilization stress caused a 12- and 5-fold increase, respectively, in MT levels, but the combined treatments (Zn was injected 1 h before the onset of stress) increased MT levels by 35-fold. Similar results were obtained in rats that were subjected to immobilization stress 24 h after Zn injection [13]. Also, the combined treatments with Zn and endotoxin (12- and 8-fold increase when given alone, respectively) increased MT levels by 42-fold. These results are consistent with a previous report showing a synergistic effect of Zn and paraquat [21]. Thus, the treatment of the rats with Zn prior to the MT inducers appears to have profound effects on the net regulation of MT levels. These could involve, among others, aspects such as the

stabilization of the protein, increased Zn mobilization from peripheric tissues and/or intracellular liver stores, or synergisms between inducers through interactions with the nuclear machinery and/or convergence of the respective transduction pathways during MT synthesis [1,22].

When rats with preinduced liver MT by means of Zn, endotoxin and immobilization stress treatments were further stressed for 2 or 4 h, it was found that MT-I mRNA levels were increased in all cases but especially in the Zn-pretreated rats. This suggests that the higher liver MT levels the latter animals show is the consequence of a higher MT synthesis rather than a higher stabilization of the protein (which however may also contribute); it is important to mention that the regulation of the two MT genes active in the rat liver, as well as in the mouse liver, is coordinated [23-25] and that therefore the results obtained for MT-I are in principle indicative of the total MT expression. However, the expression itself of the MT genes may not necessarily be reflected in the concentration of the MT isoforms; other factors such as protein stability appear to be important since, in the rat, MT-II levels in the liver usually are higher than those of MT-I after induction by Zn, glucocorticoids, endotoxin, TNF, IL-6 and presumably other factors [24-30]. In any case, total MT and MT-I mRNA levels were higher in the rats injected with Zn, suggesting a higher MT synthesis. Zn is a primary inducer of the MT gene and usually increased uptake of this metal by the liver will cause increased MT levels [1,22]; alternatively, altered intracellular Zn pools by stress could be responsible for the increased MT synthesis [31]. However, the former possibility appears more suitable, since serum Zn levels were clearly higher in the Zn-pretreated animals (even though they were injected the day before) at all times of stress studied.

These results suggest that Zn is being mobilized from peripheric tissues into the liver during stress or endotoxin shock, and that when rats are pretreated with Zn a higher metal mobilization is caused, presumably because of increased Zn availability. This, in turn, could increase liver MT synthesis; MT levels appear to account for most of the liver Zn increases if one assumes that MT was saturated with this metal (7 mol Zn/mol MT). It is important to mention here that liver MT synthesis can be increased independently of the Zn uptake by the liver. Actually, it is generally assumed that regarding MT and serum Zn, the latter is depressed after the former is increased, causing secondary Zn accumulation in the liver. The present results are noteworthy because they suggest that Zn mobilization from peripheric tissues may be more important than previously believed. It is important to realize, for example, that the administration of endotoxin to Zn-deficient rats causes a minimal effect on liver MT levels [32], suggesting that a normal Zn metabolism is important for MT induction to occur in the liver. Conversely, recent data obtained in MT-null mice indicate that liver MT is essential for a normal liver Zn metabolism during the acute phase response after endotoxin injection [33]. Collectively, these data might suggest that Zn is mobilized during stress (either immobilization or endotoxin) from peripheric tissues to a higher extent in Zn-injected compared to control animals, and the opposite in Zn-deficient conditions, driving up or down liver MT synthesis. MT, in turn, would be an essential mechanism for Zn accumulation in this tissue since in its absence the mobilized metal will not be retained by the liver.

Additionally, interactions between the many factors known to influence MT levels may be important for the synergisms seen in MT regulation in vivo. For example, in cultured hepatocytes IL-1 has no effect, in contrast to in vivo, and IL-6 does not have effect alone, but in the presence of glucocorticoids IL-6 increases MT levels significantly, an effect optimized by Zn [9,34]; however, it is also known that glucocorticoids appear to reduce liver MT response to inflammation-induced cytokines release [35]. Thus, a factor may have a positive or negative effect on MT regulation depending on its concentration and the presence of other factors simultaneously, which highlights the difficulty of dissecting liver MT regulation in vivo. To gain some insight into the putative interactions between the MT inducers, we have studied in primary cultures of hepatocytes the effect of combinations of Zn, glucocorticoids and the cytokines TNF and IFN. The teleological basis for this is that both glucocorticoids and cytokines such as those may be increased by stress and endotoxin, which additionally may affect Zn metabolism [28–30,36–38].

As expected [39], Zn and dexamethasone increased hepatocyte MT levels, and the simultaneous presence of both factors further increased them, only additively. Regarding TNF and IFN, two cytokines known to increase liver MT levels in vivo [29,36,40–42], appeared to have a biphasic effect in concentration-dependent studies, always with rather small effects. When these factors were combined with Zn or dexamethasone, they enhanced slightly the effect of the latter. Overall, the results are in agreement with a previous report [34], and indicate that, in contrast to in vivo, TNF and IFN have a rather modest role in liver MT regulation which can not be optimized by Zn or glucocorticoids, in contrast to what is observed for IL-6 [9,24]. These in vitro results with primary culture of hepatocytes obviously do not rule out necessarily such a possibility in vivo, since other factors released from extrahepatic tissues might synergize with those studied here, but the present evidence argues the Zn mobilization from peripheric tissues as the principal candidate to explain the synergisms observed in this and other reports.

Acknowledgements

We are grateful to Dr. R.D. Palmiter for the generous gift of the cDNA for mouse MT-I, and Dr. X. Avilés for the generous gift of γ -actin. Thanks are given to Dr. R. Pujol-Borrell for the generous gift of TNF- α and IFN- γ . The authors acknowledge J.M. Graells and O. Jiménez for technical and administrative assistance. This study was supported by a grant from DGICYT (PB91-0489); the help of a grant from CIRIT (GRQ93-2.096) is also acknowledged.

References

- [1] J.H.R. Kägi and Y. Kojima (Eds.), *Metallothionein II*, Birkhäuser Verlag, Basel, 1987.
- [2] S.H. Oh, J.T. Deagen, P.D. Whanger and P.H. Weswig, Biological function of metallothionein. V. Its induction by various stresses, *Am. J. Physiol.*, 234 (1978) 282–285.
- [3] P.Z. Sobocinski, W.J. Canterbury, C.A. Mapes and R.E. Dinterman, Involvement of hepatic metallothioneins in hypozincemia associated with bacterial infection, *Am. J. Physiol.*, 234 (1978) 399–406.

- [4] D.H. Hamer, Metallothionein, *Annu. Rev. Biochem.*, 55 (1986) 913-951.
- [5] F.O. Brady, Synthesis of rat hepatic zinc thionein in response to the stress of sham operation, *Life Sci.*, 28 (1981) 1647-1654.
- [6] J. Hidalgo, M. Giralt, J.S. Garvey and A. Armario, Physiological role of glucocorticoids on rat serum and liver metallothionein in basal and stress conditions, *Am. J. Physiol.*, 254 (1988) 71-78.
- [7] J. Hidalgo, S.J. Rhee, P.C. Huang and J.S. Garvey, Differential effect of adrenalectomy on rat liver metallothionein mRNA levels in basal and stress conditions, *Hor. Metab. Res.*, 24 (1992) 233-236.
- [8] D.M. Durnam, J.S. Hoffman, C.J. Quaife, E.P. Benditt, H.Y. Chen, R.L. Brinster and R.D. Palmiter, Induction of mouse metallothionein-I mRNA by bacterial endotoxin is independent of metals and glucocorticoid hormones, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81 (1984) 1053-1056.
- [9] J.J. Schroeder and R.J. Cousins, Interleukin 6 regulates metallothionein gene expression and zinc metabolism in hepatocyte monolayer cultures, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87 (1990) 3137-3141.
- [10] S.K. De, M.T. McMaster and G.K. Andrews, Endotoxin induction of murine metallothionein gene expression, *J. Biol. Chem.*, 265 (1990) 15267-15274.
- [11] J. Liu, Y.P. Liu, L.E. Sendelbach and C.D. Klaassen, Endotoxin induction of hepatic metallothionein is mediated through cytokines, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 109 (1991) 235-240.
- [12] J. Zeng, B.L. Vallee and J.H.R. Kägi, Zinc transfer from transcription factor IIIA fingers to thionein clusters, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88 (1991) 9984-9988.
- [13] J. Hidalgo, L. Campmany, M. Borrás, J.S. Garvey and A. Armario, Metallothionein response to stress in rats: role in free radical scavenging, *Am. J. Physiol.*, 255 (1988) 518-524.
- [14] J.S. Garvey and M.F. Heil, Separation and collection of rat liver macrophages, *Methods Enzymol.*, 108 (1984) 285-294.
- [15] P.O. Seglen, Preparation of isolated rat liver cells, in: D.M. Prescott (Ed.), *Methods in Cell Biology*, Academic Press, NY, 1976, pp. 29-83.
- [16] D. Repceková and L. Mikulaj, Plasma testosterone of rats subjected to immobilization stress and/or hCG administration, *Hor. Res.*, 8 (1977) 51-57.
- [17] T. Gasull, D.V. Rebollo, B. Romero and J. Hidalgo, Development of a competitive double antibody radioimmunoassay for rat metallothionein, *J. Immunoassay*, 14 (1993) 209-225.
- [18] P. Chomczynski and N. Sacchi, Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction, *Anal. Biochem.*, 162 (1987) 156-159.
- [19] J. Sambrook, E.F. Fritsch and T. Maniatis, *Molecular Cloning*, Cold Spring Harbor Laboratory, NY, 2nd Ed., 1989.
- [20] S.R. Quinones and R.J. Cousins, Augmentation of dexamethasone induction of rat liver metallothionein by zinc, *Biochem. J.*, 219 (1984) 959-963.
- [21] M. Sato, Metallothionein synthesis in rats exposed to radical generating agents, in: C.D. Klaassen and K.T. Suzuki (Eds.), *Metallothionein in Biology and Medicine*, CRC Press Inc., FL, Chapter 17, 1991, pp. 221-235.
- [22] I. Bremner and J.H. Beattie, Metallothionein and the trace minerals, *Annu. Rev. Nutr.*, 10 (1990) 63-83.
- [23] M.K. Yagle and R.D. Palmiter, Coordinate regulation of mouse metallothionein I and genes II genes by heavy metals and glucocorticoids, *Mol. Cell. Biol.*, 5 (1985) 291-294.
- [24] L.D. Lehman-McKeeman, G.K. Andrews and C.D. Klaassen, Induction of hepatic metallothioneins determined at isoprotein and messenger RNA levels in glucocorticoid-treated rats, *Biochem. J.*, 249 (1988) 429-433.
- [25] L.D. Lehman-McKeeman, G.K. Andrews and C.D. Klaassen, Ontogeny and induction of hepatic isometallothioneins in immature rats, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 92 (1988) 10-17.
- [26] L.D. Lehman-McKeeman, G.K. Andrews and C.D. Klaassen, Mechanisms of regulation of rat hepatic metallothionein-I and metallothionein-II levels following administration of zinc, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 92 (1988) 1-9.
- [27] L.D. Lehman-McKeeman, W.C. Kershaw and C.D. Klaassen, Species differences in metallothionein regulation: a comparison of the induction of isometallothioneins in rats and mice, in: C.D. Klaassen and K.T. Suzuki (Eds.), *Metallothionein in Biology and Medicine*, CRC Press Inc., FL, Chapter 9, 1991, pp. 121-131.
- [28] S. Abe, M. Matsumi, M. Tsukioki, S. Mizukawa, T. Takahashi, Y. Iijima, Y. Itano and F. Kosaka,

- Metallothionein and zinc metabolism in endotoxin shock rats. *Experientia Supplement*, in: J.H.R. Kagi and Y. Kojima (Eds.), *Metallothionein II*, Basel, Volume 52, 1987, pp. 587–594.
- [29] M. Sato, M. Sasaki and H. Hojo, Differential induction of metallothionein synthesis by interleukin-6 and tumor necrosis factor- α in rat tissues, *Int. J. Immunopharm.*, 16 (1994) 187–195.
- [30] M. Sato and M. Sasaki, Tissue specific induction of metallothionein synthesis by tumor necrosis factor- α . *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.*, 75 (1992) 159–172.
- [31] R.J. Cousins and L.M. Lee-Ambrose, Nuclear zinc uptake and interactions and metallothionein gene expression are influenced by dietary zinc in rats, *J. Nutr.*, 122 (1992) 56–64.
- [32] I. Bremner, J.N. Morrison, A.M. Wood and J.R. Arthur, Effects of changes in dietary zinc, copper and selenium supply and of endotoxin administration on metallothionein I concentrations in blood cells and urine in the rat, *J. Nutr.*, 117 (1987) 1595–1602.
- [33] J.C. Philcox, P. Coyle, A. Michalska, A. Choo and A. Rofe, Endotoxin-induced inflammation does not cause hepatic zinc accumulation in mice lacking metallothionein gene expression, *Biochem. J.*, 308 (1995) 543–546.
- [34] P. Coyle, J.C. Philcox and A.M. Rofe, Corticosterone enhances the zinc and interleukin-6-mediated induction of metallothionein in cultured rat hepatocytes. *J. Nutr.*, 123 (1993) 1464–1470.
- [35] K. Min, S. Mukai, M. Ohta, S. Onosaka and K. Tanaka, Glucocorticoid inhibition of inflammation-induced metallothionein synthesis in mouse liver, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 113 (1992) 293–298.
- [36] J.U. Bell, M.J.P. Lawman, J.M. Lopez, L.E. DesJardin and L.A.D. Applewhite, Effects of type I interferon-inducing agents on hepatic metallothionein. *Experientia supplement*, in: J.H.R. Kagi and Y. Kojima (Eds.), *Metallothionein II*, Basel, Volume 52, 1987, pp. 581–586.
- [37] F.R. Balkwill, Tumour necrosis factor, *Br. Med. Bull.*, 45 (1989) 389–400.
- [38] S. Pestka, J. Langer, K.C. Zoon and C.E. Samuel, Interferons and their actions, *Annu. Rev. Biochem.*, 56 (1987) 727–777.
- [39] J. Hidalgo, A. García, A.M. Oliva, M. Giralt, T. Gasull, B. González, H. Milnerowicz, A. Wood and I. Bremner, Effect of zinc, copper and glucocorticoids on metallothionein levels of cultured neurons and astrocytes from rat brain, *Chem.-Biol. Interact.*, 93 (1994) 197–219.
- [40] R.F. Grimble and I. Bremner, Tumor necrosis factor α enhances hepatic metallothionein-I content but reduces that of the kidney. *Proc. Nutr. Soc.*, 48 (1989) 64A.
- [41] R.L. Friedman and G.R. Stark, Alpha-interferon-induced transcription of HLA and metallothionein genes containing homologous upstream sequences, *Nature*, 314 (1985) 637–639.
- [42] S. Morris and P.C. Huan, Transient response of amplified metallothionein genes in CHO cells to induction by alpha interferon, *Mol. Cell. Biol.*, 7 (1987) 600–605.

Treball 2

Belloso, E., Hernández, J., Giralt, M., Kille, P. and Hidalgo, J.
(1996).

Effect of stress on mouse and rat brain metallothionein I and III
mRNA levels.

Neuroendocrinology, 64: 430-439.

Eva Belloso^a
 Joaquin Hernandez^a
 Mercedes Giralt^a
 Peter Kille^b
 Juan Hidalgo^a

^a Departamento de Biología Celular y Fisiología, Unidad de Fisiología Animal, Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de Barcelona, Spain, and

^b School of Molecular and Medical Biosciences, University of Wales College of Cardiff, UK

Effect of Stress on Mouse and Rat Brain Metallothionein I and III mRNA Levels

Key Words

Metallothioneins
 Stress
 Growth inhibitory factor
 Molecular neuroendocrinology

Abstract

The effect of immobilization stress on brain and liver metallothionein (MT) mRNA levels has been studied in mice and rats. Stress increased brain and liver MT-I mRNA levels in mice in a time-dependent manner, in agreement with the MT-I+II protein levels, suggesting an increased gene transcription during stress. In contrast, the brain-specific isoform, MT-III, tended to decrease during stress. In selected brain areas of rats, the overall tendency for both MT-I and MT-III mRNA levels was to be transiently decreased by stress in hippocampus, and increased in hypothalamus, cerebellum and the remaining brain tissue; adrenalectomy significantly affected MT mRNA levels either in basal conditions or during stress, with very different temporal patterns of response depending on the brain area studied. These results suggest that glucocorticoids could be involved in MT-I but also MT-III regulation. In both rats and mice, the subtle response to stress observed in the brain contrasts with the robust response in the liver, suggesting that the factors involved in MT regulation in both tissues differ substantially. In primary cultures enriched in astrocytes or neurons, MT-III mRNA was clearly detected by Northern blotting in both cases, suggesting that it is expressed in both types of cells. Dexamethasone appeared to decrease MT-III mRNA levels in cultured neurons and to increase them in astrocytes, which indicates that glucocorticoids have a different role in MT-III regulation in both cell types.

Introduction

Metallothioneins (MTs) are a family of low molecular weight, heavy metal-binding proteins. Most of what is known of these proteins is related to the ubiquitously expressed MT-I and MT-II isoforms [1-3]. However, two tissue-specific isoforms, MT-III (also called growth inhibitory factor) in the brain [4, 5] and MT-IV in keratinizing

epithelia [6], have recently been characterized. From these, MT-III has opened exciting perspectives given its apparent potential physiological significance in brain function. MT-III was unexpectedly discovered in human brain by virtue of its ability to inhibit the survival of neonatal rat cortical neurons in vitro which, together with the depletion of this protein in cortical regions of patients with Alzheimer disease (AD), suggested that MT-III

KARGER

E-Mail karger@karger.ch
 Fax + 41 61 306 12 34
 http://www.karger.ch

© 1996 S. Karger AG, Basel
 0028-3835/96/0646-0430\$10.00/0

This article is also accessible online at:
 http://BioMedNet.com/karger

Dr. Juan Hidalgo
 Departamento de Biología Celular y Fisiología
 Unidad de Fisiología Animal, Facultad de Ciencias
 Universidad Autónoma de Barcelona, Bellaterra
 E-08193 Barcelona (Spain)

Received:
 March 18, 1996
 Accepted after revision:
 July 26, 1996

might be involved in the pathogenesis of this important disease [4].

