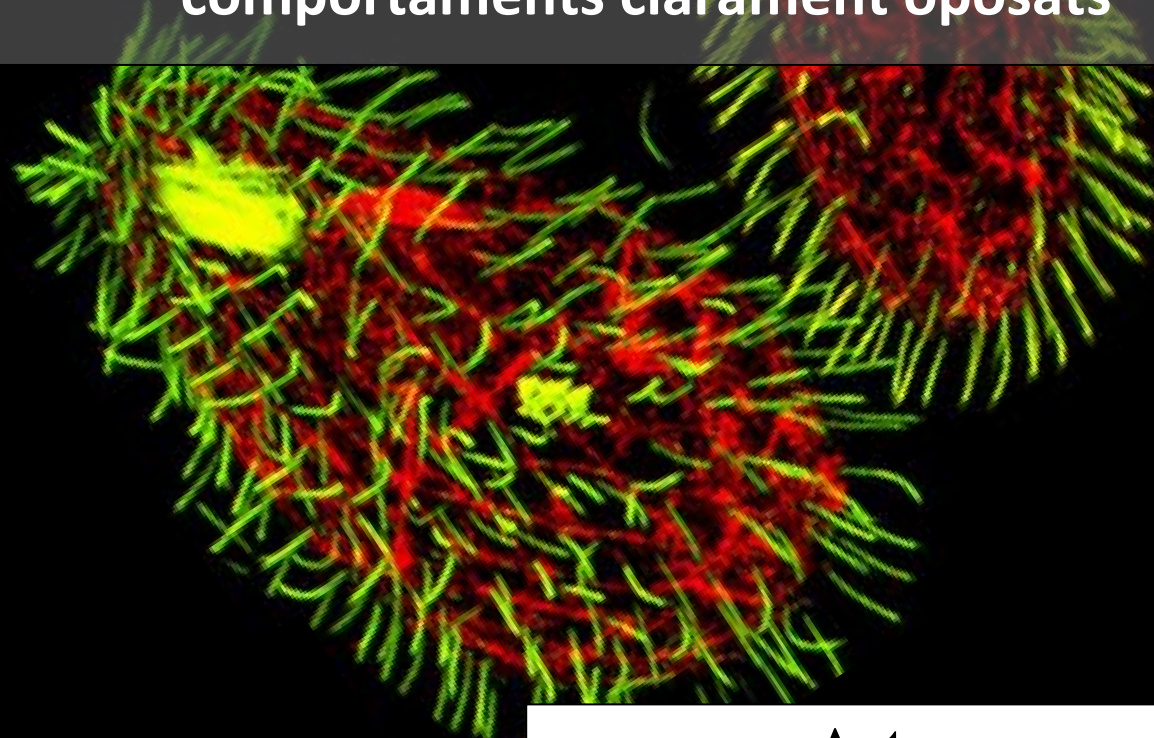


UAB

Universitat Autònoma
de Barcelona

**Màster Universitari Ciència i Tecnologia Químiques
Mòdul d'Iniciació a la recerca**

**Preferències metàl·liques de les
metal·lotioneïnes de *Tetrahymena
thermophila*: cinc isoformes i dos
comportaments clarament oposats**



Autor:
Maribel Marín García

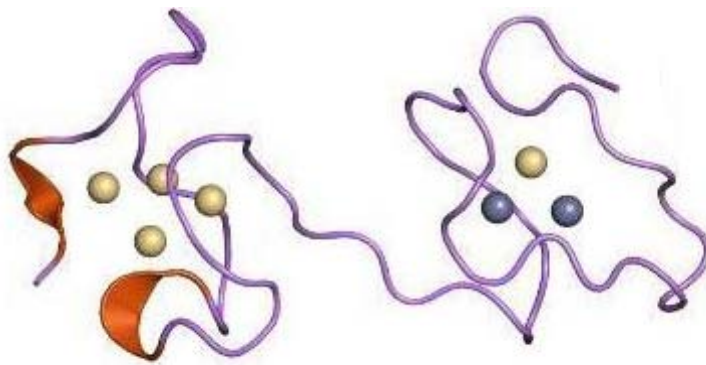
Directors:
Dra. Mercè Capdevila Vidal
Dr. Òscar Palacios Bonilla

Departament de Química. Facultat de Ciències

Bellaterra, Setembre 2012

“Preferències metàl·liques de les metal·lotioneïnes de *Tetrahymena thermophila*: cinc isoformes i dos comportaments clarament oposats”

Maribel Marín García



Setembre, 2012

Universitat Autònoma de Barcelona

Memòria presentada per superar el mòdul d'Iniciació a la Recerca i treball fi de màster corresponent al Màster Universitari Ciència i Tecnologia Químiques.

Maribel Marín García.

Vist i plau,

Dra. Mercè Capdevila Vidal.

Dr. Òscar Palacios Bonilla.

Bellaterra, a 3 de setembre de 2012.

RESUM

Les metal·lotioneïnes (MTs) constitueixen una superfamília de proteïnes amb unes característiques molt peculiars. Presenten un baix pes molecular (3-10 kDa) i un elevat contingut en residus de cisteïna (aproximadament el 30 % del total dels seus aminoàcids), les quals els confereixen la propietat d'enllaçar metalls pesants, via enllaços metall-tiolat per donar clústers metàl·lics de major o menor grandària. Es troben presents en la pràctica totalitat d'organismes, i en molts casos presenten diferents isoformes, fet que ha despertat un gran interès per les seves possibles funcions, les quals avui dia són encara motiu de debat.

La presència de diferents isoformes de MTs dins un mateix organisme fa pensar que és possible que cadascuna d'elles presentin funcions diferents. Un cas paradigmàtic, que pot aportar molta informació en aquest àmbit són les MTs del protozou ciliat *Tetrahymena thermophila*, amb cinc isoformes que es mostren com un sistema ideal per estudiar els determinants d'especificitat metàl·lica de les MTs, ja que es tracta de pèptids molt semblants amb preferències metàl·liques clarament oposades.

Adicionalment, les MTs de *T. thermophila* presenten unes característiques úniques en comparació amb les d'altres organismes, com ara: un elevat pes molecular i una llargada inusual; una gran quantitat de residus cisteïnics que els permeten coordinar un nombre més elevat d'ions metàl·lics; i la presència d'agrupaments de residus de cisteïna no gaire corrents, principalment grups XCCCX, els quals semblen jugar un paper important en la determinació de la preferència metàl·lica de la proteïna.

L'estudi de les propietats coordinants de les cinc isoformes de MT de *Tetrahymena thermophila*, obtingudes de forma recombinant en medis enriquits tant amb metalls divalents (Zn i Cd) com monovalents (Cu), objecte d'aquest treball, servirà per aprofundir en la relació estructura/funció d'aquestes metal·lotioneïnes, i a la vegada, possibilitarà classificar-les segons el seu caràcter de Zn/Cd- o Cu-tioneïnes.

AGRAÏMENTS

Aprofito unes breus línies per tal de manifestar el meu sincer agraïment a totes aquelles persones que, durant el temps que he dedicat a la realització d'aquest treball, han col·laborat o m'han ofert el seu suport.

Agraïxo en primer lloc als directors d'aquest treball. A la Dra. Mercè Capdevila per donar-me l'oportunitat d'aproximar-me al món de la recerca acollint-me en el seu grup i endinsar-me dins el món de les metal·lotioneïnes, pel seu recolzament i pels seus bons consells. Al Dr. Òscar Palacios vull mostrar-li la meva gratitud per les nombroses indicacions i suggeriments, per ajudar-me tant durant aquests mesos, però sobretot, per l'interès mostrat en tot moment.

Gràcies també a la Dra. Sílvia Atrian i als membres del seu grup d'investigació del Departament de Genètica de la Universitat de Barcelona, responsables de la síntesi de les proteïnes objecte d'aquest treball.

Un agraïment especial a tots els companys del grup: Sílvia, Kata, Katia, Jordi, Joan i Mireia, amb qui he compartit moltes hores de laboratori, dinars, cafès, etc., per la seva amistat i per ajudar-me en tot allò que he necessitat.

I finalment, a nivell més personal, vull fer arribar el meu agraïment a la meva família i amics. En concret, a la meva mare i la meva germana, per escoltar-me i recolzar-me sempre; al meu germà, perquè el seu record m'impulsa a llevar-me cada dia i viure com si fos l'últim; a la Sònia i la María, per ajudar-me a evadir-me en certs moments; i especialment, al Jaume i al petit Biel (als que dedico aquest treball) perquè sempre els sento a prop i per estimar-me tant.

“La consciència de la ignorància és el principi del dubte, el que condueix a la saviesa.”

Catherine Clément

ABREUJAMENTS

aa: Aminoàcid

Cys: Cisteïna

DC: Dicroisme circular

ESI-TOF MS: Espectroscòpia de masses amb ionització per electroesprai i analitzador de temps de vol.

ICP-AES: Espectroscòpia d'emissió atòmica de plasma acoblat per inducció

M: Metall

MT/MTs: Metal·lotioneïna/ Metal·lotioneïnes.

MTT1, MTT2, MTT3, MTT4 i MTT5: Isoformes de MT de *Tetrahymena thermophila*.

SCys: Sofre cisteínic.

UV-VIS: Espectres d'absorció UV-visible

ÍNDEX

1.- INTRODUCCIÓ	1
1.1.- Metal·lotioneïnes	1
1.1.1.-Característiques generals	1
1.1.2.- Classificació.....	1
1.1.3.- Funcions i reactivitat.....	3
1.1.4.- Característiques estructurals.	4
1.2.- MTs en protozous ciliats.	7
1.2.1.MTs de <i>Tetrahymena thermophila</i>	8
2.- OBJECTIUS.	10
3.- RESULTATS.....	11
3.1.- Caracterització de MTT1	11
3.1.1.- Tractament àcid de les preparacions Zn-MTT1 i Cd-MTT1	13
3.2.- Caracterització de MTT2.....	15
3.3.- Caracterització de MTT3.....	16
3.4.- Caracterització de MTT4.....	17
3.5.- Caracterització de MTT5.....	19
4.- DISCUSSIÓ.....	22
5.- CONCLUSIONS	24
6.- PART EXPERIMENTAL I TÈCNIQUES UTILITZADES	25
6.1.- Obtenció i caracterització de les proteïnes	25
6.2. Espectroscòpia d'emissió atòmica amb plasma acoblat per inducció (ICP-AES).26	
6.3.- Espectrometria de masses, ESI-TOF MS	27
6.4.- Espectroscòpies DC i UV-visible.....	27
6.5.- Aparells utilitzats.....	28
7.- BIBLIOGRAFIA	29

1.- INTRODUCCIÓ

1.1.- Metal·lotioneïnes

L'estudi de les metal·lotioneïnes (MTs) es va iniciar fa més de 50 anys, quan Margoshes i Vallee aïllaren i identificaren, al 1957, una proteïna associada a cadmi i zinc en còrtex renal equí [1]. Aquesta proteïna va ser anomenada “metal·lotioneïna” pel seu alt contingut en metalls i sofre de residus cisteïnics. D'ençà d'aquell primer descobriment, les MTs han estat descrites en una gran varietat d'organismes, i el nombre de treballs dedicats a aquestes inusuals proteïnes ha anat creixent exponencialment [2,3].