In many respects, further studies have confounded rather than clarified our knowledge of MT-III. Thus, whereas the inhibitory effect of MT-III in the presence of brain extracts on neuronal survival *in vitro* was confirmed separately [7], the expected down-regulation of the MT-III gene in AD was not confirmed by the same authors; furthermore, they also observed that MT-III had the opposite effect on neuronal survival when added to neurons in absence of brain extract. In addition, the exclusive presence of MT-III in astrocytes suggested initially [4, 8] has not been supported later [9–11].

Animal studies aiming to clarify the functional significance of MT-III after brain injury also produce conflicting results. Thus, MT-III mRNA levels in the facial motoneurons decreased after facial nerve transection, which was reported as a specific response to reduce the inhibition of neurite outgrowth in order to regenerate the axons [10]; yet, injury induced by stab wounds or kainic acid injection appeared to increase MT-III expression [11, 12]. Finally, it must be kept in mind that there is no reason to believe that MT-III is more important for the brain than the widely expressed MT-I and MT-II isoforms. These isoforms respond to stress stimuli [13–15], are regulated by glucocorticoids [16] and metals [16, 17], and are induced heavily by conditions that cause brain injury, such as kainic-induced seizures [18] and freeze lesions [19], which may well be related to the antioxidant properties of these proteins [20, 21].

Thus, from the above data, it seems important to further characterize the regulation not only of MT-III but also that of the 'normal' MT isoforms in the brain. In this report, the response to stress and the putative role of glucocorticoids are studied in mice and/or rats. MT regulation in the liver is also studied to maintain an integrated vision of the organism. We also report that MT-III appears to be expressed both in astrocytes and neurons, at least in primary culture, which is relevant considering the conflicting data published up to now [4, 8–11], and that glucocorticoids appear to be involved in the regulation of MT-III mRNA levels.

Materials and Methods

Animals. Adult male Swiss mice and Sprague-Dawley rats were used in all experiments and were maintained under standard laboratory conditions (lights on from 07.00 to 19.00 h, 22°C, food and water provided *ad libitum*) for at least 1 week before starting experiments.

Mouse Experiments. For MT mRNA measurements, mice were subjected to immobilization stress for 3 or 6 h and then killed; basal animals remained in the animal room until being killed. Mice were immobilized in a different room by enclosing them in a wrapping of metallic net. In another experiment carried out for measuring MT protein, the mice were subjected to immobilization stress for 8 or 18 h and then killed along with basal animals.

Other animals were used for characterizing the hybridization and washing conditions with the probes and the reliability of the Northern/dot-blot assay. They were stressed or injected with cadmium as described in the figure legends.

Rat Experiments. Rats were bilaterally adrenalectomized (ADX) or sham-operated (sham-ADX) under ether anesthesia. The rats were housed 2 per cage, and ADX rats were given saline to drink. The experimental procedures were started 6 days after surgery; rats from both groups were subjected to immobilization stress for 0 (basal rats), 3 or 8 h. MT-I mRNA levels were measured in all cases, whereas MT-I+II protein levels were measured in the 0- and 8-hour groups. For immobilization, the animals' rear and forelimbs were taped to metal mounts and head motion was limited by metal loops fixed over the neck area.

In another experiment, the effect of a long-lasting ACTH preparation (Nuvacthen depot, Ciba) was studied by injecting it twice or 3 times intraperitoneally, at 3-hour intervals (100 µg/kg body weight); the rats were killed 4 or 8 h after the first injection, respectively, along with saline-injected rats.

Primary Cultures. Astrocyte-enriched and neuronal primary cultures were prepared from the brain hemispheres of newborn rats (within the first 24 h) and 16-day-old embryos, respectively, following the method of Löffner et al. [22] as previously described [17]. Briefly, for astrocyte cultures, tissue was dissociated into cells by successive passages through nylon cloths of 211- and 135-µm mesh. Brain cells were suspended in 90% Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), 10% fetal bovine serum (FBS), 20 units/ml penicillin and 20 µg/ml streptomycin (0.6×10^6 viable cells/ml) and then seeded onto 35-mm diameter plastic Petri dishes (2 ml) and incubated at 37°C in a humidified atmosphere of 90% air/10% CO₂. Medium was changed once a week, and confluent monolayers were used after 13–14 days in culture.

For neuronal cultures, tissue was passed through nylon cloths of 135- and 22-µm mesh and cells were suspended in 90% DMEM, 10% horse serum and pen-strep as before. Two milliliters of the cell suspension (0.6×10^6 viable cells/ml) were seeded onto 35-mm diameter plastic Petri dishes previously coated with poly-L-α-ornithine (0.01% wt/vol). After 1 day in culture the initial culture medium was replaced by serum-free glia-conditioned medium containing insulin (5 µg/ml), transferrin (100 µg/ml), putrescine (100 µM), progesterone (20 nM), and Na₂SeO₃ (30 nM). Two days later cytosine arabinoside (5 µM final concentration) was added and after 24 h the medium was replaced by hormone-supplemented glia-conditioned medium. Neuronal cultures were incubated in the same way as those of astrocytes and were used at 11–12 days, when neurons are fully differentiated [22].

For Northern blot assays of MT-III levels, and for examining the effect of dexamethasone, the medium was removed, the monolayers washed with 2 ml DMEM to remove FBS, and 2 ml of fresh DMEM supplemented with 2 mg/ml BSA were added. Dexamethasone was added to a final concentration of 10^{-6} M. Control cultures received equivalent amounts of ethanol. Cells were harvested 3 h later as appropriate for RNA extraction, using the guanidine thiocyanate solution (see below) for harvesting the cells from various dishes.

Assays. Rats were killed by guillotination and mice by cervical dislocation. In those experiments where MT mRNAs were to be measured, the entire brain or the selected brain areas, and a piece of liver of approximately 100 mg, were immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until RNA extraction. For MT assay, the tissues were stored at -20°C ; later, cytosols were prepared as previously described [16]. MT levels were measured by RIA using a polyclonal antibody which cross-reacts mainly with MT-I and MT-II [23].

MT mRNA Measurements. Mouse MT mRNAs were measured by Northern blot or dot-blot using the cDNA generously provided by Dr. R.D. Palmiter (University of Washington, Seattle, Wash.). The cDNAs for rat MT-I, MT-II and MT-III were prepared by RT-PCR using the following primers:

MT-I: TCCCGACTTCAGCAGCCCGA and
ACTGGGTGGAGGTGTACGGC

MT-II: CTCCAACCTGCCGCTCCATT and
TGGAGAACCGGTCAGGGTTG

MT-III: GCGCATCCGCTTGCTGGAGG and
CAGGAGCGGAGCAGGAAGC

The PCR products were purified with the Qiaquick kit and cloned in pGEM with T4 DNA ligase. A γ -actin probe (cDNA kindly provided by Dr. Albert Boronat, University of Barcelona through Dr. P. Suau) was used to normalize the MT mRNA data.

All solutions, glassware and water used for RNA work were made RNase-free by treating with 0.1% diethyl pyrocarbonate and autoclaving. Total RNA was extracted from livers by the method of Chomczynski and Sacchi [24]. Tissues were homogenized with a Polytron in 1 ml (or larger depending on the tissue) of guanidine thiocyanate solution, and 0.1 vol of 2 M sodium acetate, pH 4.0, 1 vol of phenol (water saturated), and 0.2 vol of chloroform-isoamyl alcohol mixture were added to the homogenates to remove proteins. The upper phase was transferred to another tube and RNA was precipitated using isopropanol (1:1) and washed in 70% ethanol. RNA was dissolved in sterile RNase-free water and the concentration and purity determined using A_{260} and A_{260}/A_{280} ratio, respectively.

For Northern studies, RNA samples (10 μg RNA) were denatured for 5 min at 65°C in a solution of MOPS buffer (0.2 M MOPS, 5 mM sodium acetate, 1 mM EDTA, pH 7.0), 50% formamide and 2.2 M formaldehyde. Denatured RNAs were electrophoresed in a 1% agarose gel containing 1 \times MOPS buffer and 2.2 M formaldehyde. RNAs were then transferred to nylon filters in 20 \times SSC (3 M NaCl and 0.3 M sodium citrate, pH 7.0) by capillary elution as described by Sambrook et al. [25]. For dot-blot the RNA samples (10 μg RNA) were denatured in 6 \times SSC (1.2 M sodium chloride, 0.12 M sodium citrate pH 7.0) containing 2.5 M formaldehyde, and 100 μl were applied onto a dry nylon membrane using a dot-blotting manifold. RNAs were fixed by exposing the nylon membrane to ultraviolet irradiation. The membranes were kept dry until the hybridization.

The cDNAs were used as templates for the synthesis of DNA probes using ^{32}P from Amersham (Amersham Int., Bucks, UK) and an oligolabelling kit from Pharmacia Biotech (Uppsala, Sweden). The specific activity of each probe was $1-2 \times 10^9$ dpm/ μg . The labeled probes were purified by chromatography (Quick Spin Columns Sephadex G-50, Boehringer Mannheim, Germany). The filters were prehybridized at 42°C for 2 h in a mixture containing 6 \times SSPE (20 \times SSPE: 3 M NaCl, 0.2 M sodium phosphate, 20 mM EDTA), 5 \times Denhardt's solution (50 \times Denhardt's: 50 mg each of polyvinylpyrrolidone, Ficoll and bovine serum albumin per ml),

0.5% SDS, 50% formamide and 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of denatured herring sperm DNA. Hybridization incubation was done at 42°C for 18 h containing the labelled probe in a mixture solution of 6 \times SSPE, 0.5% SDS, 50% formamide, 10% dextran sulfate and 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of denatured herring sperm DNA. Following hybridization, filters were washed for 30 min in 1 \times SSC containing 0.1% SDS at 42°C . For the Northern blots, autoradiographs were developed by exposing X-ray film (XAR-05, Kodak, Rochester, N.Y.) with a high-plus intensifying screen (Wolf X-Ray Corporation, N.Y.) at -70°C . For the dots, the radioactivity was determined by scintillation counting of each dot after their excision. γ -Actin mRNA was measured in duplicate filters. Results are normally shown as the ratio between MT-I or MT-III mRNA and γ -actin mRNA.

Specificity of the MT mRNA Measurements. MT-III is a brain-specific isoform, but it shares a very significant portion of its amino acid sequence with the more widely expressed MT isoforms, MT-I and MT-II. Thus, it is important to verify that cross-hybridization of the probes with the different MT mRNA molecules is avoided. The hybridization and washing conditions stated above were such that cross-hybridization was not significant. This was demonstrated for the MT-III probe by studying RNA extracted from the liver (a tissue where no MT-III mRNA is present) in comparison with that of the brain (see Results). For studying the specificity of the MT-I probe, this approach is not possible since the MT-I+II genes are expressed in virtually all tissues including the brain. Thus, we have developed an alternative approach which allowed us to determine the putative cross-hybridization of the MT-I probe not only with MT-III but also with MT-II mRNA. The rat cDNAs obtained as described above were dissolved in DNA dilution buffer (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of herring sperm DNA, 1 mM EDTA and 10 mM Tris-HCl, pH 8.0) at a concentration of 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Serial dilutions were prepared in DNA dilution buffers, which were heated at 95°C for 10 min, cooled in ice and immediately 100 μl of each dilution applied to the hybridization filter and the DNAs fixed by UV irradiation. These cDNAs were then hybridized with the MT-I probe using the same hybridization and washing conditions stated above.

Statistical Analysis. Results were analyzed with one-way or two-way ANOVA. When necessary, post-hoc comparisons were made with the Student-Newman-Keuls test.

Results

Figure 1 shows a Northern blot for MT-III mRNA done for rat and mouse brain and liver RNA, using the mouse MT-III probe. As expected, a clear signal was obtained in the brain but not in the liver, which demonstrates that, with the conditions of hybridization and washings used, the MT-III probe is not cross-reacting significantly with MT-I/II mRNAs. Figure 2 shows that, in these conditions, the MT-I probe does not cross-react significantly either with the MT-III or the MT-II cDNAs, and therefore we assume that the MT-I mRNA measurements are specific. We used these hybridization and washing conditions in all subsequent experiments.

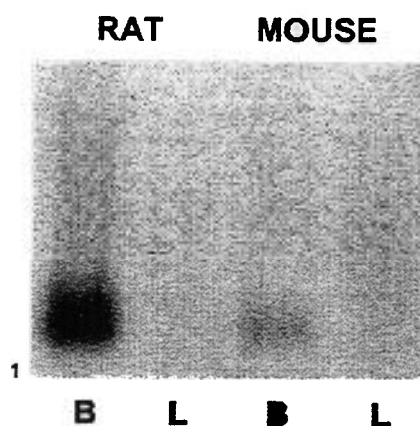
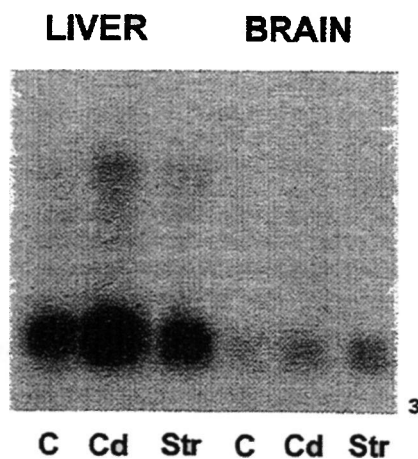
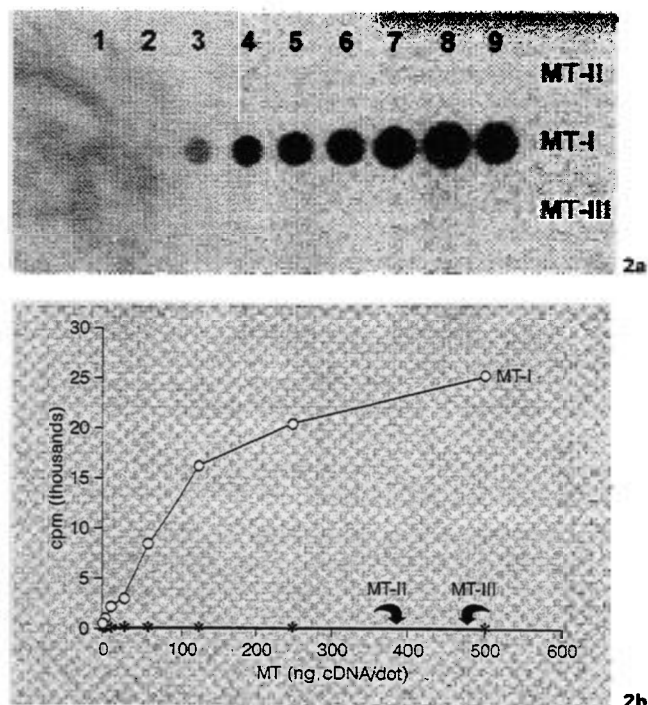


Fig. 1. Northern blot for MT-III mRNA using the mouse MT-III probe as described in Materials and Methods. RNA was isolated from brains (B) or livers (L) of either control rats or mice, and 10 μ g were electrophoresed, blotted and hybridized with the mouse MT-III probe. As expected, given the well-known brain-specific MT-III expression, a clear hybridization signal was obtained in the brain but not in the liver, demonstrating the specificity of the conditions used.

Fig. 2. The specificity of the MT-I probe was estimated by applying to membrane serial dilutions of the cDNAs for MT-I, MT-II and MT-III, and hybridizing them with the MT-I probe using the same conditions as for mRNA measurements. Only the MT-I cDNA gave a clear, concentration-dependent signal, whereas the MT-II and MT-III cDNAs did not cross-react significantly. **a** Autoradiography obtained. 1-9 refer to the amounts of cDNA applied: 1.95, 3.91, 7.81, 15.62, 31.25, 62.5, 125, 500 and 250 ng/dot, respectively. **b** cpm measured once the dots were excised and counted in a beta counter.

Fig. 3. Northern blot for MT-I mRNA isolated from the livers or brains of mice injected with 1 mg/kg of cadmium (Cd) or subjected to immobilization stress (Str), in comparison with control animals (C). The animals were killed 3 h after the metal injection or the onset of stress. Cd and stress significantly increased MT-I mRNA levels, as expected. Ten micrograms of RNA were loaded in all cases. Note the larger signal obtained in the liver and the low background achieved in both tissues.

Figure 3 shows a Northern blot done for MT-I mRNA in mouse liver and brain to verify the reliability of the assay, studying the well-known effect of cadmium and stress on MT-I gene expression. As expected, MT-I mRNA levels were higher in the liver than in the brain, and both cadmium and stress increased them significantly. Since the specific signal was much higher than the background, and given the convenience of analyzing



many animals for statistical purposes in the following experiments, we used dot-blot assays instead of Northern blots.

Figure 4 shows brain MT-I and MT-III and liver MT-I mRNA levels in the mouse. Stress increased significantly the MT-I mRNA levels in both tissues (p at least < 0.05); in contrast, MT-III levels remained unaffected by stress. As could be expected, brain and liver MT-I+II protein was

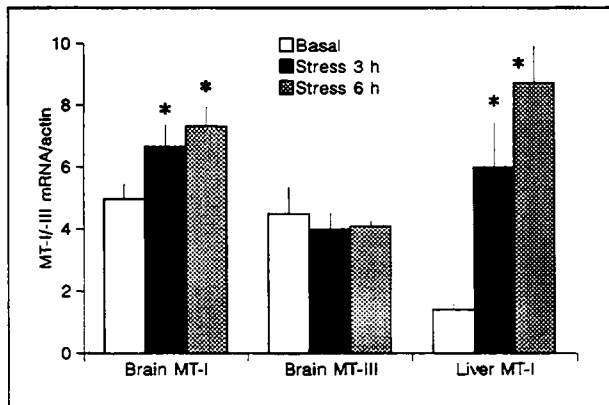


Fig. 4. Effect of immobilization stress on mouse brain and liver MT-I and -III mRNA levels. Mice were subjected to 3 or 6 h of stress and then killed. Basal animals were killed without any previous disturbance. Brains and livers were immediately frozen in liquid nitrogen, and later RNA isolated as described in Materials and Methods. Ten micrograms of RNA of each animal were blotted individually using a dot-blot manifold unit, and hybridized and washed following the same protocol as in the Northern blots of figures 1 and 2. The dots were excised and counted in a beta counter. Replicate dot-blots were done for MT-I, MT-III and γ -actin mRNA determinations. The results shown are the means \pm SE of the ratio between MT-I or MT-III mRNA and γ -actin mRNA. $n = 5-6$; * $p < 0.05$ vs. basal mice.