1.1.1.- Característiques generals

Les metal·lotioneïnes són unes proteïnes de baix pes molecular (3-10 kDa) amb unes propietats excepcionals, que radiquen bàsicament en la seva capacitat per a coordinar ions metàl·lics, preferentment amb configuració d^{10} . Presenten un alt contingut en residus cisteïnics (aproximadament el 30% dels seus aminoàcids), els quals, són els responsables de l'elevada capacitat d'aquestes proteïnes per a coordinar metalls pesants. Quan són aïllades d'organismes, les MTs es poden trobar enllaçant tant a metalls essencials (Zn(II) i Cu(I)), com tòxics (Cd(II), Hg(II), Ag(I) i Pb(II)). Ara bé, *in vitro* el nombre de metalls que poden enllaçar augmenta, i han estat descrites MTs coordinades a Zn(II), Cd(II), Hg(II), Fe(II), Co(II), Ni(II), Pt(II), Pb(II), Cu(I), Ag(I), Au(I), Bi(III), Tc(IV) i Po [4].

Aquesta gran família de metal·loproteïnes presenten, a més, unes característiques comunes, com ara: gran estabilitat tèrmica i termodinàmica, combinada amb elevada labilitat cinètica; baix índex de residus hidrofòbics, histidina i arginina, i absència o escassetat, en la majoria de MTs, de residus aromàtics [4]; estructures 3D definides per la presència d'ions metàl·lics (altrament, com a apoproteïnes, no mostren cap tipus d'estructura secundària, *random coil*), i el fet de contenir “clústers” metall-tiolat, que els hi proporcionen unes propietats espectroscòpiques típiques dels enllaços M-Cys [5].

1.1.2.- Classificació

La gran diversitat d'estructures primàries dins d'aquesta gran família de metal·loproteïnes portà a la necessitat de classificar-les. La primera proposta de classificació va sorgir d'un Comitè Internacional de Nomenclatura establert a la Segona Conferència Internacional de Metal·lotioneïnes, al 1985 [6], en el que es va decidir separar totes les MTs

1.- Introducció

conegudes fins al moment, no més de 25, en tres grans grups [7,8], tenint en compte la seva similitud a la isoforma MT1/MT2 de mamífer:

Classe I: MTs que presenten una elevada homologia de seqüència amb les isoformes MT1 i MT2 de mamífer, i amb una distribució de residus cisteínics similar a la MT equina descoberta al 1957. Contenen uns 60 aa, dels que aproximadament un terç són Cys; en general, no presenten aa aromàtics i es troben estructurades, totes elles, en dos dominis independents quan enllacen metalls divalents. S'engloben dins aquest grup la majoria de MTs aïllades de vertebrats i d'alguns invertebrats, com ara, mol·luscs i crustacis.

Classe II: MTs amb una estructura primària llunyana a la de les MTs de mamífer i amb una gran heterogeneïtat de seqüència entre elles, amb els residus cisteínics no alineables ni entre sí, ni amb la MT de cavall. Tenen mides i continguts de cisteïnes variables i poden presentar aa aromàtics en petites proporcions, la majoria es constitueixen en un únic domini. Formen part d'aquesta classe les MTs d'insectes, nematodes, ciliats, fongs, plantes i cianobacteris [9].

Classe III: Aquest grup compren un conjunt de polipèptids que reben el nom de cadistines i fitoquelatines, són sintetitzats de forma enzimàtica i tenen com a fórmula general $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{Gly}$. Es troben, habitualment, en plantes, algues i alguns fongs.

A mida que el coneixement de les MTs avançava i s'anaven descobrint noves MTs, aquesta primera classificació va començar a ser insuficient i inadequada, de manera que a l'any 1997 sorgeix una nova proposta de classificació molt més detallada, on Binz i Kägi [10] distribueixen les MTs en funció de les relacions filogenètiques i les semblances seqüencials, dividint-les en famílies, subfamílies, subgrups, isoformes i subisoformes [11].

En qualsevol cas, cap de les classificacions esmentades proporciona informació funcional o evolutiva, simplement es basen en similituds de seqüència. Per aquest motiu, fa aproximadament deu anys, el grup de recerca on s'ha desenvolupat aquest treball, va proposar un nou criteri de classificació [12] basat en el comportament de les MTs en enllaçar metalls essencials (Zn i Cu) quan s'obté la proteïna de forma recombinant. La idea de classificar les MTs d'acord amb les seves preferències metàl·liques recau en el fet que són els ions metàl·lics coordinats a les MTs els que determinen la seva estructura, i donat que Zn(II) i Cu(I) tenen propietats coordinants diferents, és lògic pensar que donin lloc a agregats metall-MT diferents. Aleshores, tenint en compte la relació estructura/funció, cal

esperar funcions diferents per a diferents estructures. Aquesta classificació inicialment distingia entre dues famílies de MTs [13]:

-Zn-tioneïnes: MTs que, sintetitzades *in vivo* en medis rics en Zn(II), donen lloc a preparacions que contenen una única espècie homometàl·lica de Zn, però en medis rics en Cu(II), s'obtenen com a mescles d'agregats metàl·lics que són heterometàl·lics, contenint alhora zinc i coure.

-Cu-tioneïnes: MTs que, sintetitzades *in vivo* en medis rics en Cu(II), donen lloc a espècies úniques homometàl·liques de Cu i que no requereixen Zn per assolir un alt grau d'estructuració. Aquestes, donen lloc a mescles quan s'obtenen en medis rics en Zn(II) i en ser biosintetitzades en medis rics en Cd(II), habitualment donen lloc a complexos que contenen lligands sulfur addicionals [14-16].

Posteriorment, i amb l'ampliació de la diversitat de MTs estudiades, es proposà una gradació des del caràcter genuí de Zn-tioneïna fins a un caràcter extrem de Cu-tioneïna, passant per MTs de caràcter intermedi que coordinen Zn o Cu amb la mateixa efectivitat i podrien desenvolupar tant les funcions de les Zn- com les de les Cu-tioneïnes [13, 17].

1.1.3.- Funcions i reactivitat

Funcions molt diverses han estat atribuïdes a les MTs. Tot i així, avui dia, havent passat més de mig segle d'ençà del seu descobriment, aquest tema encara és motiu de debat entre la comunitat científica que les estudia [5, 18, 19]. Les MTs estan implicades en una gran quantitat de processos biològics, variant d'un tipus d'organisme a un altre, així com entre les diferents isoformes d'un mateix organisme. Per aquest motiu, sembla obvi acceptar que no té cap sentit intentar trobar una única funció per a aquesta gran família de proteïnes.

En relació a la peculiar composició d'aquestes proteïnes, bàsicament a l'elevat contingut en cisteïnes, és poden assignar sense cap mena de dubte, dues funcions moleculars, com són la capacitat de coordinació metàl·lica i l'activitat redox. El problema arriba a l'hora d'establir les funcions biològiques o fisiològiques de les MTs, donat que aquestes semblen estar involucrades en una gran quantitat de processos, els quals depenen de les necessitats de cada tipus d'organisme. De fet, la seva complexitat funcional és tan gran, que fins i tot s'ha arribat a proposar funcions totalment independents per cadascun dels dominis d'una mateixa MT [20].

D'aquesta manera, les principals funcions proposades per les MTs han estat:

1.- Introducció

- Homeòstasi metàl·lica: mantenir els metalls essencials, zinc i coure, dins els nivells de concentració requerits per l'organisme.
- Destoxicació de metalls pesants tòxics, com ara Cd, Hg, Pb.
- Protecció enfront condicions d'estrès oxidatiu. Sembla ser que aquest paper de defensa ve donat per la capacitat dels grups tiolat de les cisteïnes per oxidar-se fàcilment i de manera reversible, en presència d'agents oxidants suaus com els radicals generats en situació d'estrès, formant ponts disulfur.

1.1.4.- Característiques estructurals.

És àmpliament conegut que l'estructura tridimensional de les MTs ve determinada per la coordinació als diferents ions metàl·lics que enllacen, via enllaços metall-SCys. En la seva forma demetal·lada, coneguda també com apo-metal·lotioneïna (apo-MT), presenten una estructura desordenada (*random coil*) sense cap mena de motius estructurals propis de les proteïnes convencionals (plegaments α o β). Ara bé, en presència de metalls, i gràcies a la flexibilitat de la cadena polipeptídica, els àtoms de sofre cisteïnics es disposen al voltant dels ions metàl·lics de tal manera que satisfan la geometria de coordinació específica de cada metall enllaçat (Zn^{2+} i Cd^{2+} únicament presentarien coordinació tetraèdrica, mentre que els entorns de coordinació del Cu^+ poden ser diversos), sense tensions excessives i determinant, alhora, el plegament de la proteïna i una ordenació pròpia que pot donar lloc a estructures monodominials (un sol domini) o bidominials (dos dominis més o menys independents). Es dona per suposat que l'ordre d'afinitat dels metalls pels tiolats cisteïnics de les MTs és el mateix que el generalment establert per als tiolats inorgànics: $Hg(II) > Ag(I) \sim Cu(I) > Cd(II) > Zn(II)$ [21].

Fins al moment, no són gaires les estructures de MT que s'han pogut determinar. Tot i que és possible determinar les distàncies d'enllaç M-SCys, les geometries de coordinació metàl·liques i la geometria global de les proteïnes mitjançant espectroscòpia de RMN i difracció de raig X, aquestes tècniques tenen certes limitacions: la dificultat d'obtenir mostres cristal·lines per analitzar-les amb difracció de raig X; els impediments en la determinació estructural per RMN degut a la flexibilitat de les cadenes polipeptídiques i la fluctuació dinàmica dels ions metàl·lics [22]. A més a més, els metalls fisiològicament enllaçats a les MTs (Zn i Cu) no tenen cap isòtop actiu en RMN, fet que no permet determinar les connectivitats M-SCys. Tot i així, les tècniques d'RMN amb ^{111}Cd , ^{113}Cd i/o 1H i de difracció de raig X han permès disposar d'informació molt precisa sobre l'estructura tridimensional de diverses MTs. Per exemple, en el cas de les MTs de mamífer (amb uns 60

aa que formen agregats M_7 -MT (M =Cd, Zn) en presència de zinc o cadmi) s'ha trobat que l'ordenació de les cadenes polipeptídiques té lloc en dos dominis globulars de quiralitat oposada, de mida similar i no interactius, amb els residus hidrofílics exclosos de l'interior de la molècula. El domini N-terminal, també anomenat domini β , consta de tres ions divalents enllaçats tetraèdricament a nou tiolats cisteínics, $M^{\text{II}}_3(\text{SCys})_9$, i el domini C-terminal, també anomenat domini α , està format per un clúster que conté quatre ions divalents igualment units de forma tetraèdrica a onze tiolats cisteínics, $M^{\text{II}}_4(\text{SCys})_{11}$ (**Figura 1**).