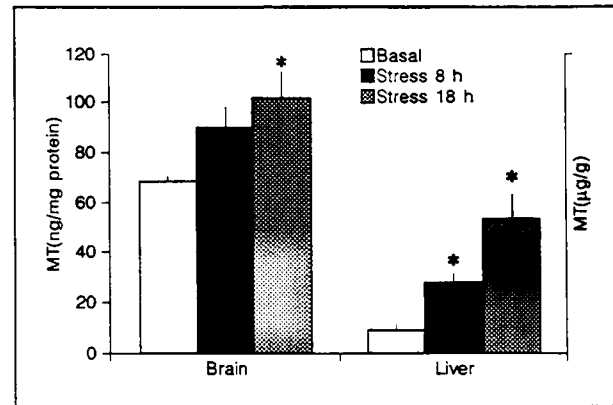


Fig. 5. Effect of immobilization stress on mouse brain and liver MT-I+II levels measured by radioimmunoassay. Mice were subjected to 8 or 18 h of stress and then killed. Control animals were killed without any previous disturbance. The results shown are the means \pm SE; $n = 5-6$; * $p < 0.05$ vs. basal mice.

significantly (p at least < 0.05) increased by stress, as measured by radioimmunoassay (fig. 5), with a pattern of response very similar to the MT-I mRNA levels observed in the previous experiment after the logical delay for protein translation.

Figure 6 shows rat MT-I and MT-III mRNAs levels in selected brain areas: hippocampus, hypothalamus, cerebellum, and the remaining brain. The prime interest of this experiment was to detect putative regional differences in MT isoforms regulation during stress and after ADX. Only slight effects of stress on MT-I mRNA levels were seen, with transient decreases for hippocampus and increases for the other three brain areas (see fig. 6 for statistical significances; there were no interactions between the two factors studied, stress and ADX, in any of the areas studied). ADX appeared to affect differently MT-I mRNA levels depending on the brain area and the physiological situation. Thus, ADX did not affect basal hippocampus MT-I mRNA levels, but tended to decrease them during stress, whereas a clear effect was seen in the hypothalamus of basal animals and animals stressed 3 h that disappeared 8 h after the onset of stress. No clear effects were seen in the cerebellum, although ADX tended to

decrease MT-I mRNA levels, whereas in the remaining brain they appeared to increase, unexpectedly, in ADX animals; in the latter case, however, caution must be observed since we could not normalize the data with the actin mRNA and a general effect of ADX on mRNAs cannot be ruled out (see Discussion).

The results for MT-III mRNA in the hippocampus, hypothalamus and cerebellum were somewhat similar to those for MT-I. Thus, stress tended to decrease them in hippocampus and to increase them in the other two areas, with ADX tending to decrease MT-III mRNA during stress. Stress also appeared to transiently increase MT-III mRNA levels in the remaining brain, but, in contrast to MT-I, ADX strongly decreased MT-III levels (see fig. 6 for statistical significances).

The effect of stress and ADX on liver MT-I mRNA and MT-I+II protein was also evaluated (fig. 7). As expected, stress had a significant effect in both cases, whereas ADX had a complex effect depending on the physiological situation (see Discussion).

The effect of a long-lasting ACTH preparation was studied in the same four areas stated above, but no effect was seen on either MT-I or MT-III mRNAs [not shown].

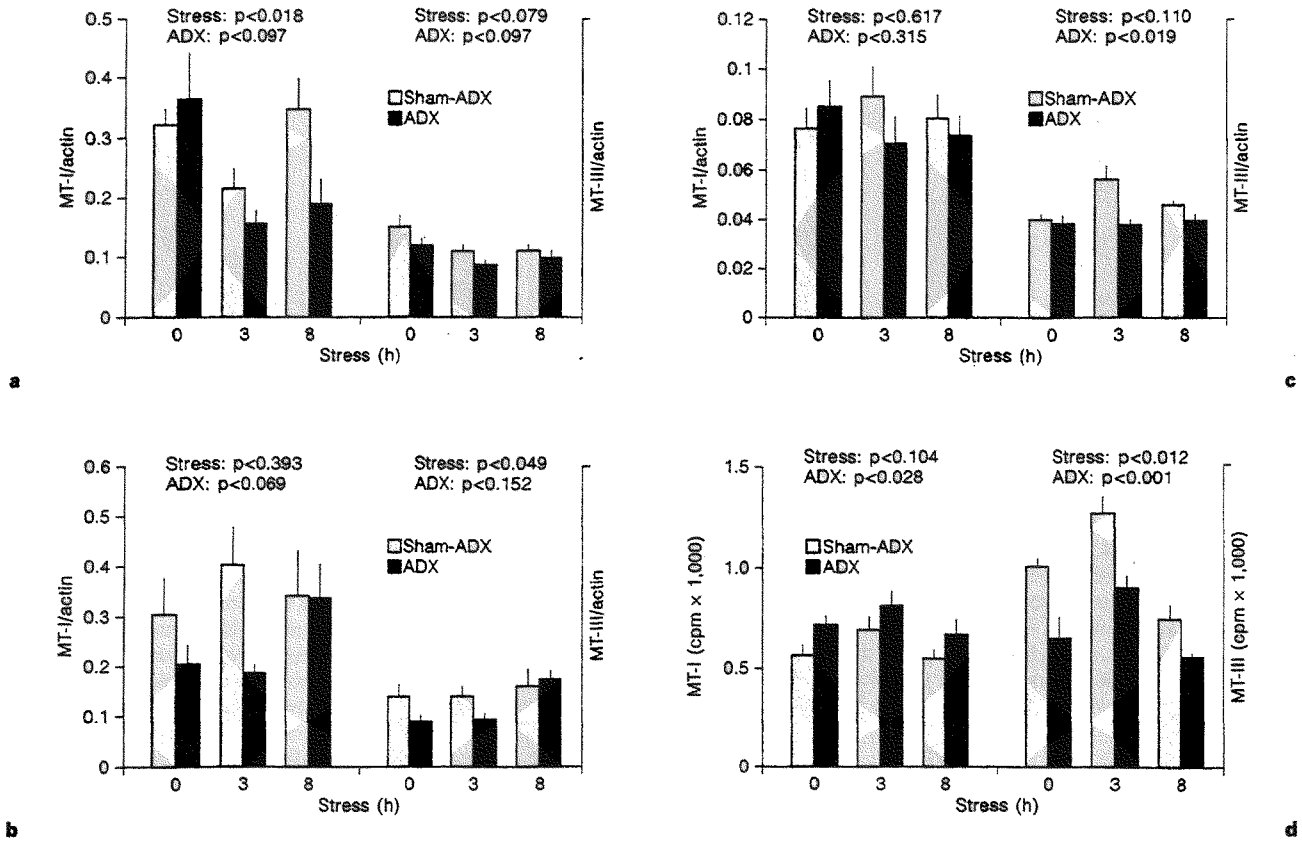


Fig. 6. Effect of immobilization stress and ADX on MT-I or MT-III mRNA levels of selected brain areas of adult rats. **a** Hippocampus. **b** Hypothalamus. **c** Cerebellum. **d** Remaining brain. mRNAs were measured as in figure 3. Animals were ADX 6 days before of the experiment and were given saline to drink. Rats were stressed for 0, 3 or 8 h, killed, and the selected brain areas dissected and immediately frozen in liquid nitrogen. The results (mean \pm SE, n = 4–6) were analyzed with two-way ANOVA with stress and ADX as main factors. The significances for each factor are indicated in the figure.

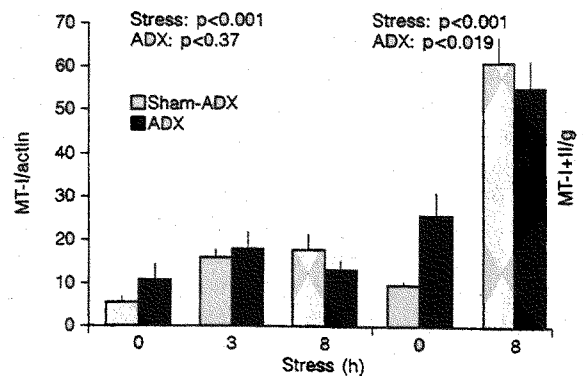


Fig. 7. Effect of immobilization stress and ADX on rat liver MT-I mRNA and MT-I+II levels. mRNA was measured by dot-blot as in the brain, and MT-I+II protein was measured by radioimmunoassay.

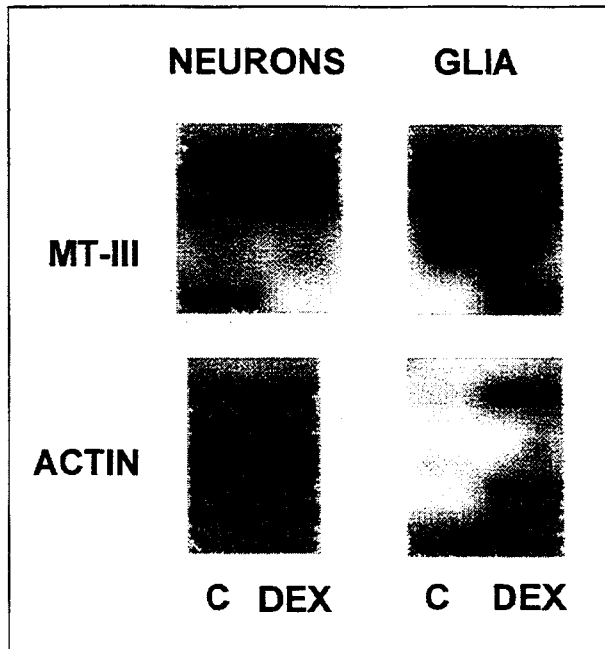


Fig. 8. Northern blots for MT-III mRNA and γ -actin mRNA measured in RNA isolated from primary cultures enriched in neurons and astrocytes. The effect of dexamethasone (10^{-6} M, 3 h) is shown. The ratio MT-III/actin was 5.37 and 2.57 for control and dexamethasone-treated neurons, and 1.14 and 1.82 for control and dexamethasone (DEX)-treated astrocytes.

Finally, we have studied the expression of MT-III in primary cultures of neurons and astrocytes, and the putative effect of the synthetic glucocorticoid dexamethasone (fig. 8). MT-III mRNA was clearly detected in both cell types, and dexamethasone was shown to have a different effect on MT-III levels (normalized with actin) depending on the cell type, since it decreased them in neurons and increased them in astrocytes. Using the Molecular Analyst program of BioRad, the ratio MT-III/actin was 5.37 and 2.57 for control and dexamethasone-treated neurons, and 1.14 and 1.82 for control and dexamethasone-treated astrocytes.

Discussion

The present results show for the first time that the widely expressed MT isoforms, MT-I and MT-II, are induced by stress in mouse brain in a time-dependent manner, in agreement with what is known for the rat [13–

15], presumably acting through increased gene transcription given the close correlation between the MT-I mRNA and the MT-I+II protein levels. In rodents, the expression of the MT-I and MT-II isoforms in a number of conditions is coordinated [26, 27]. The effect of stress on liver MT levels has been known for many years [28], but the present and previous [13] results indicate that stress has a general effect on MT(I+II) expression in the organism. However, it is also obvious that the factor(s) triggered by stress that control MT expression in different tissues must have different potencies in them, and/or local factors affect decisively its (their) action, since the effect of stress on MT expression was much higher in the liver than in the brain. Nevertheless, it seems clear that MT-I and MT-II should be involved in the adaptation of the organism to stress [see 29 for further discussion].

Whereas the MT-I mRNA (and protein) levels are increased by stress in both the brain and the liver, the opposite trend was observed for the brain-specific isoform, MT-III. Whether this would be accompanied by unchanged or decreased MT-III protein levels is unknown, since unfortunately there are no antibodies specific for them available yet. These results initially suggested that MT-III would be controlled differentially to MT-I during stress. Indeed, in an early report it was demonstrated that brain MT-I responded to exogenously administered glucocorticoids and lipopolysaccharide, whereas MT-III remained unaltered [5]. Furthermore, the mouse and human MT-III promoters have been sequenced and substantial differences with the normal counterparts (MT-I+II) have been observed [30]. However, the regulation of the MT isoforms *in vivo*, even in the case of the classical MT-I+II isoforms, is far from well solved. This is further complicated when considering the brain, a complex tissue with many different functional areas, i.e., teleologically the regulation of the different MT isoforms could differ between the different brain areas. Thus, in the following experiments we studied MTs regulation in selected brain areas of the rat, a more suitable species than the mouse to obtain significant amounts of RNA of each individual for dot-blot assays.

In previous studies, we have characterized to some extent the MT(I+II) levels and MT response to stress in up to eight brain areas of the rat [14–17, 29], and have concluded that stress has a general increasing effect on brain MT levels, although different sensitivities appear to exist in different areas [see 29 for further discussion]. The results for MT-I mRNA levels, despite the high variability that often precluded statistically significant results, were actually consistent with what is observed for the MT-I+II

protein levels. Thus, slight increases were seen after 3 h of stress in hypothalamus, cerebellum and remaining brain (except hippocampus), which returned to basal levels after 8 h of stress. The small, transient increases of MT-I mRNA levels should, presumably, account for the small increases of the protein levels induced by stress [14, 15, 29]. A more puzzling result is that obtained in the hippocampus, where a significant decrease of MT-I mRNA levels was observed 3 h after the onset of stress, which returned to normal 5 h later (8 h of stress). This brain area is one where the effect of stress on MT-I+II protein levels is not consistent through experiments, increasing them only occasionally [29]. The transient decrease of MT-I mRNA levels could be related to such inconsistency, but more work is needed.

The role of glucocorticoids on the effect of stress on brain MT-I mRNA levels was assessed in ADX animals. In previous reports we have demonstrated that glucocorticoids are involved in the regulation of brain MT-I+II levels [16, 17]; ADX affected MT-I mRNA levels quite consistently with the protein data, although again the high variability observed precluded some statistical significances. For example, significant decreases of MT-I mRNA levels after ADX could be observed in the hippocampus considering only the stressed animals, or in the hypothalamus considering only the basal animals and animals stressed 3 h but not taking all the data. These results suggest different patterns of responses regarding the importance of glucocorticoids on MT-I regulation in the different brain areas and/or physiological situations. Thus, these hormones could be more important in the control of MT-I mRNA during stress than in basal conditions in the hippocampus, whereas in the hypothalamus the opposite could be true. MT is a multiregulated family of proteins with many factors potentially capable of inducing increased gene transcription, but the importance of each of them and the putative interactions (positive and/or negative) between them *in vivo* remains to be established. In principle, the importance of a given factor may change in different physiological situations, and so suggest the present results. Being conservative, however, given the limited sensitivity of the assay for the brain areas (compared to the liver), one would expect an effect of ADX during stress on MT-I+II levels in hippocampus and hypothalamus, and, less clearly, in the cerebellum. The results for the remaining brain are puzzling, since MT-I mRNA levels increased in ADX animals; in this case, however, a warning is warranted since we unfortunately could not measure the actin mRNA levels for technical reasons. A general effect of ADX on mRNA levels might

occur, and therefore the physiological discussion must await new experiments.

The results obtained for MT-III mRNA were somewhat similar to those for MT-I, since stress tended to decrease MT-III mRNA levels in hippocampus and to increase them in the other three brain areas, ADX having a generally decreasing effect, especially in the remaining brain. Actually, in this brain area, where as stated above we could not normalize the data with the actin mRNA, the difference between MT-I and MT-III mRNA after ADX was sound, since the former increased and the latter strongly decreased. This decreasing effect of ADX was somewhat unexpected, since no glucocorticoid response elements are present in the MT-III gene promoters, at least those of the mouse and humans [30]. Previously it has been shown that MT-III did not respond to dexamethasone [5]. However, these genes do contain other putative sequences for transcription factors, such as TBP, AP2, Sp1 and metal response elements sequences, which could be indirectly affected by glucocorticoids. It must be recognized, in addition, that glucocorticoids could have an effect within the normal physiological range, but that this does not imply that further increases of these hormones should further increase MT-III mRNA, as has been demonstrated for the normal counterparts in some brain areas [16]. The fact that a long-lasting ACTH preparation which, within the physiological range, elevates at maximum the production of corticosterone by the adrenal for many hours, did not affect any of the MT isoforms further supports a role of these hormones as permissive factors, a well-known property of glucocorticoids.

A source of concern is that MT-III appeared to respond differently to stress in rats and mice, increasing in rats and decreasing in mice. However, the effects are small and, given the known variability through experiments of this family of proteins [see 16, 29 for further discussion], we rather think that this difference is the consequence of studying different sets of animals. In agreement with this argument, three different laboratories studying the same problem, the effect of kainic acid on MT-III mRNA levels, have found an increase [11], no change [18] or a decrease [31] of these transcripts. However, the assumption that MT-III appears to be regulated differently to MT-I+II continues finding support [18, 31, 32].

As in mice, liver MT-I mRNA levels increased significantly during stress in rats. It is interesting to note that the effect of stress in rats was smaller than in mice. This also appears to be the case in the brain. This difference in the magnitude of the response of MT-I mRNA to stress, however, is not reproduced in the MT-I+II protein levels;

rather, the opposite is seen, i.e. a 6-fold induction by 8 h of stress in rats vs. a 3-fold induction in mice. These results suggest that factors other than gene transcription are important for the final outcome on MT protein levels, as has been discussed extensively in other reports [33 and references therein]. ADX caused the expected elevation of liver MT-I+II levels of basal rats [16 and references therein], which appears to be the consequence of increased MT mRNA levels [34; this report]. Certainly this is surprising given the known positive effect of glucocorticoids on the MT-I+II genes. Possible explanations have been discussed previously [16, 29, 34], and more work is in progress to add further insight into this paradoxical result.

This is the first time that the effect of stress on brain MT-III has been evaluated. It is therefore difficult to speculate on the putative function of this protein during stress, especially because mRNA levels and not protein levels have been measured. We are at present in the process of obtaining polyclonal antibodies against recombinant MT-III, but unfortunately no success has been obtained yet. In addition, other attempts in different laboratories have also been unsuccessful. Thus, more definitive conclusions about the physiological function must await new studies. However, it is tempting to speculate about some possibilities. For example, MT-III has been found enriched in the hippocampus [9], a brain area known to be damaged by stress [35, 36]; the decrease of MT-III expression observed here during stress might be an attempt to contribute to the reconstruction of the damaged area if the proved *in vitro* inhibitory role of this protein in neuronal survival applies to the *in vivo* situation. Such a possibility has been suggested for the facial motoneurons after facial nerve transection [10]. Alternately, the differences observed between the MT isoforms could be related to their apparently radically different role in Zn metabolism recently suggested [37]. Clearly much work is needed to clarify the physiological function of these proteins.