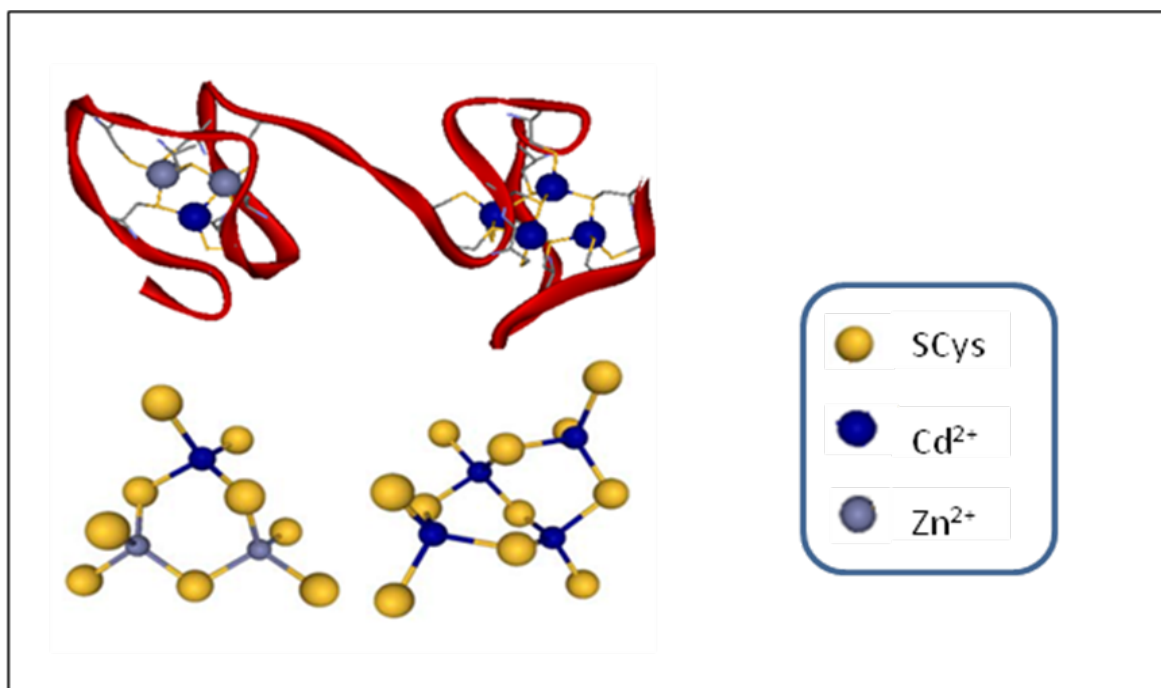


Figura 1: Estructura tridimensional de Zn_2Cd_5 -MT2 de mamífer (rata), resolta per difracció de raigs X i els seus dominis β i α , formats pels agregats Cd_1Zn_2 -(SCys)₉ i Cd_4 -(SCys)₁₁, respectivament.

En humans es coneixen quatre isoformes de MT: MT1 i MT2, presents en la majoria de teixits; MT3, que s'expressa bàsicament al sistema nerviós central; i MT4, que es troba únicament en l'epiteli estratificat escamós diferenciat (pell, llengua, esòfag) i durant el desenvolupament embrionari. Es suposa, degut a la elevada homologia seqüencial, que totes quatre isoformes tenen plegaments similars, estructurades de forma bidominal, i normalment formen agregats M_7 -MT en presència d'ions divalents, mentre que en presència d'ions monovalents formen agregats d'estequiometria metall-MT superior i consegüentment nombres de coordinació inferior. Estructures detallades dels dominis α i β de Cd_7 -MT2 i del domini α de Cd_7 -MT3 d'humans (**Figura 2**) han estat deduïdes recentment [23] a partir de La Teoria del Funcional de Densitat (DFT).

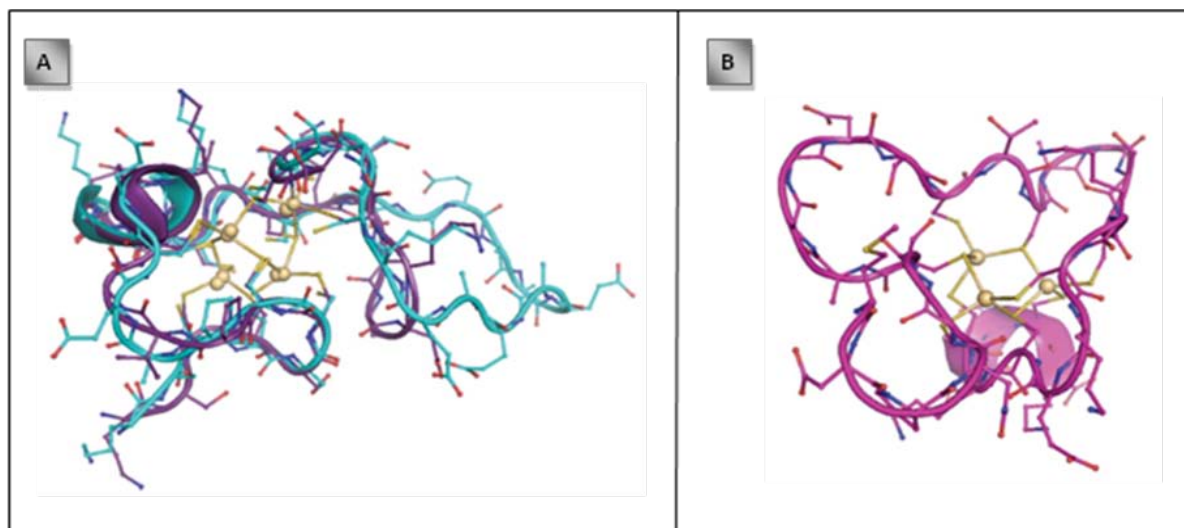


Figura 2: A) Superposició de Cd₄-MT2α (violeta) i Cd₄-MT3α (blau) d'humans. B) Cd₃-MT2β (violeta). Figures creades amb Pymol [23,24]

La gran majoria d'estructures tridimensionals resoltes de MTs amb metalls divalents (Zn(II) i Cd(II)) presenten plegaments bidominials, bàsicament pel fet d'estar relacionades amb les MTs de mamífer. L'any 2001, però, es va descriure, per primera vegada, una MT de cianobacteri formada per un únic clúster similar al domini α de les MTs de mamífer, però on dues de les onze cisteïnes eren substituïdes per histidines, formant un clúster $M^{II}_4(SCys_9NHIS_2)$. Un tret curiós d'aquesta MT és que un dels Zn(II) que es troben enllaçats tetraèdicament a quatre residus de cisteïna, és inert front a la substitució per ions Cd(II) [25].

D'altra banda, quan les MTs coordinen ions metàl·lics monovalents (bàsicament Cu(I)), ho fan a través de dos o tres lligands cisteïnics, adoptant geometria lineal o trigonal-plana. Tot i que la informació estructural dels complexos metàl·lics que formen les MTs amb Cu(I) és escassa, s'ha aconseguit resoldre l'estructura de la isoforma Cup1 del llevat *Saccharomyces cerevisiae*, tant per difracció de raig X com per RMN, i la MT del fong *Neurospora crassa* (NcMT). Totes dues contenen un únic clúster metàl·lic: Cu₈-Cup1 i Cu₆-NcMT, respectivament.

Una alternativa a les tècniques esmentades anteriorment per a la determinació estructural de MTs són les espectroscòpies d'absorció UV-visible, dicroisme circular, dicroisme circular magnètic i d'emissió, que permeten observar certes característiques estructurals i dels enllaços metall-MT. Les espectroscòpies d'absorció UV-visible i de dicroisme circular són utilitzades habitualment en el grup on s'ha desenvolupat aquest treball per tal d'establir les característiques coordinants d'un gran nombre de MTs.

1.2.- MTs en protozous ciliats.

Els protozous ciliats són microorganismes eucariòtics amb una distribució cosmopolita, adaptats a viure tant en ecosistemes terrestres com aquàtics. El fet que aquest tipus d'organismes no presentin paret cel·lular en la seva etapa vegetativa els hi confereix una gran sensibilitat als contaminants mediambientals i una resposta cel·lular ràpida. Entre els diferents mecanismes de resistència a metalls pesants, la “bioacumulació metàl·lica” és el mecanisme més emprat per ciliats [26]. Aquest procés implica el segrest intracel·lular dels metalls per part de diverses molècules, com les MTs, formant complexos metàl·lics, els quals seran acumulats en vacuoles i finalment alliberats de la cèl·lula com a complexos metàl·lics no tòxics. No obstant, tot i que aquest mecanisme de defensa ha estat detectat en ciliats molt diversos, la presència de MTs només ha estat documentada en dos gèneres (*Tetrahymena* i *Paramecium sp.*).

Família 7	Espècie	Seqüència cDna a GenBank
Subfamília 7a CdMTs	<i>T. pyriformis</i>	<i>TpyrMT-1</i> (AJ005080) <i>TpyrMT-2</i> (AY765220)
	<i>T. thermophila</i>	<i>TtheMTT1</i> (DQ517937/EF195745/AY061892) <i>TtheMTT3</i> (EF195744) <i>TtheMTT5</i> (DQ517936)
	<i>T. tropicalis</i>	<i>TtroMTT1</i> (EF185997)
	<i>T. rostrata</i>	<i>TrosMTT1</i> (EU627174)
	<i>T. pigmentosa</i>	<i>TpigMT-1</i> (EU420056)
	<i>T. vorax</i>	<i>TvorMT1</i> (HQ166889)
	<i>T. mobilis</i>	<i>TmobMT1</i> (HQ166888)
	<i>T. hegewischi</i>	<i>ThegMT1</i> (HQ166890) <i>ThegMT2</i> (HQ166891)
Subfamília 7b CuMTs	<i>T. thermophila</i>	<i>TtheMTT2</i> (AY204351) <i>TtheMTT4</i> (AY660008)
	<i>T. pigmentosa</i>	<i>TpigMT-2</i> (AF479586)
	<i>T. rostrata</i>	<i>TrosMTT2</i> (EU627175)

Taula 1. Seqüències presentades a GenBank dels gens codificants de MTs a les espècies de *Tetrahymena*, i que conformen la família 7 segons la classificació de Binz i Kägi [26].

Tenint en compte la classificació de Binz i Kägi [10], les MTs de ciliats formen part de la família 7, la qual es divideix en dos subfamílies: subfamília 7a, també descrites com CdMTs; i subfamília 7b, o CuMTs [27]. Aquestes subfamílies difereixen en els patrons d'inducció metàl·lica (Cd/Zn o Cu) i d'agrupament de cisteïnes [28- 33]. Les seqüències de MTs de ciliats descrites i estudiades corresponen exclusivament a les distintes espècies del gènere *Tetrahymena* (**Taula 1**), encara que és molt probable que estiguin igualment presents en altres ciliats. En el cas de *Paramecium sp.*, tot i que el gen codificant d'una hipotètica MT

ha estat identificat en el seu genoma macronuclear, no s'ha analitzat encara la seva expressió en resposta a estrès per metalls.

Les MTs *Tetrahymena* presenten unes característiques úniques en comparació amb les d'altres organismes. Entre aquestes, les més importants són: un elevat pes molecular i una llargada inusual; presència d'agrupaments de cisteïnes no gaire corrents, principalment grups CCC; i un nombre considerable de residus cisteïnics que els hi permeten coordinar un nombre més elevat d'ions metàl·lics, en comparació amb d'altres MTs.

Així doncs, tot i l'heterogeneïtat dins aquesta família, l'estudi dels patrons d'inducció gènica de les MTs a les diverses espècies de *Tetrahymena* permet dividir-les en dos tipus: MTs induïdes per cadmi i MTs induïdes per coure. Aquesta divisió sembla concordar amb la classificació funcional proposada per aquest grup de recerca [12]. Estudis realitzats amb *Tetrahymena pyriformis* posen de manifest aquest fet [34].

1.2.1.MTs de *Tetrahymena thermophila*

Entre l'elevat grau de polimorfisme que mostren les MTs a les diferents espècies de *Tetrahymena*, *T. thermophila* arriba com el paradigma del gènere, amb cinc isoformes que es mostren com un sistema ideal per estudiar els determinants d'especificitat metàl·lica de les MTs, ja que són pèptids molt semblants amb preferències metàl·liques clarament oposades.

Les cinc isoformes de MT de *T. thermophila* sovint es troben classificades en dos grups, els quals mostren poca identitat de seqüència l'un amb l'altre. Un grup el conformen aquelles MTs que són més eficientment induïdes per cadmi (MTT1, MTT3 i MTT5), i l'altre, aquelles MTs que responen millor a patrons d'inducció amb coure (MTT2 i MTT4) [28-33] (**Taula 1**). Ara bé, fins al moment, les propietats coordinants metàl·liques de les distintes isoformes de MTs a *Tetrahymena* encara no han estat determinades.

L'any 2002 es va aïllar el gen que codifica la isoforma MTT1 [33], un any més tard s'aïllà l'ADNc de MTT3, ambdues seqüències d'aminoàcids presentant un 79,6 % d'identitat, i posteriorment, es va identificar el gen que codifica MTT5 [27]. Paral·lelament, els gens que codifiquen MTT2 i MTT4, van ser també identificats, observant-se un 98% d'identitat a nivell de seqüència d'aa (**Taula 2**).

Els residus cisteïnics, com ja ha estat comentat anteriorment, són l'element principal a la composició de les MTs. Tot i que el percentatge de cisteïnes a *T. thermophila* és el mateix que a les MTs de vertebrats, el nombre total de cisteïnes és molt més elevat, fet que els hi atribueix una capacitat per coordinar un major nombre d'ions metàl·lics per molècula de MT. Els residus cisteïnics en algunes de les isoformes es troben agrupats en diferents motius: XCCX, XCXCX, i XXCXX (on X és un aa diferent de Cys), essent aquests habituals a les

MTs; però també hi ha altres tipus d'agrupacions, presents a MTT1, MTT3, i MTT5, com ara: CCC, CXCC i CXCXC [26]. En canvi, a les isoformes MTT2 i MTT4 les cisteïnes es troben agrupades principalment en grups XCXCX.

A Isoforma	Seqüència d'aa
MTT1 (162 aa,48 Cys)	GSMDKVNS CCCGVNAKPCC TDPN SGCCCV SKTDN CCK SDTKE CCT GTGEG CKCVN CKCCK PQAN CCCGVNAKPCC FDPN SGCCCV SKTNN CCK SDTKE CCT GTGEG CKCT SCQCC KPVQ QGCCG DKAKA CC TDPN SGCCCS NKANK CC DATSKQE CQTCQCC K
MTT2 (108 aa,32 Cys)	GSMDTQTQTKVT VGCS NP CKC QPL CKCG TAA CNC QPC ENCD PC SCNP CK CG V TES CG NP CKCAE CK CG SHTEKT SACK NP CA NP CNCG STS NCK NP CKCAE CK CK
MTT3 (162 aa,42 Cys)	GSMEKINN SCCG ENTKI CC TDLNR QCNC AC KT DN CCK PETNE CCT DTLEG CKCVDC KCK SHV TCH GVNVK SSCL DPNS GYQC ASKTDN CCK SDTKE CCT GTQEG CKCTN CQCY KQA QGCCG DKAKA CC TDPN SGCCCS NKANK CC DATSKKE CQVCQCC K
MTT4 (108 aa,32 Cys)	GSMDTQTQTKVT VGCS NP CKC QPL CKCG TAA CNC QPC ENCD PC SCNP CK CG V TES SCG NP CKCAE CK CG SHTEKT SACK NP CA NP CKCG STS NCK NP CKCAE CK CK
MTT5 (99 aa,24 Cys)	GSMDKISGESTKI CSK TEEK WCCC PSETQ NCC NSDD KQCC VGS EGCI Y VCKCCK KV QA E CKCG PN AKYCC IDPNT GNCC V CKTKF CSKSD SKECC PG GSC

B			
Tthe_MTT1	MDIVNS--CCCGVNAKPCC	TDPN SGCC -----VSKT-DN CCK SDTKE CCT GTGEG CK	50
Tthe_MTT3	MEKINN--SCCGENTKI CC TDLNR QCNC -----ACKT-DN CCK PETNE CCT DTLEG CK		50
Tthe_MTT5	MDKIS-----GESTKI CSK TEEK WCCC -----PSET-ON CC NSDD KQCC VGS EGCI		46
Tthe_MTT2	MDT-----QTQT--KVT VGCS NP CKC -----QPL CKCG TAA CN		33
Tthe_MTT4	MDT-----QTQT--KVT VGCS NP CKC -----QPL CKCG TAA CN		33
Tthe_MTT1	CV N CKCCK KP-QAN CCCG VNA KPCC FDPN SGCC ----- CV SK TDN - NCK SDTKE CCT GT		101
Tthe_MTT3	CV DK CKCK S-HVT CCH GVNVK SSCL DPNS GYQ ----- C ASK TDN - NCK SDTKE CCT GT		101
Tthe_MTT5	Y VCKCCK -----		54
Tthe_MTT2	CQ PC ENCD P----- CS NP CKC -- G V TESCG NP CKC ----- A E CKCG SH T E----- K		74
Tthe_MTT4	CQ PC ENCD P----- CS NP CKC -- G V TESCG NP CKC ----- A E CKCG SH T E----- K		74
Tthe_MTT1	GE GCKCT SC QCC KPV QGCCG DKAK ACC TDPN SGCC SN KANKCC DATSKQE CQTCQCC K		162
Tthe_MTT3	QE GCKCT NC QCY KQA QGCCG DKAK ACC TDPN SGCC SN KANKCC DATSKKE CQVCQCC K		162
Tthe_MTT5	-----V QAE CK CG PN AKYCC IDPNT GNCC V CKTKF CSKSD SKECC PG GSC		99
Tthe_MTT2	TS A CKCN PC AC ----- NPC NC CG STS NCK NP CKCAE CK CK		108
Tthe_MTT4	TS A CKCN PC AC ----- NPC NC CG STS NCK NP CKCAE CK CK		108

Taula 2. A) Seqüències d'aa de les cinc isoformes recombinants de *Tetrahymena thermophila* estudiades en aquest treball, amb les cisteïnes marcades en vermell. Els dos primers residus (en cursiva) s'afegeixen a la proteïna degut al sistema d'expressió emprat. B) Alineament de les seqüències anteriors.

En aquest treball es pretenen caracteritzar els agregats metàl·lics generats *in vivo* per aquestes cinc isoformes de *Tetrahymena thermophila*, per tal de poder establir una classificació funcional d'aquestes MTs. La producció de les proteïnes emprades (MTT1, MTT2, MTT3, MTT4 i MTT5) ha estat possible gràcies a la col·laboració amb el grup de recerca que dirigeix la Dra. Sílvia Atrian, del Departament de Genètica Molecular, de la Universitat de Barcelona, i han estat obtingudes mitjançant procediments d'enginyeria genètica, que permeten obtenir proteïnes amb elevada puresa (superior al 95%) i concentracions prou elevades per permetre la seva caracterització (~ 10⁻⁴ M). Aquestes tècniques permeten, a més, produir en un entorn cel·lular, en aquest cas en *E. coli*, que anomenarem produccions *in vivo*, els agregats de les MTs amb el metall d'interès [35,36].

2.- OBJECTIUS.

L'objectiu principal d'aquest treball de recerca és estudiar les propietats coordinants de les cinc isoformes de MT presents al protozou ciliat *Tetrahymena thermophila*, obtingudes de forma recombinant en medis enriquits tant amb metalls divalents (Zn i Cd) com monovalents (Cu), per tal d'aprofundir en la relació estructura/funció d'aquestes metal·lotioneïnes i poder-les classificar pel seu caràcter de Zn- o Cu-tioneïnes.

La caracterització de cadascuna de les produccions recombinants es durà a terme mitjançant la utilització de tècniques espectroscòpiques (DC, UV-Vis, ICP-AES) i d'espectrometria de masses (ESI-TOF MS).

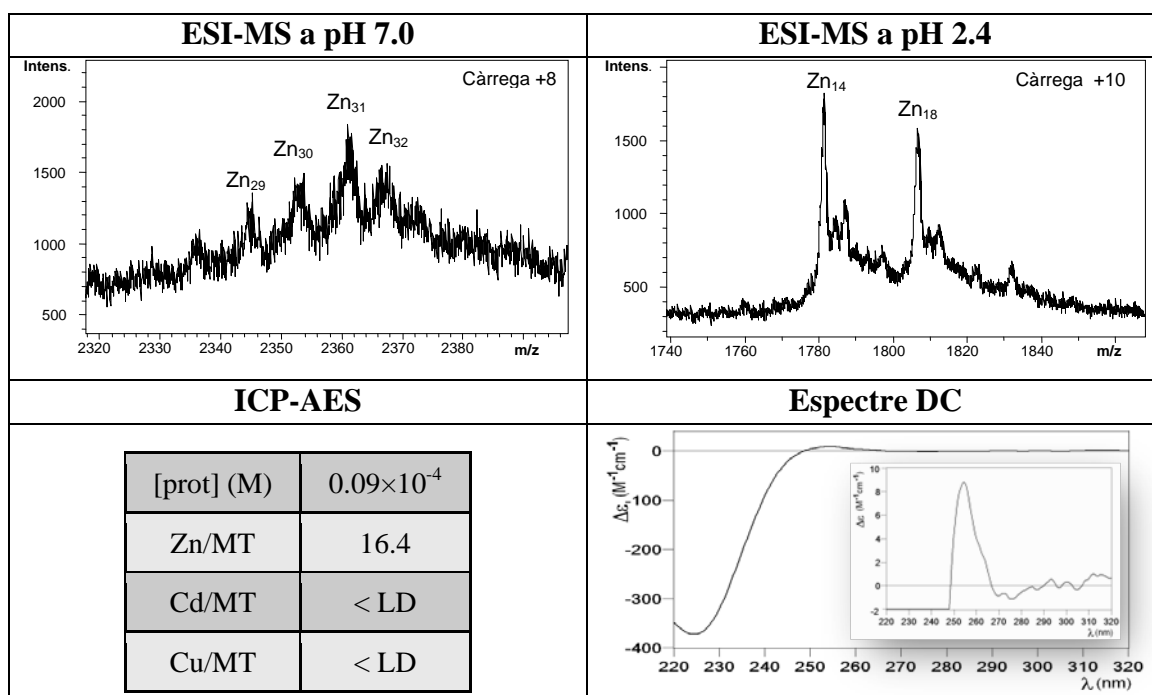
3.- RESULTATS.

En aquesta secció es presenten els resultats obtinguts en la caracterització dels agregats metall-MT de les cinc isoformes de MT presents a *Tetrahymena thermophila*, generats *in vivo* en medis rics en Zn(II), Cd(II) i Cu(II).

Per tal de dur a terme la caracterització de les diferents preparacions metall-MT obtingudes s'han emprat diverses tècniques analítiques: ICP-AES, espectroscòpies de DC i UV-visible, i espectrometria de masses (ESI-MS). Cadascuna d'aquestes tècniques aporta un tipus de informació complementària a la resta de tècniques, i el conjunt de les dades obtingudes permet realitzar una caracterització força completa de les mostres analitzades.