Finally, we have addressed the question of the cellular specificity of the MT-III expression by studying it in primary cultures enriched in neurons or astrocytes, an *in vitro* system where we have characterized the regulation of MT-I+II in some detail [15, 17]. The matter of the usual site of expression of MT-III has generated considerable controversy. Originally, MT-III was detected immunocytochemically exclusively in astrocytes in human brains [4]. However, Masters et al. [9] convincingly demonstrated that the neurons are the primary site of production of MT-III *in vivo*. Furthermore, they observed that primary cultures of astrocytes did not show MT-III expression; however, this could be related to the differentia-

tion stage of these cells, since they also observed that after 1 week in culture some astrocytes started to express MT-III [9]. Kobayashi et al. [8] observed a clear MT-III expression in astrocytes grown to confluence, which presumably assures full differentiation of the cells and may be comparable to our *in vitro* astrocyte culture system, where MT-III was clearly being expressed. In primary cultures of neurons, we also find a clear MT-III expression, in agreement with the *in vivo* data [9]. Kobayashi et al. [8] did not find MT-III expression in primary culture of rat neurons, but in their system the neurons are cultured only for 2 days and therefore they are in an early stage of differentiation [22], in contrast to the one we used where the neurons are cultured for 11–12 days. It seems probable that, similarly to the cultured astrocytes [9], MT-III is expressed in neurons once they are well differentiated. Thus, collectively the data suggest that MT-III can be expressed in both neurons and astrocytes. The results with dexamethasone suggest an opposite effect of the hormone in the two cell types, since MT-III mRNA levels decreased in neurons and increased in astrocytes. Whether such effects also occur *in vivo* is unknown, but it would complicate the detection of changes related to variations of the glucocorticoid levels when simply measuring mRNAs in whole tissue, since it is obvious that they could compensate each other.

Acknowledgments

The authors acknowledge the financial support of the DGICYT PB94-0667 and the CIRIT GRQ93-2096. The help of the Acci3n Integrada Hispano-Brit3nica 107B is also acknowledged. The technical assistance of O. Jim3nez and J.M. Graells is appreciated, as well as the help of the Laboratori d'An3lisi Bioqu3mica del Departament de Bioqu3mica i Biologia Molecular.

References

- 1 Kägi JHR, Nordberg M (eds): *Metallothionein*. Basel, Birkhäuser, 1979.
- 2 Kägi JHR, Kojima Y (eds): *Metallothionein II*. Basel, Birkhäuser, 1987.
- 3 Suzuki KT, Imura N, Kimura M (eds): *Metallothionein III*. Basel, Birkhäuser, 1993.
- 4 Uchida Y, Takio K, Titani K, Ihara Y, Tomonaga M: The growth inhibitory factor that is deficient in the Alzheimer's disease brain is a 68 amino acid metallothionein-like protein. *Neuron* 1991;7:337-347.
- 5 Palmiter RD, Findley SD, Whitmore TE, Durnam D: MT-III, a brain-specific member of the metallothionein gene family. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:6333-6337.
- 6 Quaife CJ, Findley SD, Erickson JC, Froelick GJ, Kelly EJ, Zambrowicz BP, Palmiter RD: Induction of a new metallothionein isoform (MT-IV) occurs during differentiation of stratified squamous epithelia. *Biochemistry* 1994;33:7250-7259.
- 7 Erickson JC, Sewell AK, Jensen LT, Winge DR, Palmiter RD: Enhanced neurotrophic activity in Alzheimer's disease cortex is not associated with down-regulation of metallothionein III (GIF). *Brain Res* 1994;649:297-304.
- 8 Kobayashi H, Uchida Y, Ihara Y, Nakajima K, Kohsaka S, Miyatake T, Tsuji S: Molecular cloning of rat growth inhibitory factor cDNA and the expression in the central nervous system. *Mol Brain Res* 1993;19:188-194.
- 9 Masters BA, Quaife CJ, Erickson JC, Kelly EJ, Froelick GJ, Zambrowicz BP, Brinster RL, Palmiter RD: Metallothionein III is expressed in neurons that sequester zinc in synaptic vesicles. *J Neurosci* 1994;14:5844-5857.
- 10 Yuguchi T, Kohmura E, Yamada K, Sakaki T, Yamashita T, Otsuki H, Wanaka A, Tohyama M, Tsuji S, Hayakawa T: Changes in growth inhibitory factor mRNA expression compared with those in c-jun mRNA expression following facial nerve transection. *Mol Brain Res* 1995;28:181-185.
- 11 Anezaki T, Ishiguro H, Hozumi I, Inuzuka T, Hiraiwa M, Kobayashi H, Yuguchi T, Wanaka A, Uda Y, Miyatake T, Yamada K, Tohyama M, Tsuji S: Expression of growth inhibitory factor (GIF) in normal and injured rat brains. *Neurochem Int* 1995;27:89-94.
- 12 Hozumi I, Inuzuka T, Hiraiwa M, Uchida Y, Anezaki T, Ishiguro H, Kobayashi H, Uda Y, Miyatake T, Tsuji S: Changes of growth inhibitory factor after stab wounds in rat brain. *Brain Res* 1995;688:143-148.
- 13 Hidalgo J, Borrás M, Garvey JS, Armario A: Liver, brain, and heart metallothionein induction by stress. *J Neurochem* 1990;55:651-654.
- 14 Hidalgo J, Campmany L, Martí O, Armario A: Metallothionein-I induction by stress in specific brain areas. *Neurochem Res* 1991;16:1145-1148.
- 15 Gasull T, Giralt M, García A, Hidalgo J: Regulation of metallothionein-I+II levels in specific brain areas and liver in the rat: Role of catecholamines. *Glia* 1994;12:135-143.
- 16 Gasull T, Giralt M, Hernández J, Martínez P, Bremner I, Hidalgo J: Regulation of metallothionein concentrations in rat brain: Effect of glucocorticoids, zinc, copper, and endotoxin. *Am J Physiol* 1994;266:E760-E767.
- 17 Hidalgo J, García A, Oliva AM, Giralt M, Gasull T, González B, Milnerowicz H, Wood A, Bremner I: Effect of zinc, copper and glucocorticoids on metallothionein levels of cultured neurons and astrocytes from rat brain. *Chem Biol Interact* 1994;93:197-219.
- 18 Dalton T, Pazdernik TL, Wagner J, Samson F, Andrews GK: Temporal-spatial patterns of expression of metallothionein-I and -III and other stress related genes in rat brain after kainic acid-induced seizures. *Neurochem Int* 1995;27:59-71.
- 19 Penkowa M, Moos T: Disruption of the blood-interface in neonatal rat neocortex induces a transient expression of metallothionein in reactive astrocytes. *Glia* 1995;13:217-227.
- 20 Thornalley PJ, Vasak M: Possible role for metallothionein in protection against radiation-induced oxidative stress. Kinetics and mechanism of its reaction with superoxide and hydroxyl radicals. *Biochim Biophys Acta* 1985;827:36-44.
- 21 Sato M, Bremner I: Oxygen free radicals and metallothionein. *Free Radic Biol Med* 1993;14:325-337.
- 22 Löffner F, Lohmann SM, Walckhoff B, Walter V, Hamprecht HB: Immunocytochemical characterization of neuron-enriched primary cultures of embryonic rat brain cells by established neuronal and glial markers by monospecific antisera against cyclic nucleotide-dependent protein kinases and the synaptic vesicle protein synapsin-I. *Brain Res* 1986;363:205-221.
- 23 Gasull T, Rebollo DV, Romero B, Hidalgo J: Development of a competitive double antibody radioimmunoassay for rat metallothionein. *J Immunoassay* 1993;14:209-225.
- 24 Chomczynski P, Sacchi N: Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987;162:156-159.
- 25 Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T: *Molecular Cloning*, ed. 2, New York, Cold Spring Harbor Laboratory, 1989.
- 26 Yagle MK, Palmiter RD: Coordinate regulation of mouse metallothionein I and II genes by heavy metals and glucocorticoids. *Mol Cell Biol* 1985;5:291-294.
- 27 Lehman-McKeeman LD, Andrews GK, Klaassen CD: Induction of hepatic metallothioneins determined at isoprotein and messenger RNA levels in glucocorticoid-treated rats. *Biochem J* 1988;249:429-433.
- 28 Oh SH, Deagen JT, Whanger PD, Weswig PH: Biological function of metallothionein. V. Its induction by various stresses. *Am J Physiol* 1987;23:E282-E285.
- 29 Hidalgo J, Gasull T, Giralt M, Armario A: Brain metallothionein in stress. *Biol Signals* 1994;3:198-210.
- 30 Naruse S, Igarashi S-I, Furuya T, Kobayashi H, Miyatake T, Tsuji S: Structures of the human and mouse growth inhibitory factor-encoding genes. *Gene* 1994;144:283-287.
- 31 Zheng H, Berman NEJ, Klaassen CD: Chemical modulation of metallothionein I and III mRNA in mouse brain. *Neurochem Int* 1995;27:43-58.
- 32 Liang L, Fu K, Lee DK, Sobieski RJ, Dalton T, Andrews GK: Activation of the complete mouse metallothionein gene locus in the maternal deciduum. *Mol Reprod Dev* 1996;43:25-37.
- 33 Lehman-McKeeman LD, Kershaw WC, Klaassen CD: Species differences in metallothionein regulation: A comparison of the induction of isometallothioneins in rats and mice; in Klaassen CD, Suzuki KT (eds): *Metallothionein in Biology and Medicine*. Boca Raton, CRC Press, 1991, pp 121-131.
- 34 Hidalgo J, Rhee SJ, Huang PC, Garvey JS: Differential effect of adrenalectomy on rat liver metallothionein mRNA levels in basal and stress conditions. *Horm Metab Res* 1992;24:233-236.
- 35 Watanabe Y, Gould E, McEwen BS: Stress induces atrophy of apical dendrites of hippocampal CA3 pyramidal neurons. *Brain Res* 1992;588:341-345.
- 36 Uno H, Tarara R, Else JG, Suleman MA, Sapolsky RM: Hippocampal damage associated with prolonged and fatal stress in primates. *J Neurosci* 1989;9:1705-1711.
- 37 Palmiter RD: Constitutive expression of metallothionein-III (MT-III), but not MT-I, inhibits growth when cells become zinc deficient. *Toxicol Appl Pharmacol* 1995;135:139-146.

Treball 3

Hernández, J., Beloso, E., Rebollo, D. V., Romero, B. and Hidalgo, J.

Glucocorticoids mediate mouse liver metallothionein response to stress.

Manuscript.

GLUCOCORTICOIDS MEDIANE MOUSE LIVER METALLOTHIONEIN RESPONSE TO STRESS¹

JOAQUIN HERNANDEZ, EVA BELLOSO, DARIA V. REBOLLO, BEATRIZ ROMERO AND JUAN HIDALGO

Departamento de Biología Celular y Fisiología, Unidad de Fisiología Animal, Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de Barcelona (J. H., E. B. and J. H.), Bellaterra 08193, Barcelona, Spain and División de Isótopos, Centro de Investigaciones Energéticas Medioambientales y Tecnológicas, Avenida Complutense (D. V. R. and B. R.), Madrid 28040, Spain.

¹These studies were supported by the Dirección General de Investigación Científica y Técnica (PB91-0489 and PB94-0667). The authors also acknowledge the support of the Acción Integrada Hispano-Británica 107B and Comissió Interdepartamental de Recerca i Innovació Tecnològica (GRQ93-2096).

a) Running title: Role of glucocorticoids and cytokines on MT regulation

b) Corresponding Author:

Dr. J. Hidalgo.

Departamento de Biología Celular y Fisiología, Unidad de Fisiología Animal, Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de Barcelona, Bellaterra 08193, Barcelona. SPAIN.

Telephone: (34-3) 581 20 37.

Fax: (34-3) 581 23 90.

E-mail: HIDALGO@CC.UAB.ES

c) Abbreviations:

MT, metallothionein; MT-I+II, metallothionein-I + metallothionein-II; ADX, adrenalectomy; sham-ADX, sham-operated; GREs, glucocorticoid receptor elements; RU 486, glucocorticoid receptor blocker; IL-1, interleukin-1; IL-6, interleukin-6; TNF, tumor necrosis factor; ACTH, adenocorticotropin hormone; ANOVA, analysis of variance.

ABSTRACT

The physiological role of glucocorticoids on liver metallothionein (MT) response to stress was investigated in mice. Immobilization stress significantly increased liver MT-I mRNA and total MT-I+II protein levels. Both adrenalectomy (ADX) and the administration of the antiglucocorticoid RU 486 decreased MT-I+II protein accumulation in mice. In addition, glucocorticoids but not progesterone were able to antagonize the effect of RU 486. These results suggest that glucocorticoids are important for the control of liver MT levels during stress in mice, which contrasts with previous results in the rat. The results with MT-I mRNA suggest that this effect is mostly, but not solely, of a transcriptional nature. A role for glucocorticoids in the control of serum MT levels was also evident. The results with the low cytokine producer C3H/HeJ mice suggest that cytokines could also be mediators of the liver MT response to stress.

INTRODUCTION

Metallothionein (MT) genes encode low molecular weight proteins which are remarkably produced in most eucaryotic organisms. These proteins avidly bind heavy metals such as zinc and copper in physiological conditions, metals which furthermore are inducers of the MT genes (Bremner, 1987; Hamer, 1986; Sato and Bremner, 1993; Yagle and Palmiter, 1985). MTs have consequently been considered important proteins in zinc and copper homeostasis, but other functions are also likely (Sato and Bremner, 1993). In the liver of most mammals, two MT isoforms, MT-I and MT-II, are thoroughly expressed; in mice, these genes are closely linked on chromosome 8 and are coordinately regulated (Searle *et al.*, 1984; Yagle and Palmiter, 1985). Glucocorticoids are potentially major regulators of MT-I+II expression, since functional glucocorticoid responsive elements (GREs) have been demonstrated in the mouse MT genes (Palmiter *et al.*, 1993; Plisov *et al.*, 1994). However, the role of these hormones on liver MT regulation in physiological conditions is mostly unknown, since most studies have been carried out in cultured cells or after the exogenous administration of glucocorticoids. Moreover, results in the rat are rather in disagreement with the expected positive role of glucocorticoids (Brady and Burger, 1979; Gasull *et al.*, 1994; Hidalgo *et al.*, 1988; Min *et al.*, 1992) and references therein. In mice, in contrast, Quaife *et al.* (Quaife *et al.*, 1986) have convincingly demonstrated that glucocorticoids are essential for liver MT regulation during development, and as far as we know this study stands as the only one implicating these hormones in the control of the liver MT genes in a physiological context. Here we present data obtained in adult mice which demonstrate that glucocorticoids are also mediating factors of the liver MT response to stress, indicating that these hormones are essential regulators of liver MT in this species.

METHODS

Animals.

Adult male Swiss (Experiments 1-9), CD-1 and C3H/HeJ (Exp. 10) mice were used in the experiments; they were maintained under standard laboratory conditions (lights on from 0700 to 1900 h, 22°C, food and water provided ad libitum) for at least one week before starting experiments. Animals were treated meeting the highest standards of humane care following the guidelines of the Autonomous University of Barcelona proper Committee.

Experiment 1. Effect of adrenalectomy on liver MT response to stress.

Mice were bilaterally adrenalectomized (ADX) or sham-operated (sham-ADX) under ether anesthesia. The animals were then housed two per cage, and ADX animals were given saline to drink. The experimental procedures (immobilization stress; mice were immobilized by enclosing them in a wrapping of metallic net) were started 8 days after surgery. Mice were subjected to various lengths of stress (3, 8 and 18 hours) and were killed along unstressed (basal) animals. Liver MT-I mRNA and total MT-I+II protein levels were measured.

Experiments 2-6. Effect of RU 486 on the pituitary-adrenal axis and on liver MT response to stress.

To block the glucocorticoid receptors, the glucocorticoid receptor blocker RU 486 (100 mg/kg except otherwise stated) was given orally as a suspension in aqueous solution containing 0.25% carboxymethyl cellulose and 0.2% Polysorbate 80, in a volume of 10 ml/kg. In all stress experiments (including experiment 10, see below), RU 486 was administered twice, approximately 20 and 2 hours before subjecting the animals to stress. In experiment 2 a different protocol was followed (see below). Control animals always received the vehicle.

Experiment 2 was designed to verify the effectiveness of the dosage of RU 486 used in the following experiments for blocking the glucocorticoid interaction with their receptors. To this end, RU 486 was given once in the morning at the dosages of 10 and 100 mg/kg, and killed 3 hours later. The function of the pituitary-adrenal axis was determined by measuring circulating ACTH and corticosterone levels.

In experiment 3 mice were stressed for 0, 3, 6 and 8 hours, killed, and their liver MT-I mRNA levels measured. Simultaneously (experiment 4) other mice from the same set of animals were stressed for 0, 8 and 18 hours, killed, and their total liver MT-I+II protein levels measured.

Experiments 5 and 6 were carried out in order to confirm the results of the previous ones and also to study the effect of food and water deprivation on liver MT levels, which unavoidably accompanies immobilization stress.

Experiments 7-8. Reversibility of the effect of RU 486 by the administration of glucocorticoids and progesterone.

Since RU 486 may interact with glucocorticoid and progesterone receptors (Philibert, 1984), we studied the reversibility of the effects of RU 486 on MT levels by these two types of hormones. In experiment 7, mice were treated with RU 486 as above at a dosage of 200 mg/kg. Some mice were subjected to 18 hours of stress, and were killed along basal animals. Both basal and stressed animals were divided initially into three groups, each receiving i.p. injections of either (i) saline, (ii) corticosterone (20 mg/kg), or (iii) progesterone (2 mg/kg). The animals received three injections at 0, 5 and 8 hours after the onset of immobilization stress.

In experiment 8, mice were treated with RU 486 at a dosage of 100 mg/kg. The protocol followed was similar to that of experiment 7, but with some modifications and fewer groups (see Table 3). The modifications were the length of stress, which was of 8 hours, the administration of dexamethasone (20 mg/kg) instead of corticosterone, and that progesterone was administered at a higher dose (20 mg/kg).