3.1.- Caracterització de MTT1

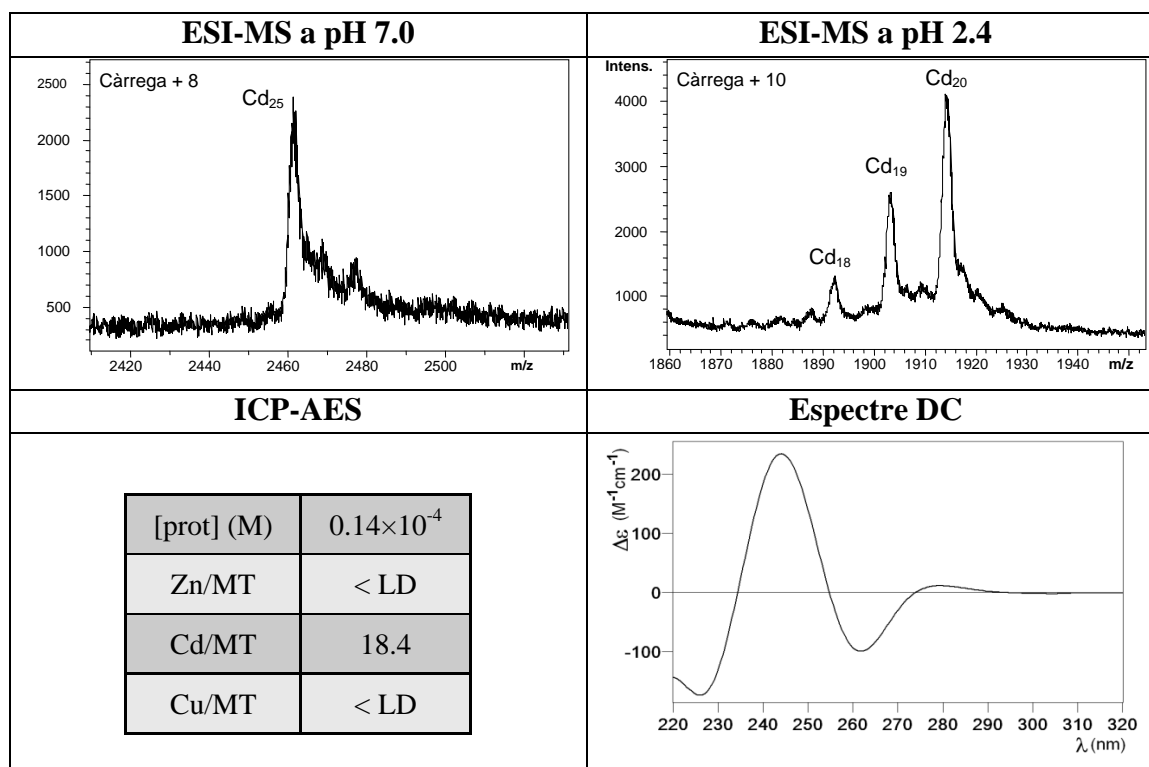
L'espectre d'ESI-MS enregistrat a pH neutre mostra que la biosíntesis de MTT1 en medis rics en Zn(II) (**Taula 3**) dóna lloc a una mescla d'espècies amb un elevat contingut metàl·lic (Zn_{30} -, Zn_{31} -, Zn_{32} -MTT1), essent Zn_{31} -MTT1 l'espècie majoritària. L'espectre de masses d'aquesta preparació a pH 2.4, que habitualment s'utilitza per tal de veure la forma de la proteïna sense metall coordinat (apo-MT), va permetre identificar la presència de Zn_{14} -MTT1 com a espècie més abundant, així com també Zn_{18} -MTT1. L'espectre DC d'aquesta preparació mostra un *exciton coupling* proper a 245 nm, que posa de manifest la presència d'enllaços Zn-Cys.



Taula 3. Resultats obtinguts en la biosíntesis de MTT1 en medis rics en Zn(II): identificació de les espècies presents per ESI-MS a pH 7.0 i 2.4; quantificació de la proteïna i del seu contingut metàl·lic per ICP-AES; i empremta espectroscòpica per DC. LD= límit de detecció.

3.- Resultats

Segons les dades d'ESI-MS, la biosíntesis de MTT1 en medis rics en Cd(II) (**Taula 4**), dóna lloc bàsicament a una única espècie homometàl·lica, Cd₂₅-MTT1. A l'espectre d'ESI-MS a pH àcid, igual que en la producció en Zn(II), tampoc es va poder observar la forma apo-MT. En aquest cas, es va obtenir una mescla d'espècies amb elevat contingut metàl·lic (Cd₁₈-, Cd₁₉-, Cd₂₀-MTT1), essent Cd₂₀-MTT1 l'espècie majoritària. Tant la producció Zn-MTT1 com la Cd-MTT1 han estat sotmeses a un tractament àcid per tal de determinar què provoca el fet de no poder observar la forma apo-MT, els resultats del qual es mostren en el següent apartat. L'espectre DC presenta absorcions a 245(+) i 260(-) nm corresponents a un *exciton coupling* centrat a 255 nm, típic de les absorcions Cd-Cys.



Taula 4. Resultats obtinguts en la producció de MTT1 en medis rics en Cd(II): identificació de les espècies presents per ESI-MS a pH 7.0 i 2.4; quantificació de la proteïna i del seu contingut metàl·lic per ICP-AES; i empremta espectroscòpica per DC. LD= límit de detecció.

La biosíntesis de MTT1 en medis rics en Cu(II) es va dur a terme en dues condicions d'oxigenació: normal i baixa. En condicions d'oxigenació normal no es va obtenir cap resultat en l'expressió de la proteïna. Pel que fa a les condicions de baixa oxigenació (Cu-low-MTT1) (**Taula 5**), sí que es va poder obtenir una petita quantitat de proteïna, però els resultats d' ICP-AES mostren una concentració molt baixa de la mateixa, fet que concorda amb que no s'observin espècies en la caracterització amb ESI-MS. L'espectre de DC no resulta de gran utilitat degut a la baixa concentració de proteïna present a la mostra i l'alt grau de soroll en l'espectre.

ICP-AES		Espectre DC
[prot] (M)	0.02×10^{-4}	
Zn/MT	< LD	
Cd/MT	< LD	
Cu/MT	26.0	

Taula 5. Resultats obtinguts en la bioproducció de MTT1 en medis rics en Cu(II), en condicions de baixa oxigenació: quantificació de la proteïna i del seu contingut metàl·lic per ICP-AES; i empremta espectroscòpica per DC. LD= límit de detecció

3.1.1.- Tractament àcid de les preparacions Zn-MTT1 i Cd-MTT1

Per tal de determinar quin és fet que provoca que en les preparacions produïdes en medis rics en zinc(II) i cadmi(II), en ser analitzades a pH 2.4 mitjançant ESI-MS, no es detecti la forma apo esperada, es va addicionar, gradualment i de forma controlada, petites quantitats d'àcid fòrmic a les produccions de MTT1 esmentades, i posteriorment van ser analitzades per ESI-MS. Els espectres enregistrats es presenten a la **Figura 3**.

Inicialment, a pH neutre, s'observen de forma majoritària les espècies Zn_{31} -MTT1 i Cd_{25} -MTT1 ja identificades. Els espectres de masses enregistrats a pH àcid (fase mòbil utilitzada a pH 2.4) mostren una disminució en el contingut metàl·lic de totes dues produccions, essent ara, Zn_{18} -MTT1, Zn_{14} -MTT1 i Cd_{20} -MTT1 els complexos més abundants. En rebaixar encara més el pH, addicionant àcid fòrmic a la mostra, s'aconsegueix veure en tots dos casos les apo-MTs. Ara bé, es continuen detectant espècies amb elevat contingut metàl·lic i amb una intensitat molt superior a la de l'apo-MT. En definitiva, s'observa que des de la primera addició d'àcid fòrmic (1 μ L) fins a l'última (30 μ L) les espècies més abundants presents són Zn_{14} -MTT1 i Cd_8 -MTT1, i en menor quantitat l'apo-MT.

3.- Resultats

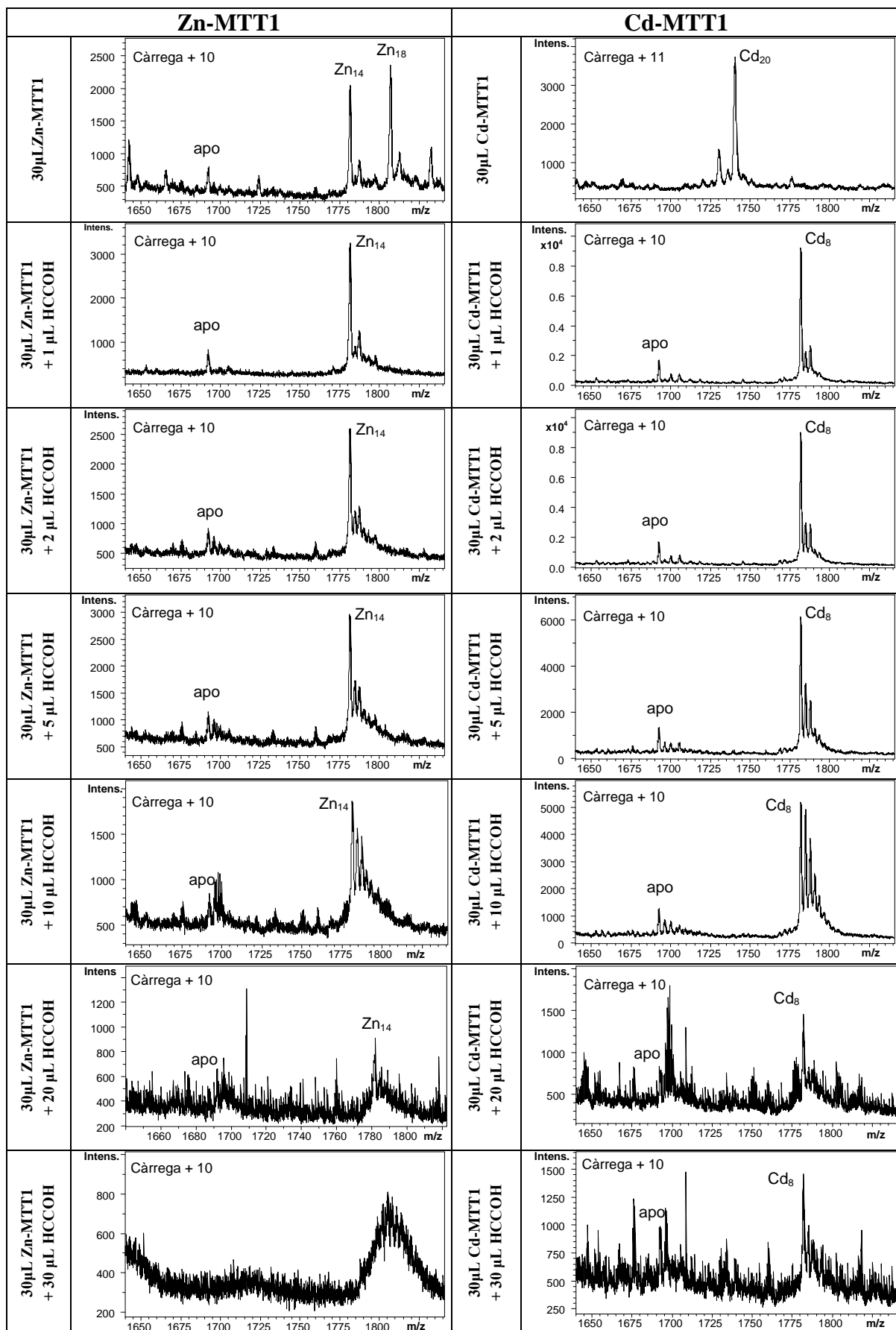
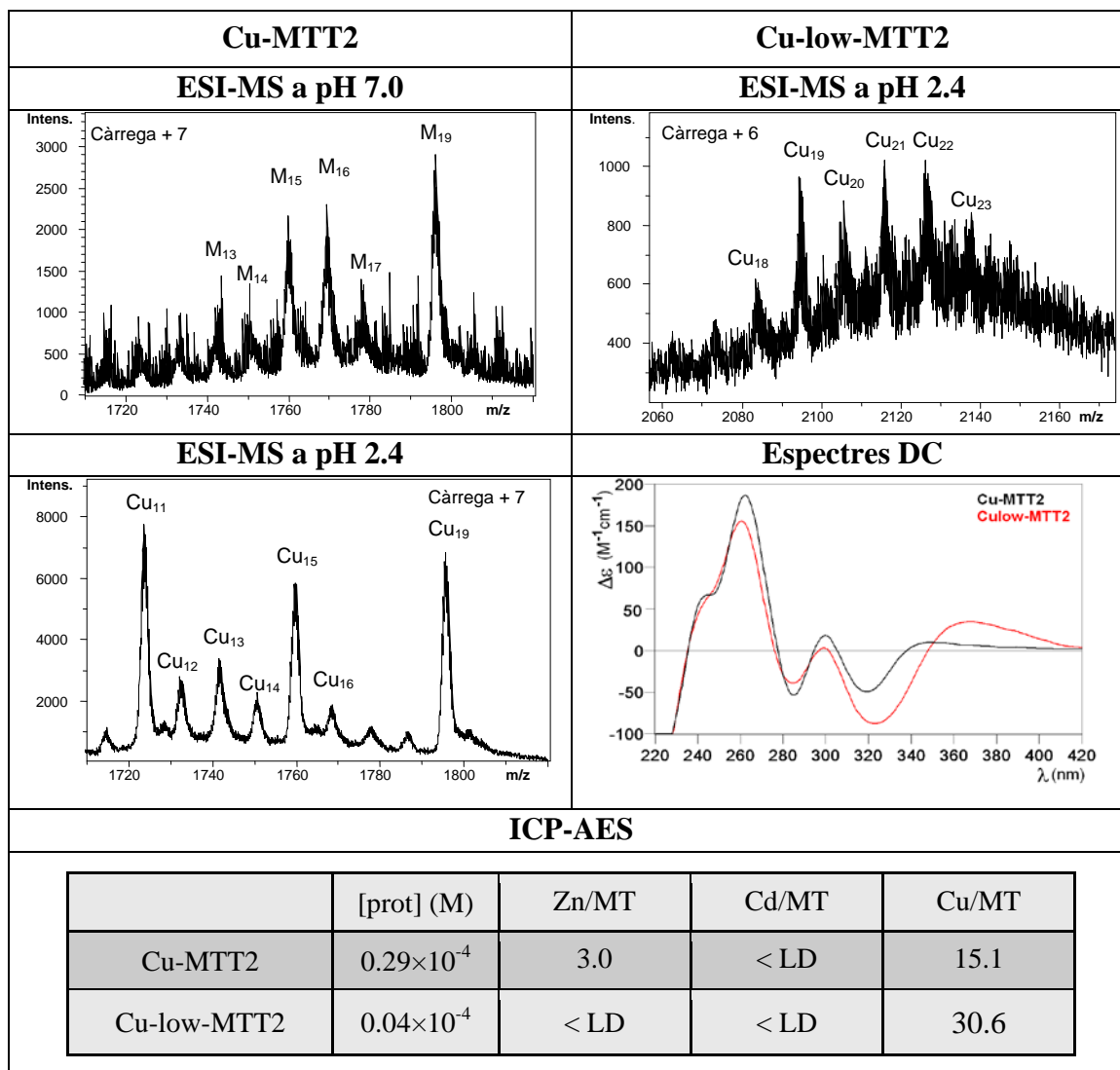


Figura 3. Espectres d'ESI-MS enregistrats a pH=2.4 per a les bioproduccions de Zn-MTT1 i Cd-MTT1. Els espectres van ser obtinguts en afegir 0, 1, 2, 5, 10, 20 i 30 μ L d' àcid fòrmic a mostres de 30 μ L.

3.2.- Caracterització de MTT2

La síntesis de MTT2 en medis rics en Zn(II) i Cd(II) va ser duta a terme mitjançant la tècnica de l'ADN recombinant. Malgrat els esforços realitzats, i després de diversos intents, no va ser possible recuperar dels cultius de *E.coli* que creixien en aquests medis cap preparació de proteïna. Pel que fa a la biosíntesis de MTT2 en medis rics en Cu(II) (**Taula 6**), aquestes es van realitzar en dues condicions d'oxigenació (normal i baixa) obtenint uns rendiments acceptables.



Taula 6. Resultats obtinguts en la producció de MTT2 en medis rics en Cu(II), en condicions d'oxigenació normal i de baixa oxigenació: identificació de les espècies presents per ESI-MS a pH 7.0 i 2.4; quantificació de la proteïna i del seu contingut metàl·lic per ICP-AES; i empremta espectroscòpica per DC. LD= límit de detecció.

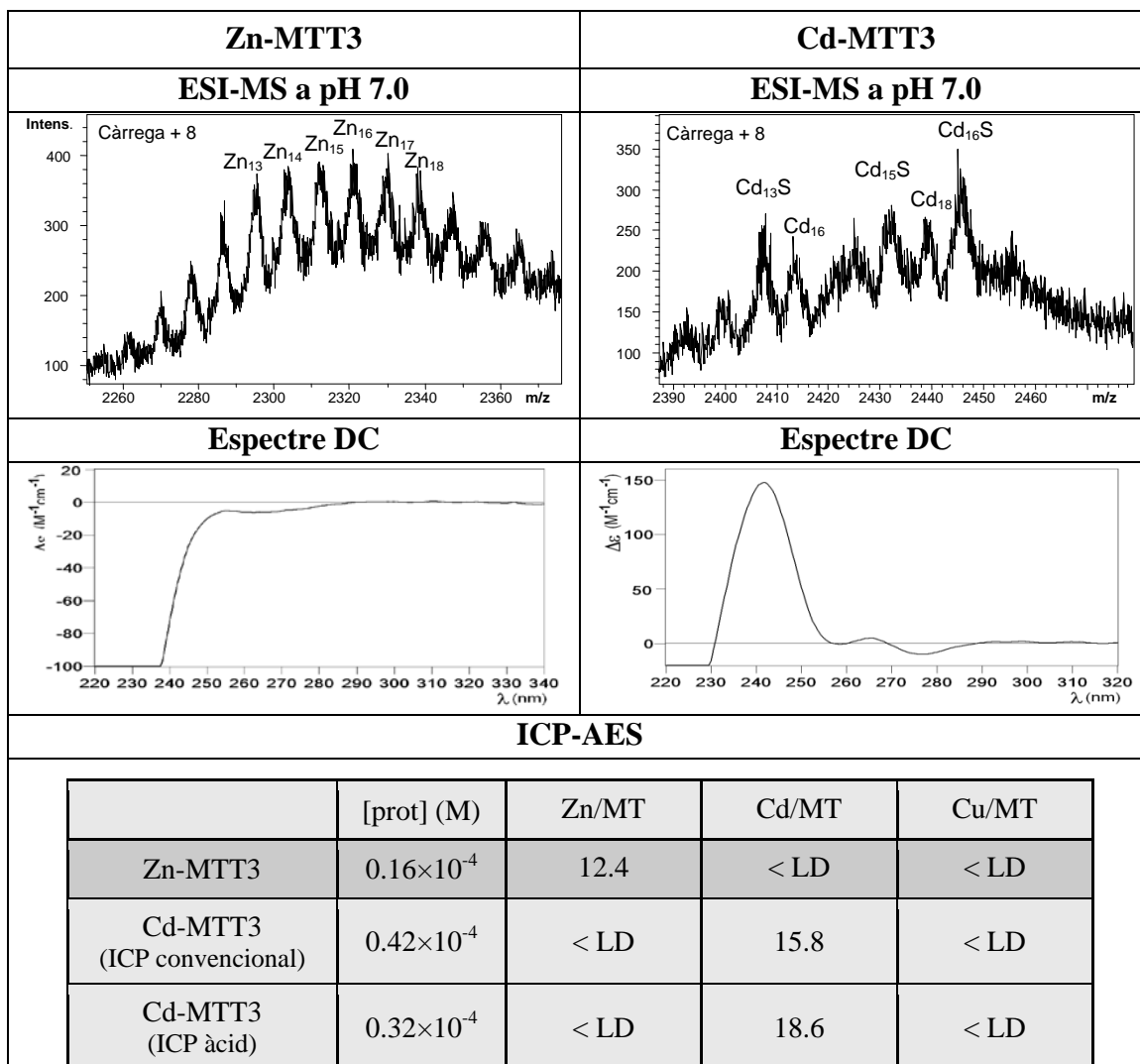
La biosíntesi de MTT2 en medis rics en Cu(II) en condicions d'oxigenació normal va donar lloc a una barreja d'espècies (majoritàriament M_{15} -, M_{16} -, M_{19} -MTT2, on M= Cu(I) + Zn(II)), essent M_{19} -MTT2 l'espècie més abundant. Aquests resultats concorden amb els obtinguts per ICP-AES que ja revelen la presència de certa quantitat de Zn(II). En

3.- Resultats

condicions de baixa oxigenació es va obtenir una preparació de MTT2 de molt baixa concentració. L'enregistrament de l'espectre ESI-MS a pH neutre no va permetre observar cap senyal, mentre que l'espectre a pH àcid denota la presència d'un gran conjunt d'espècies amb elevat contingut metàl·lic (Cu_{19-} , Cu_{20-} , Cu_{21-} , Cu_{22-} -MTT2). Els espectres DC de Cu-MTT2 i de Cu-low-MTT2 mostren bandes molt semblants. Ambdós presenten absorcions a 260(+), 285(-), 300(+), 320(-) nm.