Experiment 9. Putative agonist action of RU 486.

Since it has been described that RU 486 may exert agonist actions in some cases (Bamberger and Chrousos, 1995; Havel *et al.*, 1996), in this experiment we injected mice with the synthetic glucocorticoid dexamethasone following a similar schedule that with RU 486 in the previous experiments. Thus, mice were injected twice with dexamethasone at a dosages of 2 mg/Kg and 10 mg/Kg, approximately 20 and 2 hours before subjecting the animals to stress. The stressed mice were killed along basal animals 6 hours after the onset of stress.

Experiment 10. Liver MT response to stress of the low cytokine producer C3H/HeJ mice. Effect of RU 486.

The putative role of cytokines on the liver MT response to stress was studied in the low cytokine producer mice strain C3H/HeJ (Vogel, 1992), which presents a mutation in the *Lps* gene, mapped to chromosome 4. The strain CD-1 was used as control animals in accordance with previous MT studies (De *et al.*, 1990). Vehicle- and RU 486-treated mice from the two strains were subjected to 0, 3 and 8 hours of stress, and their liver MT-I mRNA and total MT-I+II protein levels were measured.

Assays.

Mice were killed by cervical dislocation or decapitation depending on the experiment. In those experiments where liver MT-I mRNA was to be measured, a piece of tissue of approximately 100 mg was immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until RNA extraction. For MT assay, the livers were stored at -20°C; later, cytosols were prepared as previously described (Hidalgo *et al.*, 1988).

MT-I+II protein measurements. MT levels were measured by either RIA (Gasull *et al.*, 1993) or occasionally, by ELISA (Exp. 6 of Table 2) (Gasull *et al.*, 1994) using the same polyclonal antibody which cross-reacts with MT-I and MT-II.

MT-I mRNA measurements. RNA was isolated following established procedures (Chomczynski and Sacchi, 1987). Mouse MT-I mRNA levels were measured by Northern-blot and dot-blot as previously described (Belloso *et al.*, 1996) using the cDNA generously provided by Dr. R.D. Palmiter (University of Washington, Seattle, WA). A γ -actin probe (cDNA kindly provided by Dr. Albert Boronat, University of Barcelona through Dr. P. Suau) was used to normalize the MT-I mRNA data. MT-I is one of the two MT isoforms expressed in the liver of these animals, but the regulation of the expression of both isoforms by glucocorticoids and heavy metals is coordinated (Lehman-McKeeman *et al.*, 1988; Searle *et al.*, 1984; Yagle and Palmiter, 1985) and therefore its measurement is in principle indicative of the control of the two liver MT genes.

ACTH and corticosterone measurements. Circulating ACTH and corticosterone were measured in plasma and serum, respectively, by immunoradiometry (Nichols Institute Diagnostics, CA) and radioimmunoanalysis (Lahmame *et al.*, 1996).

Statistical analysis. Results were analyzed with one, two- or three-way ANOVA. When appropriate, multiple mean comparisons were carried out with the Duncan procedure.

RESULTS

Experiment 1. Effect of adrenalectomy on liver MT response to stress.

Northern blot analysis demonstrated that with the hybridizing and washing conditions employed the signal-to-noise ratio is high enough as to allow the use of dot blots for MT-I and actin mRNAs measurement, a more convenient technique for measuring multiple samples (data not shown). Therefore, in the following experiments we used dot blot for measuring mRNA levels of each independent animal. We have previously shown that in these conditions there is no cross-hybridization of the MT-I probe with MT-II mRNA (Belloso *et al.*, 1996).

Immobilization stress clearly increased liver MT levels (Figure 1), a process involving presumably increased gene transcription given the observed changes in the MT-I mRNA levels. ADX tended to decrease liver MT-I mRNA levels during stress, but this was not statistically significant. However, ADX did decrease liver total MT-I+II protein levels, suggesting that the effect of ADX is more dramatic for the protein than for the transcripts.

Experiments 2-6. Effect of RU 486 on the pituitary-adrenal axis and on liver MT response to stress.

We next evaluated the effect of the glucocorticoid receptor blocker RU 486 in Swiss mice. In agreement with the results for rats (Hidalgo *et al.*, 1988), in mice the dosage of 100 mg/kg of RU 486 used was effectively blocking the glucocorticoid receptors as demonstrated by the changes observed in the pituitary-adrenal axis (Table 1). The results for liver MT regulation (Figure 1) were somewhat similar to those observed in ADX animals, since RU 486 clearly tended to decrease MT-I mRNA levels ($p < 0.060$) whereas a more dramatic effect was observed for the total MT-I+II protein levels.

The experiments 5 and 6 confirmed the significant effect of RU 486 on liver MT-I+II levels (Table 2). They also demonstrated that the effect of food and water

deprivation, which accompanies that of immobilization stress, was significantly smaller than the latter, indicating a specific effect of stress on liver MT-I+II levels. The administration of RU 486 did not affect liver MT induction by starvation.

Experiments 7-8. Reversibility of the effect of RU 486 by the administration of glucocorticoids and progesterone.

In these experiments the significant effect of RU 486 during stress was again demonstrated (Table 3). It was also clear that the administration of corticosterone to control basal mice caused the expected liver MT induction, which was blocked by RU 486. Corticosterone administration did not further increase liver MT levels of stressed mice, presumably because the endogenous circulating corticosterone levels were causing already the maximum effect. At the dosage given, corticosterone tended to reverse partially the effect of RU 486 on liver MT levels of stressed mice, but this effect was not statistically significant. When dexamethasone instead of corticosterone was given, a statistically significant reversing effect was then observed. In contrast, progesterone did not affect either basal or stress hepatic MT levels. These results suggest that glucocorticoid but not progesterone receptors are involved in liver MT regulation.

The results for serum MT levels (Table 3) were in agreement with those for liver MT, since stress clearly increased them and glucocorticoids appear to be major regulators as demonstrated by both the effects of the exogenous corticosterone or dexamethasone administration and the effect of RU 486 during stress.

Experiment 9. Putative agonist action of RU 486.

Table 4 shows that it is highly unlikely that the effects of RU 486 above described are due to an agonistic action, since the previous administration of dexamethasone to stress, following the same schedule that with RU 486, did not affect liver MT response to stress.

Experiment 10. Liver MT response to stress of the low cytokine producer C3H/HeJ mice. Effect of RU 486.

Since neither ADX nor RU 486 were able to completely block liver MT response to stress, it might be inferred that other factors in addition to glucocorticoids released during stress are also important for liver MT regulation. The putative role of cytokines

was studied in the low cytokine producer C3H/HeJ mice (Figure 2), since a number of cytokines are known to be potent inducers of liver MT synthesis (Cousins and Leinart, 1988; Friedman and Stark, 1985; Sato *et al.*, 1994; Schroeder and Cousins, 1990). We also evaluated the effect of RU 486 in this experiment. When compared with the CD-1 mice, a lower liver MT-I mRNA and total MT protein responses to acute stress was clearly observed in the C3H/HeJ strain, suggesting that cytokines, in addition to glucocorticoids, could also be mediators of the response of liver MT to acute stress. This has been further supported in studies performed with mice carrying a null mutation in the IL-6 gene (Hernández *et al.*, submitted). RU 486 decreased equally the MT production in both strains, indicating that glucocorticoids and cytokines were acting through independent mechanisms.

DISCUSSION

The present studies clearly demonstrate that glucocorticoids are important mediators for the liver MT response to stress in adult mice. Therefore, these hormones are important physiological regulators of mouse liver MT not only during development, as demonstrated previously (Quaife *et al.*, 1986), but also in adult life.

A role of glucocorticoids on liver MT regulation could, in principle, be expected from previous results. Thus, the two MT isoforms expressed in the mouse liver are coordinately regulated by glucocorticoids (Mayo and Palmiter, 1985; Searle *et al.*, 1984; Yagle and Palmiter, 1985) and functional GREs are present in the MT genes (Palmiter *et al.*, 1993; Plisov *et al.*, 1994). Since stress increases the activity of the pituitary-adrenal axis, it seems logical to think that glucocorticoids will mediate liver MT response to stress. However, the published results with other widely studied species, the rat, indicate that that possibility is not so straight forward. Rat liver MT genes are also coordinately regulated by glucocorticoids (Lehman-McKeeman *et al.*, 1988; Mayo and Palmiter, 1985), and there is no doubt that pharmacological dosages of these hormones will increase hepatic MT levels (Gasull *et al.*, 1994; Lehman-McKeeman *et al.*, 1988; Lehman-McKeeman *et al.*, 1991). However, from these results we can not infer that glucocorticoids will be physiological regulators of rat liver MTs: a long-lasting ACTH administration fails to increase liver MT levels (Hidalgo *et al.*, 1988), and, moreover, adrenalectomy increases liver MT levels in both basal and stress situations (Brady and Burger, 1979; Gasull *et al.*, 1994; Günther *et al.*, 1989; Hidalgo *et al.*, 1988). Therefore, the role of glucocorticoids on liver MT regulation in physiological conditions may differ substantially between species, being it apparently very important in mice.

To evaluate the role of glucocorticoids, we have undertaken studies with adrenalectomized mice and also with animals administered RU 486. With both approaches, it was clear that a reduction of the availability of glucocorticoids caused a diminished effect of immobilization stress on liver MT-I+II total protein levels. To gain insight into the mechanisms involved, we measured MT-I mRNA levels and found that they were strongly increased during stress, indicating that the increased MT protein levels observed were the consequence of increased gene transcription. Despite ADX or RU 486, MT-I mRNA levels did increase during stress, although to a lower extent than in control mice which obviously would contribute to the observed

lower MT protein levels during stress of ADX and RU 486-treated mice. The effect of ADX was smaller than that of RU 486, which might be expected since ADX does not completely abolish the presence of circulating glucocorticoids because of extraadrenal production (Takeda *et al.*, 1994). Taken together, however, the results suggest that the effect of the absence of glucocorticoids is more dramatic for the total MT-I+II protein than for the MT-I mRNA. In this regard, it is noteworthy to mention that although the MT synthesis is primarily regulated at the transcriptional level, the evidence of a posttranscriptional control of these proteins is mounting (De *et al.*, 1991; Lehman-McKeeman *et al.*, 1988; Lehman-McKeeman *et al.*, 1991; Vasconcelos *et al.*, 1996). Although it has not been studied in this report, it seems unlikely that the apparent discrepancies between MT-I mRNA and MT-I+II protein levels could be explained by differences in transcription, translation and/or protein degradation rates of the two hepatic MT isoforms. Previous studies have convincingly demonstrated that the ratios of the two MT mRNAs are directly correlated with those of the isoproteins in basal and MT inducing conditions (Kershaw *et al.*, 1990; Lehman-McKeeman *et al.*, 1991).

RU 486 may interact with glucocorticoid and progesterone receptors (Philibert, 1984). The fact that glucocorticoids but not progesterone were able to reverse the effect of RU 486 on liver MT response to stress fits well with the expected role of the former hormones in mice. Furthermore, the present results with both RU 486 and progesterone administrations do not support a role of progestagens on liver MT regulation, at least in the conditions studied herein. This is in contrast with results found in human cell lines for the human MT-IIA gene, which suggest that its GRE mediates MT-IIA induction by both glucocorticoids and progestins (Slater *et al.*, 1988). On the other hand, the finding that the previous administration of dexamethasone did not decrease liver MT response to stress rules out an agonistic action of RU 486 (Bamberger and Chrousos, 1995; Havel *et al.*, 1996).

It is important to realize that in food and water deprived mice RU 486 did not have a significant effect. Starvation is a well-known liver MT inducer (Bremner and Davies, 1975; Hidalgo *et al.*, 1986), but the factors responsible for the hepatic MT response are unknown. The present results suggest that glucocorticoids would not be mediating liver MT response to starvation. Rather, a suitable candidate could be glucagon, which obviously will be increased in starved mice. Glucagon is a well-known liver MT inducer (Etzel and Cousins, 1981; Hidalgo *et al.*, 1987) and it has

been demonstrated a significant hepatic MT increase in streptozotocin treated diabetic rats (Failla and Kiser, 1983); insulin alone has no effect (Hidalgo *et al.*, 1987).

Serum MT levels correlated directly with liver MT levels, suggesting that the liver is a major source for circulating MT. The physiological significance of serum MT during stress, however, is unclear, but it could be related to its presumably Zn content, i.e., Zn homeostasis. MT secretion could be a more extended feature than previously believed, since MT has also been identified as a component of the exocrine pancreas secretion (De Lisle *et al.*, 1996).

The results demonstrate that glucocorticoids are mediators of the liver MT response to stress in mice. However, neither ADX nor RU 486 completely blocked the response to stress, suggesting that other factors could contribute to liver MT regulation during stress. In this report we investigated the putative role of cytokines by means of the comparison of the C3H/HeJ and CD-1 strains. The C3H/HeJ strain is known to be a low cytokine producer in response to endotoxin (Vogel, 1992). Cytokines such as IL-1, IL-6 and TNF are known to be potent inducers of liver MT synthesis (Cousins and Leinart, 1988; De *et al.*, 1990; Sato *et al.*, 1994; Schroeder and Cousins, 1990), and, accordingly, the C3H/HeJ mice show a lower hepatic MT response to endotoxin in comparison to CD-1 mice and other strains (De *et al.*, 1990; Liu *et al.*, 1991; Maitani *et al.*, 1986). Stress is now known to cause the release of cytokines such as IL-6 (Zhou *et al.*, 1993), which prompted us to study the effect of stress on liver MT regulation of C3H/HeJ mice. Both liver MT-I mRNA and total MT levels were significantly lower in the C3H/HeJ mice subjected to acute immobilization stress, suggesting that cytokines are important mediators of the liver MT response to stress in mice. Which cytokine could be responsible for the differences between the C3H/HeJ and the CD-1 mice can not be inferred from these results, but it is proposed that IL-6 is a good candidate for several reasons: (a) it is a direct liver MT inducer (Schroeder and Cousins, 1990), (b) it is released during stress (Zhou *et al.*, 1993), and (c) studies performed with mice carrying a null mutation in the IL-6 gene show a diminished hepatic MT response to stress (Hernández *et al.*, submitted). RU 486 decreased liver MT induction by stress comparably in the two strains, indicating that cytokines and glucocorticoids were acting independently from each other, in line with previously published results with the MT genes (Durnam *et al.*, 1984).

In summary, the present results demonstrate that glucocorticoids are important mediators of the liver MT response to stress in mice, and suggest that some cytokines such as IL-6 could be involved in MT regulation during stress in addition to glucocorticoids.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors acknowledge the generous gift of the cDNA for mouse MT-I to Dr. R.D. Palmiter. RU 486 was a generous gift of Roussel-Uclaf, France.

REFERENCES

- Bamberger, C. M. and Chrousos, G. P.: The glucocorticoid receptor and RU 486 in man. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 761: 296-310, 1995.
- Belloso, E., Hernandez, J., Giralt, M., Kille, P. and Hidalgo, J.: Effect of stress on mouse and rat brain metallothionein I and III mRNA levels. *Neuroendocrinology* 64: 430-439, 1996.
- Brady, F. O. and Burger, P. C.: The effect of adrenalectomy on zinc thionein levels in rat liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 91: 911-918, 1979.
- Bremner, I.: Interactions between metallothionein and trace elements. *Prog. Food Nutr. Sci.* 11: 1-37, 1987.
- Bremner, I. and Davies, N. T.: The induction of metallothionein in rat liver by zinc injection and restriction of food intake. *Biochem. J.* 149: 733-738, 1975.
- Chomczynski, P. and Sacchi, N.: Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162: 156-159, 1987.
- Cousins, R. J. and Leinart, A. S.: Tissue-specific regulation of zinc metabolism and metallothionein genes by interleukin 1. *Faseb J.* 2: 2884-2890, 1988.
- De Lisle, R. C., Sarras, M. P., Jr., Hidalgo, J. and Andrews, G. K.: Metallothionein is a component of exocrine pancreas secretion: implications for zinc homeostasis. *Am. J. Physiol.* 271: C1103-1110, 1996.
- De, S. K., Enders, G. C. and Andrews, G. K.: Metallothionein mRNA stability in chicken and mouse cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1090: 223-229, 1991.
- De, S. K., McMaster, M. T. and Andrews, G. K.: Endotoxin induction of murine metallothionein gene expression. *J. Biol. Chem.* 265: 15267-15274, 1990.
- Durnam, D. M., Hoffman, J. S., Quaife, C. J., Benditt, E. P., Chen, H. Y., Brinster, R. L. and Palmiter, R. D.: Induction of mouse metallothionein-I mRNA by bacterial endotoxin is independent of metals and glucocorticoid hormones. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 1053-1056, 1984.
- Etzel, K. R. and Cousins, R. J.: Hormonal regulation of liver metallothionein zinc: independent and synergistic action of glucagon and glucocorticoids. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 167: 233-236, 1981.
- Failla, M. L. and Kiser, R. A.: Hepatic and renal metabolism of copper and zinc in the diabetic rat. *Am. J. Physiol.* 244: E115-121, 1983.

- Friedman, R. L. and Stark, G. R.: alpha-Interferon-induced transcription of HLA and metallothionein genes containing homologous upstream sequences. *Nature* 314: 637-639, 1985.
- Gasull, T., Giralt, M., Hernandez, J., Martinez, P., Bremner, I. and Hidalgo, J.: Regulation of metallothionein concentrations in rat brain: effect of glucocorticoids, zinc, copper, and endotoxin. *Am. J. Physiol.* 266: E760-767, 1994.
- Gasull, T., Rebollo, D. V., Romero, B. and Hidalgo, J.: Development of a competitive double antibody radioimmunoassay for rat metallothionein. *J. Immunoassay* 14: 209-225, 1993.
- Günther, T., Vormann, J. and Ghaida, J.: Induction of hepatic metallothionein by salicylate in adult rats. *Biol. Trace Elem. Res.* 20: 243-249, 1989.
- Hamer, D. H.: Metallothionein. *Annu. Rev. Biochem.* 55: 913-951, 1986.
- Havel, P. J., Busch, B. L., Curry, D. L., Johnson, P. R., Dallman, M. F. and Stern, J. S.: Predominately glucocorticoid agonist actions of RU 486 in young specific-pathogen-free Zucker rats. *Am. J. Physiol.* 271: R710-717, 1996.
- Hidalgo, J., Armario, A., Flos, R., Dingman, A. and Garvey, J. S.: The influence of restraint stress in rats on metallothionein production and corticosterone and glucagon secretion. *Life Sci.* 39: 611-616, 1986.
- Hidalgo, J., Garvey, J. S. and Armario, A.: The role of catecholamines and glucagon on serum and liver metallothionein response to restraint stress. *Rev. Esp. Fisiol.* 43: 433-438, 1987.
- Hidalgo, J., Giralt, M., Garvey, J. S. and Armario, A.: Physiological role of glucocorticoids on rat serum and liver metallothionein in basal and stress conditions. *Am. J. Physiol.* 254: E71-78, 1988.
- Kershaw, W. C., Lehman-McKeeman, L. D. and Klaassen, C. D.: Hepatic isometallothioneins in mice: induction in adults and postnatal ontogeny. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 104: 267-275, 1990.
- Lahmame, A., Gómez, F. and Armario, A.: Fawn-hooded rats show enhanced active behaviour in the forced swimming test, with no evidence for pituitary-adrenal axis hyperactivity. *Psychopharmacology* 125: 74-78, 1996.
- Lehman-McKeeman, L. D., Andrews, G. K. and Klaassen, C. D.: Induction of hepatic metallothioneins determined at isoprotein and messenger RNA levels in glucocorticoid-treated rats. *Biochem. J.* 249: 429-433, 1988.

- Lehman-McKeeman, L. D., Kershaw, W. C. and Klaassen, C. D.: Species differences in metallothionein regulation: a comparison of the induction of isometallothioneins in rats and mice. In *Metallothionein in Biology and Medicine*, ed. by C. D. Klaassen and K. T. Suzuki, pp. 121-131, CRC Press, Boston, 1991.
- Liu, J., Liu, Y. P., Sendelbach, L. E. and Klassen, C. D.: Endotoxin induction of hepatic metallothionein is mediated through cytokines. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 109: 235-240, 1991.
- Maitani, T., Saito, Y., Fujimaki, H. and Suzuki, K. T.: Comparative induction of hepatic zinc-thionein and increase in tissue calcium by bacterial endotoxin in endotoxin-sensitive (C3H/HeN) and endotoxin-resistant (C3H/HeJ) mice. *Toxicol. Lett.* 30: 181-187, 1986.
- Mayo, K. E. and Palmiter, R. D.: Glucocorticoid regulation of metallothionein gene expression. In *Biochemical actions of hormones*, ed. by G. Litwack, pp. 69-88, Academic, N. Y., 1985.
- Min, K. S., Mukai, S., Ohta, M., Onosaka, S. and Tanaka, K.: Glucocorticoid inhibition of inflammation-induced metallothionein synthesis in mouse liver. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 113: 293-298, 1992.
- Palmiter, R. D., Sandgren, E. P., Koeller, D. M. and Brinster, R. L.: Distal regulatory elements from the mouse metallothionein locus stimulate gene expression in transgenic mice. *Mol. Cell. Biol.* 13: 5266-5275, 1993.
- Philibert, D.: An original multifaceted antihormone in vivo. In *Adrenal steroid antagonism*, ed. by M. K. Agarwal, pp. 77-101, Gruyter and Co., Berlin, 1984.
- Plisov, S. Y., Nichiporenko, M. G., Shkapenko, A. L., Kumarev, V. P., Baranova, L. V. and Merkulova, T. I.: The immediate vicinity of mouse metallothionein-I gene contains two sites conferring glucocorticoid inducibility to the heterologous promoter. *FEBS Lett.* 352: 339-341, 1994.
- Quaife, C., Hammer, R. E., Mottet, N. K. and Palmiter, R. D.: Glucocorticoid regulation of metallothionein during murine development. *Dev. Biol.* 118: 549-555, 1986.
- Sato, M. and Bremner, I.: Oxygen free radicals and metallothionein. *Free Radic. Biol. Med.* 14: 325-337, 1993.
- Sato, M., Sasaki, M. and Hojo, H.: Differential induction of metallothionein synthesis by interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha in rat tissues. *Int. J. Immunopharmacol.* 16: 187-195, 1994.

- Schroeder, J. J. and Cousins, R. J.: Interleukin 6 regulates metallothionein gene expression and zinc metabolism in hepatocyte monolayer cultures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 3137-3141, 1990.
- Searle, P. F., Davison, B. L., Stuart, G. W., Wilkie, T. M., Norstedt, G. and Palmiter, R. D.: Regulation, linkage, and sequence of mouse metallothionein I and II genes. *Mol. Cell. Biol.* 4: 1221-1230, 1984.
- Slater, E. P., Cato, A. C., Karin, M., Baxter, J. D. and Beato, M.: Progesterone induction of metallothionein-IIA gene expression. *Mol. Endocrinol.* 2: 485-491, 1988.
- Takeda, Y., Miyamori, I., Yoneda, T., Iki, K., Hatakeyama, H., Blair, I. A., Hsieh, F.-Y. and Takeda, R.: Synthesis of corticosterone in the vascular wall. *Endocrinology* 135: 2283-2286, 1994.
- Vasconcelos, M. H., Tam, S. C., Beattie, J. H. and Hesketh, J. E.: Evidence for differences in the post-transcriptional regulation of rat metallothionein isoforms. *Biochem. J.* 315: 665-671, 1996.
- Vogel, S. N.: The Lps gene: insights into the genetic and molecular basis of LPS responsiveness and macrophage differentiation. In *Tumor necrosis factors: the molecules and their emerging role in medicine*, ed. by B. Beutler, pp. 485-513, Raven Press, New York, 1992.
- Yagle, M. K. and Palmiter, R. D.: Coordinate regulation of mouse metallothionein I and II genes by heavy metals and glucocorticoids. *Mol. Cell. Biol.* 5: 291-294, 1985.
- Zhou, D., Kusnecov, A. W., Shurin, M. R., Depaoli, M. and Rabin, B. S.: Exposure to physical and psychological stressors elevates plasma IL-6: relationship to the activation of hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Endocrinology* 133: 2523-2530, 1993.

TABLE 1. Effect of RU 486 on the pituitary-adrenal axis activity in mice.

	ACTH (pg/ml)	CORTICOSTERONE (μ g/100 ml)
Vehicle	10.81 \pm 0.69	2.30 \pm 0.22
RU 486 10 mg/kg	13.08 \pm 3.08	2.08 \pm 0.37
RU 486 100 mg/kg	105.2 \pm 48.6*	36.2 \pm 2.42*

Results are means \pm SE (n=6). One-way ANOVA was significant in both cases ($p < 0.05$), and multiple comparisons of the means were carried out with the Duncan procedure. * $p < 0.05$ vs vehicle mice.

TABLE 2. Effect of RU 486 on mice liver MT response to stress and food and water deprivation.

	Experiment 5	Experiment 6
BASAL		
VEHICLE	10.2 \pm 3.58	5.46 \pm 2.20
RU 486	8.28 \pm 4.2	12.5 \pm 3.5
STRESS 8 h		
VEHICLE	16.5 \pm 3.1	60.1 \pm 4.31
RU 486	7.44 \pm 2.20	46.1 \pm 9.60
STRESS 18 h		
VEHICLE	250 \pm 53	162 \pm 13.3
RU 486	69.8 \pm 18.6	89.5 \pm 14.0
DEPRIVATION 18 H		
VEHICLE		26.4 \pm 7.30*
RU 486		29.7 \pm 6.10*

Results (μ g MT/g) are mean \pm SE. n= 9 in Exp. 9 and 5-6 in Exp. 10. Two-way ANOVA indicated that stress and RU 486 affected significantly (p at least < 0.05) liver MT levels in both experiments. The interaction between both factors was not significant. Additionally, the effect of food and water deprivation was studied in Exp. 6. * p at least < 0.05 vs respective basal mice.

TABLE 3. Effect of glucocorticoid and progesterone therapies on RU 486-induced changes on mouse liver and serum MT levels.

	LIVER MT ($\mu\text{g/g}$)		SERUM MT (ng/ml)	
	Vehicle	RU 486	Vehicle	RU 486
EXP. 7				
BASAL				
Saline	19.5 \pm 1.96	12.2 \pm 1.53	18.6 \pm 0.60	21.3 \pm 2.34
Corticosterone	37.4 \pm 2.72	15.6 \pm 2.77	45.3 \pm 6.08	20.7 \pm 1.36
Progesterone	18.5 \pm 2.09	12.4 \pm 2.57	18.1 \pm 2.62	23.9 \pm 1.44
STRESS				
Saline	261 \pm 16.1	71.6 \pm 10.5	62.0 \pm 10.4	32.3 \pm 3.32
Corticosterone	248 \pm 32.9	97.8 \pm 27.3	76.8 \pm 16.4	41.1 \pm 3.86
Progesterone	270 \pm 34.0	70.4 \pm 5.24	47.9 \pm 5.54	37.1 \pm 4.04
EXP. 8				
BASAL				
Saline		18.3 \pm 4.07		20.3 \pm 0.98
STRESS				
Saline		38.0 \pm 3.79*		24.7 \pm 2.62
Dexamethasone		58.0 \pm 9.30*†		64.4 \pm 12.2*†
Progesterone		44.0 \pm 4.41*		34.6 \pm 5.46*

Results are means \pm SE (n=6-7 in both experiments). In experiment 7, three-way ANOVA with stress, RU 486 and hormone treatments as main factors indicated that all three experimental treatments affected significantly (p at least <0.025) both liver and serum MT levels. The interaction between stress and RU 486 was significant ($p<0.010$) for both liver and serum MT, whereas that between RU 486 and the hormone treatments was only significant for serum MT ($p<0.010$). The interaction between the hormone treatments and stress was not significant either for liver or serum MT. In Experiment 8, one-way ANOVA followed by the Duncan procedure indicated the stated effects: * $p<0.05$ vs basal mice, and † $p<0.05$ vs saline, stressed mice.

TABLE 4. Effect of dexamethasone on mice liver MT mRNA response to stress.

Experiment 9	Liver MT-I mRNA (ratio vs γ -actin)
BASAL	
Saline	3.94 \pm 1.25
STRESS 6 h	
Saline	28.23 \pm 1.11*
Dexamethasone 2mg/Kg	30.12 \pm 2.69*
Dexamethasone 10 mg/Kg	32.86 \pm 4.01*

Results are means \pm SE (n=4-5). One-way ANOVA followed by the Duncan procedure indicated the stated effects: *p<0.05 vs basal mice. The interaction between the dexamethasone treatments and stress was not significant.

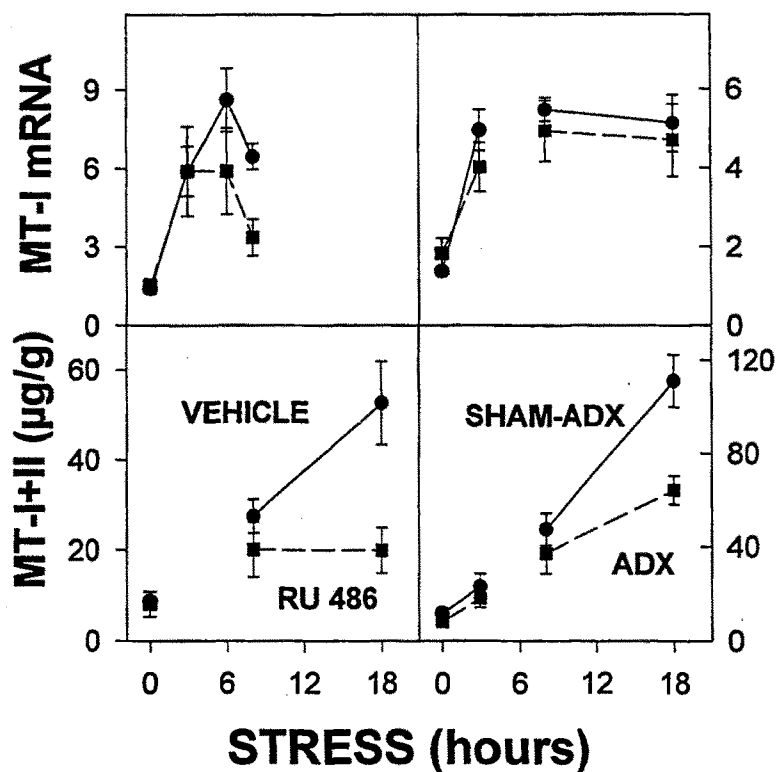


FIGURE 1. Role of glucocorticoids on mouse liver metallothionein (MT) response to immobilization stress. Glucocorticoid activity was diminished either by the administration of the glucocorticoid receptor blocker RU 486 (left) or by adrenalectomy (ADX) (right), and liver MT-I mRNA (ratio vs actin mRNA; top) and total MT protein (μg MT- I+II /g; bottom) levels were measured in basal and stress conditions. Results are mean \pm SE ($n=5-8$). Two-way ANOVA with stress and RU 486 as main factors indicated that stress increased liver MT-I mRNA levels ($p<0.001$), but that RU 486 did not affect the effect of stress, although it was close to it ($p<0.060$). For total MT levels, two-way ANOVA revealed that stress increased them significantly ($p<0.001$), whereas RU 486 decreased them ($p<0.001$). Two-way ANOVA with stress and ADX as main factors indicated that stress increased liver MT-I mRNA levels ($p<0.001$), but that ADX did not affect significantly the effect of stress. For total MT levels, two-way ANOVA revealed that stress and ADX affected them significantly ($p<0.025$).

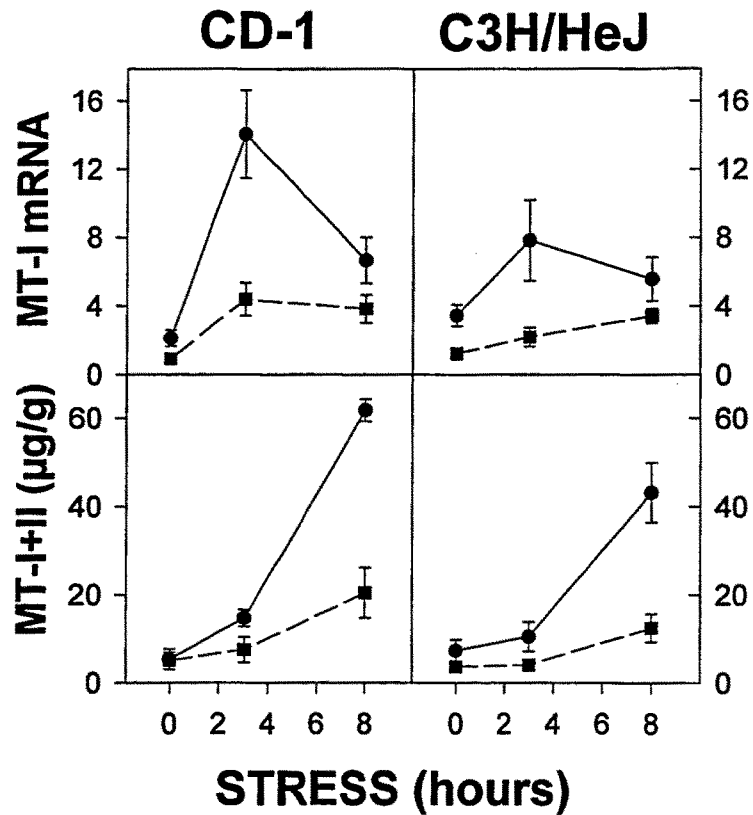


FIGURE 2. Effect of stress and RU 486 on liver MT-I mRNA (ratio vs actin mRNA; top) and MT (μg MT-I+II/g; bottom) levels of CD-1 and C3H/HeJ mice. Results are mean \pm SE ($n=5-7$). Three-way ANOVA with strain, stress and RU 486 as main factors revealed that all three factors affected significantly ($p<0.05$) liver MT-I mRNA and MT-I+II protein levels. The interaction between strain and stress, and between RU 486 and stress, was significant ($p<0.025$) for both MT-I mRNA and protein. The interaction between strain and RU 486 was not significant.

Treball 4

Hernández, J., Carrasco, J., Arbonés, M. and Hidalgo, J. (1997).
IFN- γ R^{-/-} mice show an enhanced liver and brain metallothionein-
I+II response to endotoxin but not to immobilization stress.
J. End. Res. 4 (5): 363-370.

Research

Journal of Endotoxin Research (1997) 4(5), 363-370
© Harcourt Brace & Co. Ltd 1997

IFN- γ R^{-/-} mice show an enhanced liver and brain metallothionein I+II response to endotoxin but not to immobilization stress

J. Hernández¹, J. Carrasco¹, M.L. Arbonés², J. Hidalgo¹

¹Departamento de Biología Celular y Fisiología, Unidad de Fisiología Animal, Facultad de Ciencias and ²Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Instituto de Biología Fundamental, Universidad Autónoma de Barcelona, Bellaterra, Barcelona, Spain

Summary Interferon- γ (IFN- γ) is known for its important antiviral activity and other immunomodulatory actions. In *in vitro* studies, this cytokine has also been involved in the control of metallothionein (MT) synthesis. MT is a low molecular weight protein comprised of several isoforms called MT-I to MT-IV; of these, MT-I+II are widely expressed, whereas MT-III and MT-IV are rather tissue specific. In the present report, we have studied *in vivo* the role of IFN- γ for a normal liver and brain MT-I+II response to immobilization stress and to an inflammatory process caused by bacterial lipopolysaccharide (LPS, endotoxin), using mice carrying a null mutation in the IFN- γ receptor gene (IFN- γ R^{-/-}). Liver MT-I mRNA and MT-(I+II) protein levels during stress of IFN- γ R^{-/-} mice were similar to those of the two parental mouse strains used to generate them, namely C57BL/6 and 129/Sv mice, and that of the F₁ C57BL/6 \times 129/Sv offspring mice. In contrast, liver MT response to LPS was significantly higher in the IFN- γ R^{-/-} mice than in the other strains. MT-I+II response to LPS was also higher in IFN- γ R^{-/-} mice in medulla plus pons and tended to in hypothalamus, hippocampus, and cerebellum, but not in the remaining brain. These results suggest that a role of IFN- γ on liver and brain MT-I+II response to stress is unlikely, but that this cytokine exerts an inhibitory effect on the signaling pathways activated by LPS involved in MT-I+II regulation. *In situ* hybridization analysis for MT-I and MT-III mRNAs of control mice revealed significant effects of the functional IFN- γ deficiency on MT-I but not MT-III mRNA levels in the dentate gyrus and the habenula, while no effects were observed in the remaining brain areas studied.