3.3.- Caracterització de MTT3

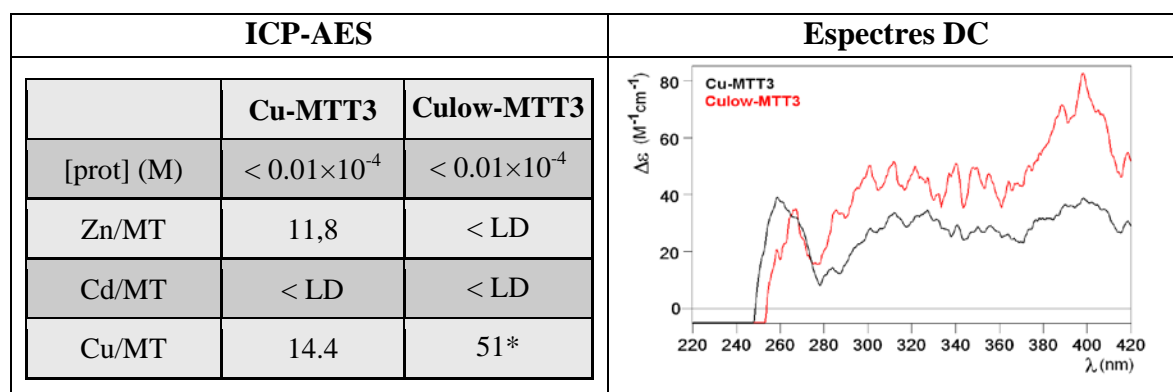
L'obtenció de MTT3 en medis rics en Zn(II) (**Taula 7**) dona lloc, segons les dades d'ESI-MS enregistrades, a una mescla de complexos de zinc amb una intensitat similar. El contingut metàl·lic de tots ells és elevat i entre les espècies predominants es troben Zn_{15-} , Zn_{16-} i Zn_{17-} -MTT3. L'espectre DC no aporta massa informació degut a la baixa concentració de proteïna, i la baixa intensitat del senyal.



Taula 7. Resultats obtinguts en la producció de MTT3 en medis rics en Zn(II) i en Cd(II): identificació de les espècies presents per ESI-MS a pH 7.0; quantificació de la proteïna i del seu contingut metàl·lic per ICP-AES; i empremta espectroscòpica per DC. LD= límit de detecció

La síntesis *in vivo* de MTT3 duta a terme en medis rics en Cd(II) (**Taula 7**) dona com a resultat un conjunt de complexos, entre els quals, s'observen espècies que contenen lligands sulfur en els seus agregats metàl·lics. Entre les espècies predominants trobem Cd₁₆S- i Cd₁₅S-MTT3, i en menor quantitat Cd₁₃S-, Cd₁₆ i Cd₁₈-MTT3. La diferència en la concentració de proteïna que s'observa en comparar els resultats obtinguts en realitzar ICP-AES, en condicions normals o àcides, corrobora la presència de lligands sulfur làbils. L'espectre DC mostra una banda intensa a 245 nm i una més feble a 260 nm. S'observen també absorcions de baixa intensitat prop de 280 nm, que podrien estar relacionades amb els cromòfors Cd-S²⁻.

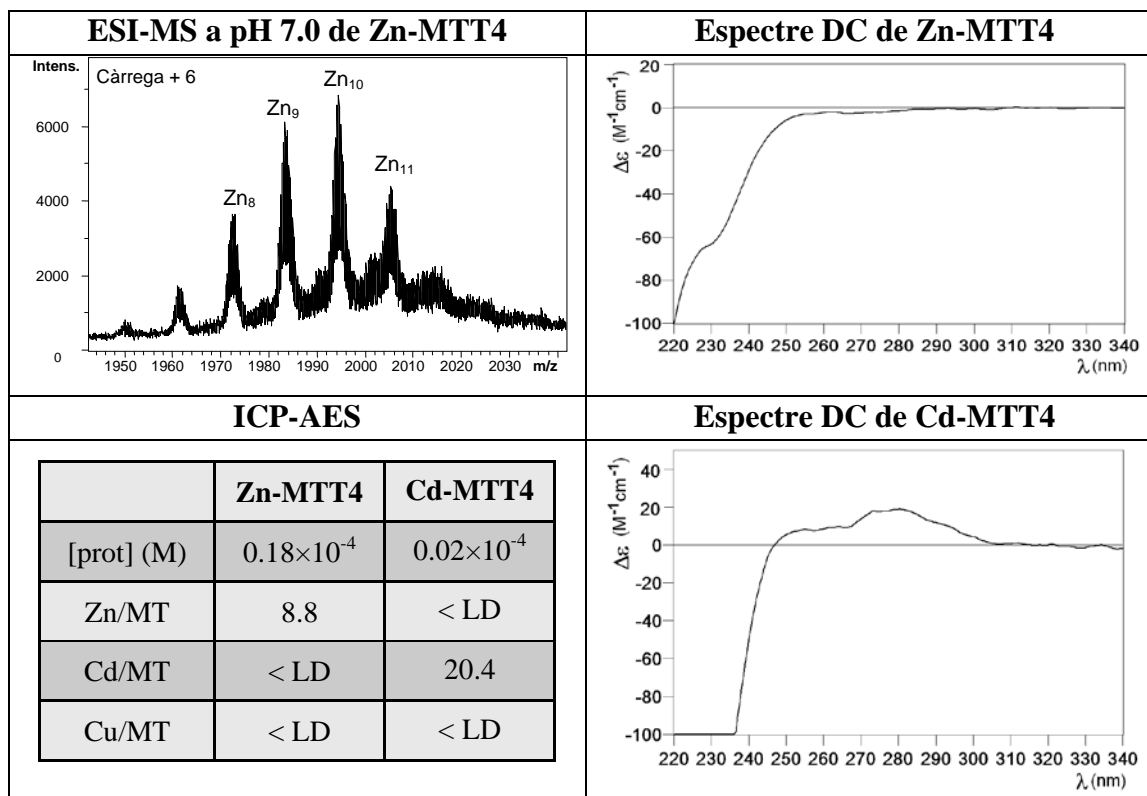
Pel que fa a l'expressió de MTT3 en medis rics en Cu(II), es van dur a terme amb èxit les produccions en condicions d'oxigenació normal i baixa oxigenació. Els resultats d'ICP-AES (**Taula 8**) posen de manifest la baixa concentració de proteïna a les mostres. Aquest fet és el responsable de que no s'observin espècies en enregistrar l'espectre ESI-MS a pH neutre, de la mateixa manera, també provoca que l'espectre DC no sigui de gran utilitat.



Taula 8. Resultats obtinguts en la preparació de MTT3 en medis rics en Cu(II), en condicions d'oxigenació normal i de baixa oxigenació: quantificació de la proteïna i del seu contingut metàl·lic per ICP-AES; i empremta espectroscòpica per DC. LD= límit de detecció. * Aquest valor presenta un error associat molt gran (> 5 %) degut a la baixa concentració de proteïna.

3.4.- Caracterització de MTT4

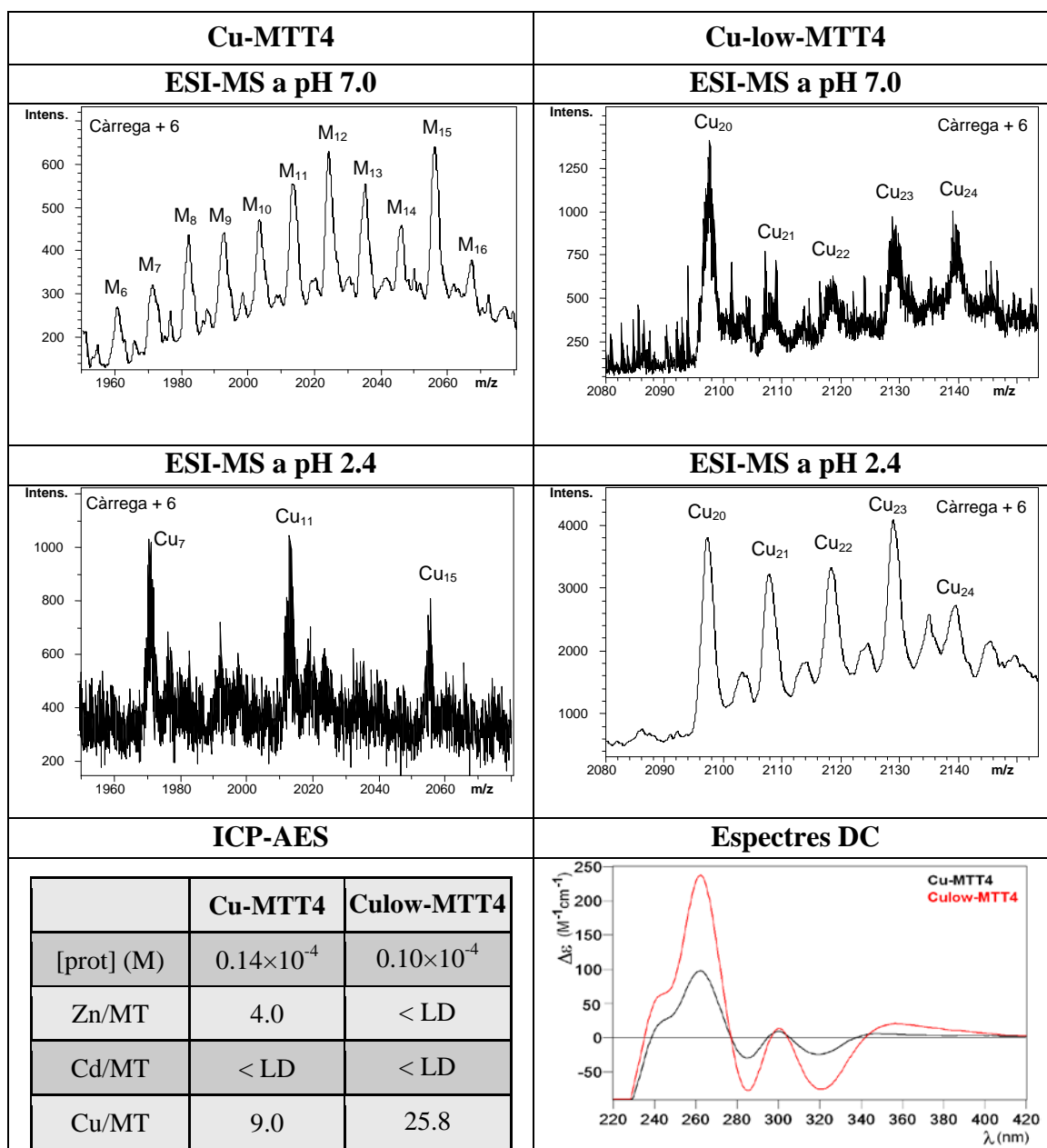
L'espectre d'ESI-MS enregistrar en caracteritzar la producció de MTT4 generada en medis rics en Zn(II) mostra com a espècies majoritàries Zn₉- i Zn₁₀-MTT4, i amb menor intensitat els complexos Zn₈- i Zn₁₁-MTT4. Pel que fa a la síntesi de MTT4 en medis rics en Cd(II) (**Taula 9**), cal esmentar que no va ser possible detectar cap espècie mitjançant aquesta tècnica.



Taula 9. Resultats obtinguts en la bioproducció de MTT4 en medis rics en Zn(II) i en Cd(II): identificació de les espècies presents per ESI-MS a pH 7.0; quantificació de la proteïna i del seu contingut metàl·lic per ICP-AES; i empremta espectroscòpica per DC. LD= límit de detecció.

La biosíntesis de MTT4 en medis rics en Cu(II) es va dur a terme en condicions d'oxigenació normal i baixa (**Taula 10**). En el primer cas s'observa la presència d'una mescla de complexos, des de M_8 - a M_{17} -MTT4 (on $M=Cu(I) + Zn(II)$), essent M_{12} - i M_{15} -MTT4 les espècies majoritàries. En canvi, en condicions de baixa oxigenació, el contingut metàl·lic de les espècies predominants és més elevat. Majoritàriament es detecta l'espècie Cu_{20} -MTT4 i en menor quantitat Cu_{23} - i Cu_{24} -MTT4.