INTRODUCTION

Interferon (IFN), discovered as a viral replication interference factor in chicken embryos,¹ is now known to be a family of proteins including Type I interferons (IFN- α and

IFN- β) and Type II interferon (IFN- γ) (reviewed by Williams et al²). The primary role of Type I interferons is to inhibit viral replication by inducing enzymes that interfere with viral RNA translation.³ In contrast, IFN- γ exerts more generalized immunoregulatory functions, including antimicrobial, antiviral, and antitumor activities, and control of monocyte/macrophage, lymphocyte and neutrophil cells.² Furthermore, IFN- γ also regulates a number of functions of non immune cells, such as endothelial cells, neurons and astrocytes.^{2,4}

Previous *in vitro* studies carried out in a number of cell lines have demonstrated that both Type I interferons and IFN- γ affect metallothionein-I+II (MT-I+II) synthesis.⁵⁻¹⁰ MTs are a family of low molecular weight, cysteine-rich, heavy metal-binding proteins.^{11,12} To date, several isoforms

Received 25 August 1997.

Revised 14 November 1997

Accepted 21 November 1997

Correspondence to: Dr Juan Hidalgo, Departamento de Biología Celular y Fisiología, Unidad de Fisiología Animal, Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de Barcelona, Bellaterra, 08193 Barcelona, Spain
Tel: +34 3 581 20 37; Fax: +34 3 581 23 90
E-mail: Hidalgo@cc.uab.es

have been characterized in mammals; MT-I and MT-II are expressed virtually in all tissues, and MT-III (or growth inhibitory factor) and MT-IV are expressed specifically in the brain^{13,14} and keratinizing epithelia,¹⁵ respectively. Whereas the biochemical and molecular properties of this family of proteins are known and well documented,^{11,12} the physiological function(s) of MT remains to be fully characterized. To gain insight about which mechanisms are important for controlling MT synthesis *in vivo* is, therefore, essential for understanding the putative roles of these proteins. In the present report, we have studied the role of IFN- γ on liver and brain MT-I+II response to two major inducers of these proteins, stress and LPS,¹⁶⁻²⁶ by means of the unique approach of using mice with targeted disruption of the IFN- γ receptor gene.²⁷ The results demonstrate that *in vivo* IFN- γ exerts a rather negative effect on the signals activated by LPS involved in MT-I+II regulation, whereas a prominent role on MT regulation during stress is unlikely. The results also indicate a significant effect of IFN- γ functional deficiency on brain MT-I but not MT-III mRNA levels in specific brain areas.

MATERIALS AND METHODS

Production of IFN- γ R^{-/-} deficient mice

Mice genetically deficient for IFN- γ receptor function (IFN- γ R^{-/-}) (provided by Cell Genesys Inc., Foster City, CA, USA) were generated by gene targeting as described previously.²⁷ The presence of the mutation in these mice was confirmed by Southern blot analysis of DNA from tail biopsies and the loss of function verified by measuring IFN- γ -mediated up-regulation of MHC class I and class II antigens in peritoneal macrophages (data not shown). As controls, we used the wild-type strains, C57BL/6 (Jackson, Germany) and 129/Sv and mice C57BL/6 \times 129/Sv (the two latter kindly provided by Biological Research Lab. Ltd, Basel, Switzerland, through Dr Horst Bluethman, F. Hoffmann-La Roche Ltd, Basel, Switzerland). Animals were used for the experiments at the age of 8-9 weeks.

Maintenance of the animals

All mice were housed individually and maintained under standard laboratory conditions (lights on from 07:30 to 19:30, temperature 22°C, food and water provided *ad libitum*) for at least 1 week before starting experiments.

Effect of stress and lipopolysaccharide

We studied the effect of immobilization stress and bacterial LPS on total MT-I+II protein levels in the liver as

well as in the following brain areas (standard dissection): hypothalamus, cerebellum, medulla+pons, hippocampus and remaining brain. For stressing, the mice were immobilized by enclosing them in a wrapping of metallic net for 4 and 18 h and then killed alongside unstressed (basal) animals. LPS (lipopolysaccharide from *Escherichia coli* 0127:B8) was purchased from Sigma (St Louis, MO, USA) and injected intraperitoneally (1 mg/kg, in saline) 18 h before sacrificed. We also measured hepatic MT-I mRNA levels in the basal and 4 h stressed mice.

mRNA isolation and analysis

Livers were removed and immediately snap-frozen in liquid nitrogen. Mouse MT-I mRNA levels were analyzed by dot-blot as previously described²⁸ using as probe the cDNA generously provided by Dr R.D. Palmiter (University of Washington, Seattle, WA, USA). A γ -actin probe (cDNA generously provided by Dr A. Boronat, University of Barcelona, through Dr X. Aviles, Autonomous University of Barcelona) was used to normalize the MT-I mRNA.

MT protein assay

MT levels were measured by radioimmunoassay (RIA) as described previously²⁹ using a polyclonal antibody which cross-reacts with rat MT-I and MT-II but not with MT-III. We have also observed cross-reaction with mouse MT-I and MT-II. The brains were dissected, homogenized and assayed by RIA on the same day, which is essential for obtaining comparable results.

In situ hybridization analysis of brain MT-I and MT-III mRNA levels

Brain MT-I and MT-III mRNA levels were assayed in control, unstressed C57BL/6 and IFN- γ R^{-/-} mice by *in situ* hybridization. The animals were killed and their brains removed, frozen and stored at -80°C. Serial coronal sections (20 μ m in thickness) were obtained from the frozen brains with a cryostat and mounted on slides coated with poly-L-lysine, which were then maintained at -80°C until the day of analysis.

For MT-I mRNA studies, we used the same mouse cDNA stated above. For MT-III mRNA studies, and in order to avoid cross-hybridization with MT-I and MT-II mRNAs, we have used a specific DNA fragment of 153 bp that contains the coding region for the terminal 15 aminoacids and the 3' untranslated region until the poly G stretch of MT-III mRNA (generously provided by Dr G. K. Andrews, Department of Biochemistry, Kansas City, KS, USA). Both the MT-I and MT-III cDNAs were labelled with [³⁵S]- α -UTP using an SP6/T7 transcription kit

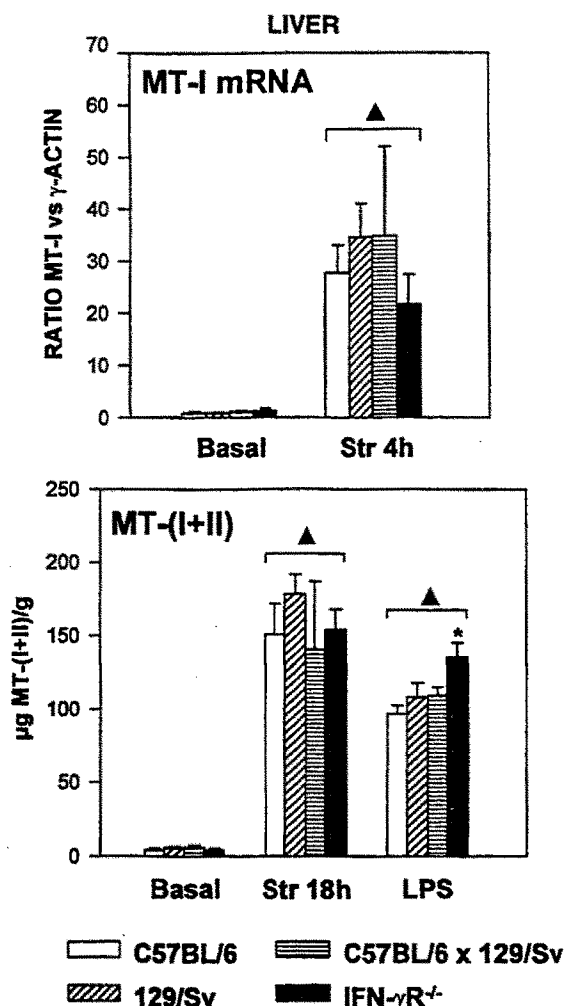


Fig. 1 Effect of immobilization stress and LPS injection on liver MT-I mRNA (ratio versus actin mRNA, top) and MT-(I+II) (μ g MT/g tissue, bottom) levels. Results are mean \pm SE ($n = 5-8$). MT-I mRNA levels were significantly increased by stress, but IFN- γ R^{-/-} mice did not respond differently to their controls. In agreement with the MT-I mRNA data, MT-I+II total protein was also significantly increased by stress, and again IFN- γ R^{-/-} mice did not respond differently to their controls. In contrast, these mice significantly responded more than two of their controls when they were challenged with LPS: (filled triangles) P at least < 0.05 vs basal mice; (stars) $P < 0.05$ vs LPS-injected C57BL/6 and C57BL/6 \times 129/Sv mice.

(Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany). In brief, the DNA was linearized by digestion with restriction endonucleases (Hind III to antisense probes and Xho I to sense probes). Of the linearized DNA (0.5 μ g/ μ l), 6 μ l was incubated with 2 μ l of transcription buffer, 2 μ l of 100 mM dithiothreitol, 0.8 μ l of RNase inhibitor, 1 μ l of 10

mM ATP, CTP and GTP, 2.4 μ l of 0.1 mM cold UTP, 2 μ l of [³⁵S]- α -UTP (20 μ Ci/ μ l) (Amersham), 0.8 μ l of RNase free H₂O and 1 μ l of RNA polymerase (T7 RNA polymerase for antisense probes, SP6 RNA polymerase for sense probes), at 37°C for 30 min. After the transcription process, the DNA was digested by adding 1 μ l of DNase and incubating for 30 min at 37°C. After DNase treatment, the RNA was extracted with phenol and phenol:chloroform:isoamyl alcohol (25:24:1). The upper phase (200 μ l) was recovered and incubated overnight with 1 μ l of tRNA (10 mg/ml), 10 μ l of 3 M sodium acetate and 500 μ l of 100% ethanol to precipitate the RNA. After centrifugation, the precipitated probe was dissolved in 50 μ l of RNase free H₂O. *In situ* hybridization was performed using procedures described by Yuguchi et al³⁰ with some modifications: the sections were incubated with 0.1 N HCl instead of proteinase K, and RNase at 10 μ g/ml instead of 1 μ g/ml was used to digest the free probe. The concentration of probe used was approximately 1×10^6 dpm/90 μ l/slide. Autoradiography was performed exposing the film (Hyperfilm-MP, Amersham) to the slides for several days. All sections to be compared were prepared simultaneously and exposed to the same autoradiographic film. MT-I or MT-III mRNA levels were semiquantitatively determined in 4 sections per brain area and animal, by measuring the optical densities and the number of pixels in defined areas with a Leica Q 500 MC system. The MT-I and MT-III mRNA values shown are expressed in arbitrary units (number of pixels \times optical density).

Statistical analysis

Results were analyzed with the Student t -test or one-way ANOVA and the SNK procedure, depending on the number of groups analyzed.

RESULTS

Hepatic MT-(I+II) induction by stress and LPS in C57BL/6, 129/Sv, C57BL/6-129/Sv and IFN- γ R^{-/-} mice

Figure 1 shows the liver data. Liver MT-I mRNA levels were significantly ($P < 0.05$) increased by immobilization stress in all strains studied; MT-I mRNA levels of IFN- γ R^{-/-} mice were not significantly different from those of the three control strains used. In agreement with MT-I mRNA data, total MT-I+II protein levels were strongly increased by 18 h of immobilization stress and the response was not different in IFN- γ R^{-/-} mice, clearly suggesting a correlation between gene transcription and protein levels. These results suggest that a role of IFN- γ for a normal liver MT response to stress is highly unlikely.

The effect of LPS on MT-I+II protein levels is also shown in Figure 1. LPS increased MT-I+II protein levels

significantly ($P < 0.05$) in all the strains studied. In contrast to the above results with immobilization stress, hepatic MT-I+II protein levels of $\text{IFN-}\gamma\text{R}^{-/-}$ mice after LPS administration were significantly increased versus those

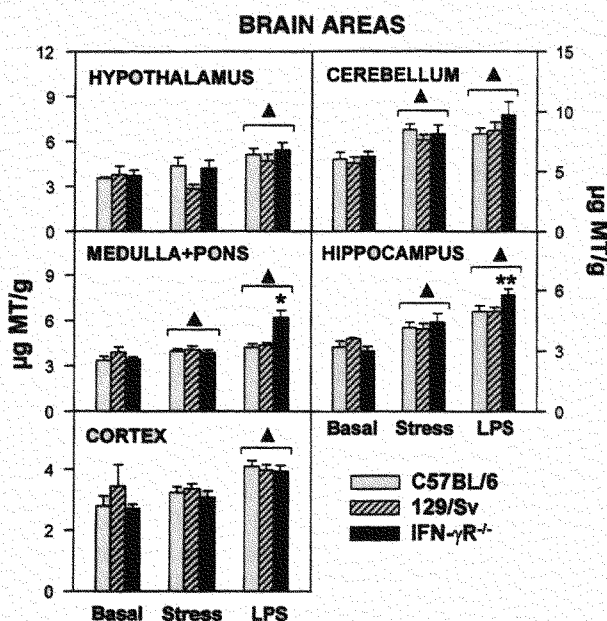


Fig. 2 Effect of immobilization stress and LPS on MT-I+II levels of specific brain areas. The brains were removed immediately after killing the mice and were frozen at -80°C . Later, the areas were dissected and processed the same day of the MT assay. Results are mean \pm SE. The number of animals per group (C57BL/6;129/Sv; $\text{IFN-}\gamma\text{R}^{-/-}$) were as follows: basal mice, 4;2;6, stressed mice, 8;5;5, endotoxin-injected mice, 8;5;6. Stress tended to increase MT-I+II levels in all brain areas, although statistical significances were obtained only in the cerebellum, medulla+pons and hippocampus ($P < 0.05$). $\text{IFN-}\gamma\text{R}^{-/-}$ mice did not respond differently to their controls. In contrast, LPS increased MT-I+II levels in all brain areas studied. In agreement with the liver results, $\text{IFN-}\gamma\text{R}^{-/-}$ mice tended to respond more to LPS than their controls. (Filled triangles) $P < 0.05$ vs basal mice; (one star) $P < 0.05$ vs C57BL/6 and 129/Sv mice; (two stars) $P < 0.05$ vs C57BL/6 but not 129/Sv mice.

of two control strains, C57BL/6 and C57BL/6 \times 129/Sv, and tended to versus the 129/Sv mice. Unfortunately, the number of mice available was limited, which precluded an increase in the size of the groups to study the MT mRNA levels 4 h after LPS as well. It was clear, however, that the three strains of control mice responded similarly to LPS, and that if $\text{IFN-}\gamma\text{R}^{-/-}$ mice are compared statistically with the three control mice pooled, a highly significant ($P < 0.005$) difference is obtained.

Brain MT-(I+II) induction by stress and LPS in C57BL/6, 129/Sv, and $\text{IFN-}\gamma\text{R}^{-/-}$ mice

Figure 2 shows the brain MT-I+II protein data. Immobilization stress tended to increase MT-I+II levels in all brain areas, this effect being statistically significant in cerebellum, medulla+pons and hippocampus ($P < 0.05$). However, brain MT-I+II response to stress of $\text{IFN-}\gamma\text{R}^{-/-}$ mice was comparable to that of control mice and, therefore, a role for $\text{IFN-}\gamma$ on brain MT-I+II response to stress is unlikely, in agreement with the liver data. Figure 2 also shows the effect of LPS on MT-I+II levels as measured 18 h after its administration. As expected, a general, significant effect of LPS was observed in all strains in all the brain areas studied. In contrast to during the stress response, $\text{IFN-}\gamma\text{R}^{-/-}$ mice increased significantly MT-I+II response to LPS in medulla plus pons ($P < 0.05$) and hippocampus (significant compared to C57BL/6 but not to 129/Sv mice), and tended to in hypothalamus and cerebellum, but not in the remaining brain (cortex). Thus, again, in agreement with the liver data, the absence of physiological actions of $\text{IFN-}\gamma$ in $\text{IFN-}\gamma\text{R}^{-/-}$ mice enhanced the effect of LPS on MT-I+II levels of some brain areas.

In situ hybridization analysis of brain MT-I and MT-III mRNA levels of C57BL/6 and $\text{IFN-}\gamma\text{R}^{-/-}$ mice

Representative autoradiographies for MT-I and MT-III mRNA are shown in Figure 3. Measurements were carried

Table In situ hybridization analysis of brain MT-I and MT-III mRNAs of control and $\text{IFN-}\gamma\text{R}^{-/-}$ mice

	MT-I		MT-III	
	C57BL/6	$\text{IFN-}\gamma\text{R}^{-/-}$	C57BL/6	$\text{IFN-}\gamma\text{R}^{-/-}$
CA1	12 \pm 1	11 \pm 4	68 \pm 48	50 \pm 2
CA2	121 \pm 23	134 \pm 19	180 \pm 67	205 \pm 29
CA3	26.7 \pm 2.3	27.5 \pm 1.4	77 \pm 20	106 \pm 15
Dentate gyrus	97 \pm 23	191 \pm 46*	175 \pm 21	240 \pm 30
Lacunosum moleculare	83 \pm 27	59 \pm 33	107 \pm 9	101 \pm 18
Habenula	213 \pm 17	131 \pm 34*	57 \pm 1.3	56.2 \pm 3.6
Retrosplenial cortex	45 \pm 20	71 \pm 41	42 \pm 18	32 \pm 8
Parietal cortex	84 \pm 13	80 \pm 24	38 \pm 18	41 \pm 11
Ependymal cells	421 \pm 48	537 \pm 61	68.2 \pm 6.3	57.5 \pm 4.6
Hypothalamus	138 \pm 51	240 \pm 94	46 \pm 9	58 \pm 13

MT-I and MT-III levels were measured in the specific brain areas stated. The results shown are the mean \pm SE ($n = 3-4$). * $P < 0.05$ vs C57BL/6 mice.

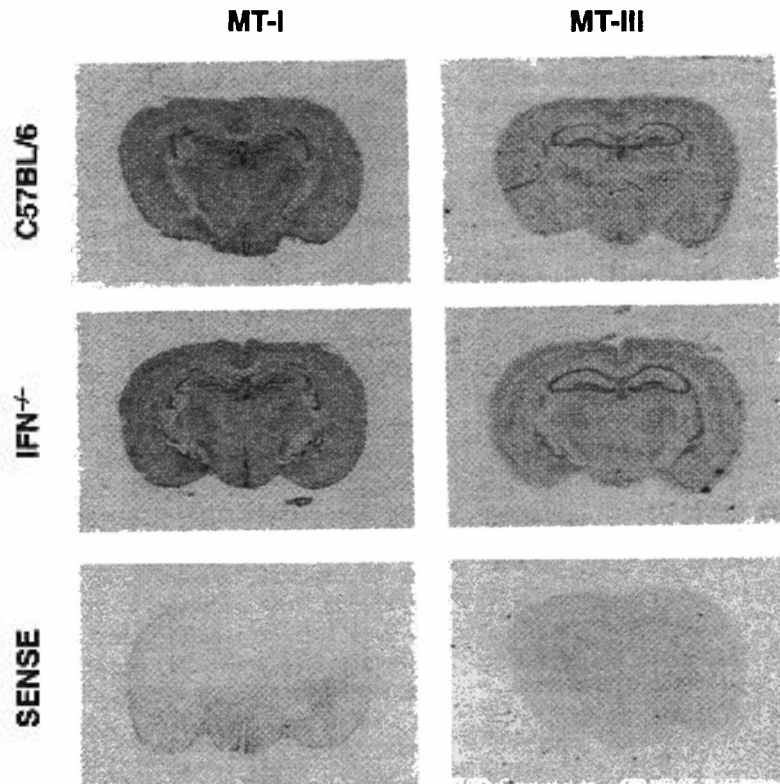
IFN- γ R^{-/-} mice : metallothionein I+II and immobilization stress responses 367

Fig. 3 Representative *in situ* hybridization results in sections from the cerebrum of C57BL/6 and IFN- γ R^{-/-} (IFN^{-/-}) for both MT-I and MT-III mRNA. The sense probes produced a very weak signal compared with the antisense MT-I and MT-III probes. An intense hybridization of the MT-III probe to pyramidal neurons of the hippocampus in the CA1-CA3 regions as well as granule cells of the dentate gyrus was observed, whereas MT-I expression was conspicuously absent in all but the CA3 neurons.

out in specific brain areas of control, unstressed mice which are shown in the Table. The functional deficiency of IFN- γ significantly ($P < 0.05$) affected MT-I mRNA levels in the hippocampal dentate gyrus area (increasing) and the habenula (decreasing) but not in the remaining brain areas studied. In contrast, MT-III mRNA levels were not significantly affected in any of the brain areas analyzed.

DISCUSSION

Stress and LPS (endotoxin) are major inducers of MT-I+II synthesis.¹⁶⁻²⁶ The factors mediating the effect of these inducers are still a matter of investigation. Although it has long been speculated that glucocorticoids could be mediating liver MT response to stress, the results for the rat are rather contradictory,¹⁸ whereas for the mouse these hormones could be important (Hernández et al, submitted). Other factors, such as catecholamines and endogenous opioids, do not appear to be important.^{23,24} A

group of factors that could be involved are the cytokines, proteins which carry out essential functions in the immune system but that also affect physiological functions of other cells.^{4,31} It is now clear that cytokines, such as IL-6 or IFN- γ , are affected by acute stress³²⁻³⁴ and, therefore, they are putative mediating factors of MT-I+II response to stress. Regarding LPS, the published literature suggests that some cytokines could be mediating factors,^{20,21} but which cytokines are actually involved remains unknown. LPS causes a plethora of changes of many cytokines including IL-1, IL-6, TNF α and IFN- α, β, γ ,^{35,36} all of which are known to affect each other's synthesis^{2,35,36} and to be inducers of MT-I+II isoforms.^{20,21,37} However, these studies have been carried out *in vitro* or after administering the cytokines exogenously, approaches which might not be physiologically relevant. In this report, we have studied the role of IFN- γ on MT-I+II regulation by the unique approach of using mice carrying a null mutation of the IFN- γ receptor.

The effect of stress on liver MT synthesis has been known for many years,^{16,18,19,22-25} although most studies were carried out in rats. Stress clearly increased liver MT synthesis in mice, a process which likely involves increased gene transcription as suggested by the MT-I mRNA data. The liver MT response to stress was very similar in the three control strains used, indicating that their different genetic background did not have a great effect on MT regulation. Both the basal levels and the hepatic MT response to stress were unaffected by the absence of functional IFN- γ , since both the MT-I transcripts and the total MT-I+II protein levels of IFN- γ R^{-/-} mice were not different from those of control mice. An effect of functional IFN- γ deficiency on MT regulation might be expected since it is known that stress reduces IFN- γ production³³ and that this cytokine increases MT levels in a number of cell lines.⁶⁻¹⁰ However, we have shown previously³⁸ that MT-I+II levels in cultured rat hepatocytes are modestly affected by IFN- γ in a rather biphasic manner and that, furthermore, glucocorticoids modulate the effect of IFN- γ . Obviously the scenario *in vivo* is much more complicated, but the present results demonstrate, nevertheless, that a prominent role of IFN- γ on liver MT regulation in basal and stress conditions is highly unlikely.

The results in the brain were in agreement with those in the liver. Stress has been shown to increase brain MT-I+II levels in rats^{18,19,22,24,25} and, in these experiments in mice, a general trend for increased brain MT-I+II levels was again observed (see Hidalgo et al³⁹ for further discussion). However, the functional deficiency of IFN- γ did not affect brain MT-I+II response to stress, again indicating that a prominent role of IFN- γ on MT-I+II regulation during stress is unlikely. Preliminary results with *in situ* hybridization analysis of MT-I mRNA agree well with these MT-I+II protein results (unpublished observations). Whether or not this cytokine will participate in MT induction by stress in other tissues remain to be established.

A different pattern emerged when studying liver and brain MT-I+II response to LPS. In both tissues, LPS has been demonstrated to increase MT-I+II expression^{20,21} and, accordingly, significant increases of total MT-I+II protein levels were observed in the liver and in most brain areas and mouse strains. It is generally assumed that LPS induction of MT synthesis is caused by the release of cytokines by LPS-activated immune cells. IFN- γ is one of the cytokines released by LPS⁷ and, therefore, the use of mice carrying a null mutation for the receptor of IFN- γ is a unique approach for determining the importance of this cytokine on MT induction by LPS. The results demonstrate that IFN- γ R^{-/-} mice have an enhanced response to LPS as far as MT-I+II is concerned, both in the liver and in most brain areas studied, with

the notable exception of the cortex. We must acknowledge, however, that statistical significances were obtained only in the liver, medulla plus pons and hippocampus. Particularly in the brain, the differences observed were small, and further studies using other experimental approaches such as *in situ* hybridization are warranted, especially because it is the only way at present to study the brain specific isoform, MT-III (see below). Nevertheless, the overall impression is that MT-I+II tended to respond more to LPS in IFN- γ R^{-/-} mice than in the control strains and that, therefore, IFN- γ exerts an inhibitory effect on the signaling pathways activated by LPS which are engaged in MT-I+II regulation. This is in contrast to results obtained in IL-6^{-/-} mice, which show a decreased liver and brain MT-I+II response to LPS (unpublished data); the latter is consistent with the results obtained in the GFAP-IL6 mice, which have targeted expression of IL-6 to astrocytes, and that show a strong upregulation of MT-I+II.⁴⁰ Therefore, specific roles of the different pro-inflammatory cytokines on MT regulation may be expected. Further studies will be needed to characterize these pathways, a huge problem given the extremely complex regulation and overlapping functions of the signaling molecules elicited by LPS.^{35,36} We have investigated the putative role of glucocorticoids, since it has been described that IFN- γ affects the activity of the pituitary-adrenal axis^{2,4,41} and these hormones are MT inducers.^{18,42} The results (data not shown) indicated that circulating corticosterone did not differ either during stress or after LPS in IFN- γ R^{-/-} mice compared to the three control strains. Consequently, glucocorticoids were not responsible for the observed differences. It is noteworthy to mention here that LPS induction of MT is independent of metals and glucocorticoids.¹⁷

Finally, we have carried out an *in situ* hybridization analysis of MT-I and MT-III mRNAs of control, unstressed IFN- γ R^{-/-} mice, which allowed us to determine more precisely brain area-specific effects of IFN- γ functional deficiency. The well-known different pattern of hybridization of the MT-I and MT-III probes described by Masters et al⁴³ was obtained, indicating that the results were reliable. The results for MT-I mRNA demonstrated a good agreement with the previous MT-I+II protein levels measured in tissue homogenates. However, significant differences between IFN- γ R^{-/-} and control mice were identified in the dentate gyrus and the habenula. In contrast, no effect of IFN- γ R deficiency was observed on MT-III mRNA levels. Very little is known of the regulation and putative functions of this brain specific isoform, but most previous data suggest that MT-III is basically unresponsive to factors which profoundly affect MT-I regulation.⁴⁴ The present results are in line with the previous findings, at least in control, unstressed mice. Further experiments using *in situ* hybridization analysis

are warranted to characterize the stress and inflammatory MT responses in the brain.

In summary, the results with IFN- γ R^{-/-} mice demonstrate for the first time that IFN- γ has a role in vivo on the control of liver and brain MT-I+II levels but, in contrast to what might be expected from previous studies, the overall effect is inhibitory rather than stimulatory. This effect occurs in the context of the inflammatory response elicited by LPS, but not in other scenarios such as in basal and stress conditions.

ACKNOWLEDGEMENTS

The technical assistance of O. Jiménez and J.M. Graells is gratefully appreciated. The help of the Laboratori d'Anàlisi Bioquímica of the Departament de Bioquímica i Biologia Molecular is appreciated. The help of J. Cantó and G. Gordillo from the Servei d'Estabulari is gratefully appreciated. J. Carrasco is a fellow of the CIRIT, FI/96-2613. This work was supported by the DGICYT PB94-0667, CICYT SAF96-0189 and the CIRIT 1995SGR 00499.

REFERENCES

- Isaacs A, Lindenmann J. Virus interference. I. The interferon. *Proc R Soc Lond [Biol]* 1957; 147: 258.
- Williams J.G., Jurkovich G.J., Maier R.V. IFN- γ : a key immunoregulatory lymphokine. *J Surg Res* 1993; 54: 79-93.
- Stanton G.J., Baron S. Interferon and viral pathogenesis. In: Notkins A.I., Oldstone M.B.A. (eds) *Concepts in Viral Pathogenesis*. New York: Springer-Verlag, 1985: 3.
- Plata-Salaman C.R. Immunoregulators in the nervous system. *Neurosci Biobehav Rev* 1991; 15: 185-215.
- Kusari J., Tiwari R.K., Kumar R., Sen G.C. Expression of interferon-inducible genes in RD-114 cells. *J Virol* 1987; 61: 1524-1531.
- Morris S., Huang P.C. Transient response of amplified metallothionein genes in CHO cells to induction by alpha interferon. *Mol Cell Biol* 1987; 7: 600-605.
- Farber J.M. A collection of mRNA species that are inducible in the RAW 264.7 mouse macrophage cell line by IFN- γ and other agents. *Mol Cell Biol* 1992; 12: 1535-1545.
- Gupta V., Jani J.P., Emerson E.O. et al. Modulation of cisplatin sensitivity and accumulation by interferon alpha-2A in human squamous carcinoma cell lines. *Int J Cancer* 1995; 63: 419-422.
- Sciavolino P.J., Vilcek J. Regulation of metallothionein gene expression by TNF- α and IFN- β in human fibroblasts. *Cytokine* 1995; 7: 242-250.
- Vanguri P. Interferon-gamma-inducible genes in primary glial cells of the central nervous system: comparisons of astrocytes with microglia and Lewis with brown Norway rats. *Neuroimmunology* 1995; 56: 35-43.
- Kägi J.H.R., Kojima Y. Chemistry and biochemistry of metallothionein. In: *Metallothionein II*. Basel: Birkhäuser, 1987: 25-61.
- Suzuki K.T., Imura N., Kimura M. (eds). *Metallothionein III*. Basel: Birkhäuser, 1993.
- Uchida Y., Takio K., Titani K., Ihara Y., Tomonaga M. The growth inhibitory factor that is deficient in the Alzheimer's disease brain is a 68 amino acid metallothionein-like protein. *Neuron* 1991; 7: 337-347.
- Palmiter R.D., Findley S.D., Whitmore T.E., Durnam D.M. MT-III, a brain-specific member of the metallothionein gene family. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 6333-6337.
- Quaife C.J., Findley S.D., Erickson J.C. et al. Induction of a new metallothionein isoform (MT-IV) occurs during differentiation of stratified squamous epithelia. *Biochemistry* 1994; 33: 7250-7259.
- Oh S.H., Deagen J.T., Whanger P.D., Weswig P.H. Biological function of metallothionein. V. Its induction in rats by various stresses. *Am J Physiol* 1978; 234: E282-E285.
- Durnam D.M., Hoffman J.S., Quaife C.J. et al. Induction of mouse metallothionein-I mRNA by bacterial endotoxin is independent of metals and glucocorticoid hormones. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984; 81: 1053-1056.
- Hidalgo J., Giralt M., Garvey J.S., Armario A. Physiological role of glucocorticoids on rat serum and liver metallothionein in basal and stress conditions. *Am J Physiol* 1988; 254: E71-E78.
- Hidalgo J., Borrás M., Garvey J.S., Armario A. Liver, brain, and heart metallothionein induction by stress. *J Neurochem* 1990; 55: 651-654.
- De S.K., McMaster M.T., Andrews G.K. Endotoxin induction of murine metallothionein gene expression. *J Biol Chem* 1990; 265: 15267-15274.
- Liu J., Liu Y.P., Sendelbach L.E., Klaassen C.D. Endotoxin induction of hepatic metallothionein is mediated through cytokines. *Toxicol Appl Pharmacol* 1991; 109: 235-240.
- Hidalgo J., Campmany L., Martí O., Armario A. Metallothionein-I induction by stress in specific brain areas. *Neurochem Res* 1991; 16: 1145-1148.
- Hidalgo J., Giralt M., Garvey J.S., Armario A. Effect of morphine administration on rat liver metallothionein and zinc metabolism. *J Pharmacol Exp Ther* 1991; 259: 274-278.
- Gasull T., Giralt M., Hernandez J., Martinez P., Bremner I., Hidalgo J. Regulation of metallothionein concentrations in rat brain: effect of glucocorticoids, zinc, copper, and endotoxin. *Am J Physiol* 1994; 266: E760-E767.
- Gasull T., Giralt M., Garcia A., Hidalgo J. Regulation of metallothionein-I+II levels in specific brain areas and liver in the rat: role of catecholamines. *Glia* 1994; 12: 135-143.
- Borghesi L.A., Lynes M.A. Stress proteins as agents of immunological change: some lessons from metallothionein. *Cell Stress Chaperons* 1996; 1: 99-108.
- Arbonés M.L., Austin H.A., Capon D.J., Greenburg G. Gene targeting in normal somatic cells: inactivation of the interferon- γ receptor in myoblasts. *Nature Genet* 1994; 6: 90-97.
- Belloso E., Hernandez J., Giralt M., Hidalgo J. Effect of stress on mouse and rat brain metallothionein I and III mRNA levels. *Neuroendocrinology* 1996; 64: 430-439.
- Gasull T., Rebollo D.V., Romero B., Hidalgo J. Development of a competitive double antibody radioimmunoassay for rat metallothionein. *J Immunoassay* 1993; 14: 209-225.
- Yuguchi T., Kohmura E., Yamada K. et al. Expression of growth inhibitory factor mRNA following cortical injury in rat. *J Neurotrauma* 1995; 12: 299-306.
- Andus T., Bauer J., Gerok W. Effects of cytokines on the liver. *Hepatology* 1991; 13: 364-375.
- Lemay L.G., Vander A.J., Kluger M. The effects of psychological stress on plasma interleukin-6 activity in rats. *Physiol Behav* 1990; 47: 957-961.
- Dobbin J.P., Harth M., McCain G.A., Martin R.A., Cousin K. Cytokine production and lymphocyte transformation during stress. *Brain Behav Immun* 1991; 5: 339-348.
- Zhou D., Kusnecov A.W., Shurin M.R., Depauli M., Rabin B.S. Exposure to physical and psychological stressors elevates plasma IL-6: relationship to the activation of hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Endocrinology* 1993; 133: 2523-2530.

370 J Hernández, J Carrasco, M L Arbonés, J Hidalgo

35. Bone R.C. The pathogenesis of sepsis. *Ann Intern Med* 1991; 115: 457-469.
36. Tilders F.J.H., Derijk R.H., Van Dam A.M., Vincent V.A.M., Schotanus K., Persoons J.H.A. Activation of the hypothalamus-pituitary-adrenal axis by bacterial endotoxins: routes and intermediate signals. *Psychoneuroendocrinology* 1994; 19: 209-232.
37. Coyle P., Philcox J.C., Rofe A.M. Corticosterone enhances the zinc and IL-6-mediated induction of metallothionein in cultured rat hepatocytes. *J Nutr* 1993; 123: 1464-1470.
38. Hernandez J., Giralt M., Belloso E., Rebollo D.V., Romero B., Hidalgo J. Interactions between metallothionein inducers in rat liver and primary cultures of rat hepatocytes. *Chem Biol Interact* 1996; 100: 27-40.
39. Hidalgo J., Gasull T., Giralt M., Armario A. Brain metallothionein in stress. *Biol Signals* 1994; 3: 198-210.
40. Hernández J., Molinero A., Campbell I.L., Hidalgo J. Transgenic expression of interleukin 6 in the central nervous system regulates brain metallothionein-I and -III expression in mice. *Mol Brain Res* 1997; 48: 125-131.
41. Krishnan R., Ellinwood E.H., Laszlo J., Hood L., Ritchie J. Effect of gamma interferon on the hypothalamic-pituitary-adrenal system. *Biol Psychiatry* 1987; 22: 1163-1166.
42. Yagle M.K., Palmiter R.D. Coordinate regulation of mouse metallothionein I and II genes by heavy metals and glucocorticoids. *Mol Cell Biol* 1985; 5: 291-294.
43. Masters B.A., Quaipe C.J., Erickson J.C. et al. Metallothionein III is expressed in neurons that sequester zinc in synaptic vesicles. *J Neurosci* 1994; 14: 5844-5857.
44. Hidalgo J., Castellano B., Campbell I.L. Regulation of brain metallothioneins. *Curr Topics Neurochem* 1997; 1: 1-26.