Els espectres DC enregistrats per a aquestes produccions són pràcticament iguals, exceptuant la major intensitat que presenta l'empremta de Cu-low-MTT4 envers la de Cu-MTT4 i la banda a longitud d'ona més alta. Així, ambdós presenten absorpcions a 260(+), 280(-), 300(+) i 320(-) nm.



Taula 10. Resultats obtinguts en la producció de MTT4 en medis rics en Cu(II), en condicions d'oxigenació normal i de baixa oxigenació: identificació de les espècies presents per ESI-MS a pH 7.0 i pH 2.4; quantificació de la proteïna i del seu contingut metàl·lic per ICP-AES; i empremta espectroscòpica per DC. LD= límit de detecció

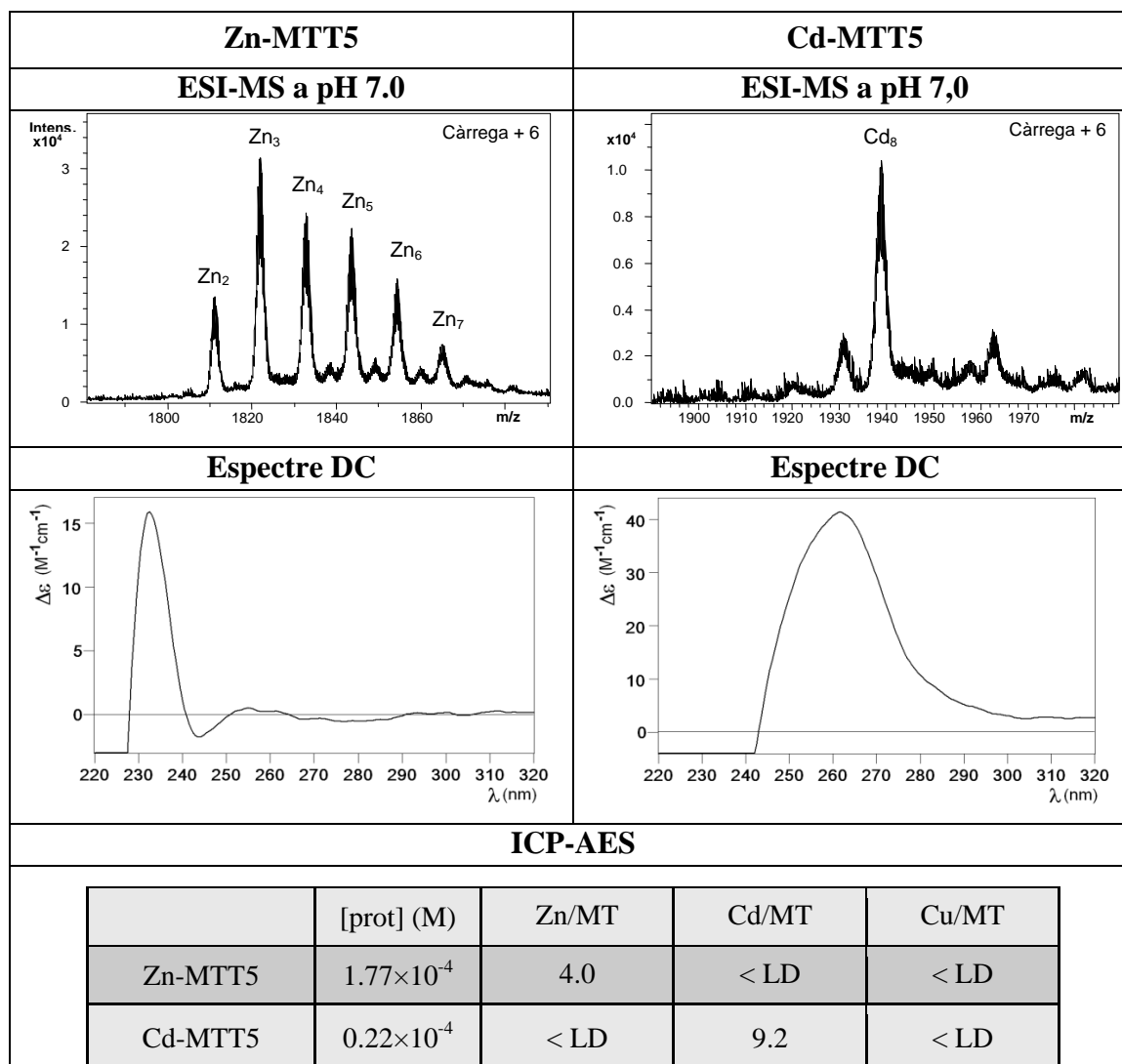
3.5.- Caracterització de MTT5

Segons les dades d'ESI-MS obtingudes, la isoforma MTT5 sintetitzada en medis rics en Zn(II) (**Taula 11**) va donar lloc a una mescla d'espècies amb un contingut metàl·lic no massa elevat tenint en compte el seu nombre en cisteïnes (Zn_3^- , Zn_4^- , Zn_5^- , Zn_6^- -MTT5), essent Zn_3^- -MTT5 l'espècie majoritària. L'espectre DC d'aquesta preparació mostra una

3.- Resultats

banda estreta a 235 nm i una altra de molt baixa intensitat a 245(-) nm, corresponent a un *exciton coupling* centrat a 240 nm, típic de les absorcions Zn-Cys.

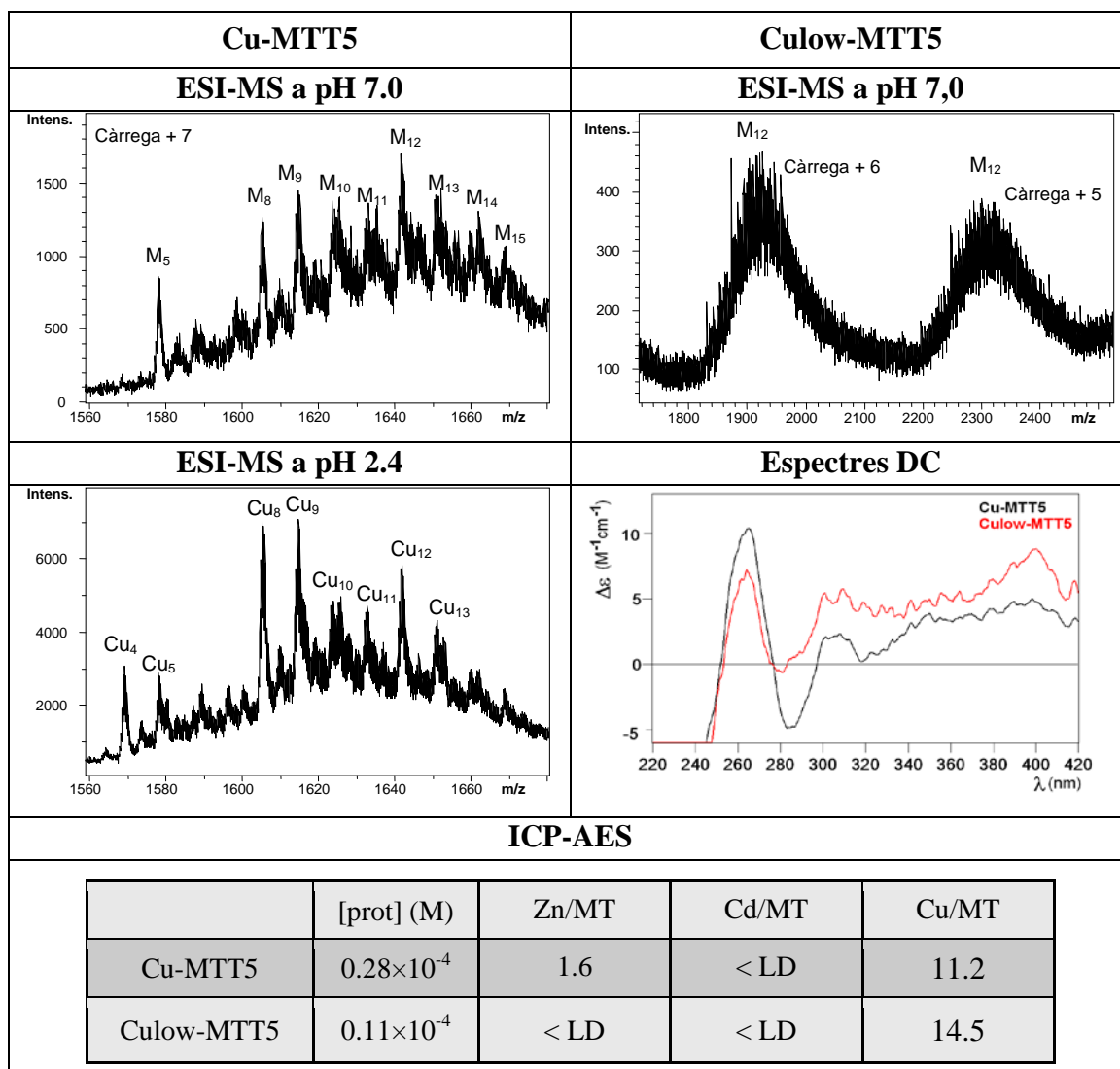
D'altra banda, la biosíntesis de MTT5 en medis rics en Cd(II) (**Taula 11**) dona lloc, bàsicament, a una única espècie homometàl·lica, Cd₈-MTT5, que té un contingut metàl·lic molt superior al de les espècies recuperades de les produccions amb Zn(II). L'espectre DC mostra una banda gaussiana ampla i centrada a 265 nm, d'una intensitat considerable.



Taula 11. Resultats obtinguts en la producció de MTT5 en medis rics en Zn(II) i en Cd(II): identificació de les espècies presents per ESI-MS a pH 7.0; quantificació de la proteïna i del seu contingut metàl·lic per ICP-AES; i empremta espectroscòpica per DC. LD= límit de detecció.

Finalment, es va dur a terme l'expressió de MTT5 en medis rics en Cu(II). En condicions d'oxigenació normal (**Taula 12**) s'obté un conjunt de complexos metàl·lics, entre els quals M₉- i M₁₂-MTT5 (essent M= Cu(I) + Zn(II)) destaquen en abundància. De la mateixa manera, en condicions de baixa oxigenació (**Taula 12**) s'observa la presència de varies espècies, amb M₁₂-MTT5 com a complex predominant. Els espectres DC

enregistrats, tot i ser de baixa intensitat, mostren senyals molt properes per a les dues produccions, amb una clara banda gaussiana centrada a aproximadament a 260 nm.



Taula 12. Resultats obtinguts en la producció de MTT5 en medis rics en Cu(II), en condicions d'oxigenació normal i de baixa oxigenació : identificació de les espècies presents per ESI-MS a pH 7.0 i a pH 2.4; quantificació de la proteïna i del seu contingut metàl·lic per ICP-AES; i empremta espectroscòpica per DC. LD= límit de detecció

4.- DISCUSSIÓ

Tenint en compte els resultats obtinguts en les bioproduccions de les 5 isoformes de MT de *Tetrahymena thermophila* en els diferents medis suplementats amb ions metàl·lics, és clar que aquestes proteïnes, en base al seu comportament, es poden agrupar en tres grups:

- a) MTT1 i MTT5: proteïnes que en medis enriquits amb Zn(II) donen lloc a la formació de diversos agregats metàl·lics; en medis rics en Cd(II) donen lloc a una única espècie ben estructurada; i que difícilment s'obtenen en medis enriquits amb Cu(II) o bé donen lloc a espècies de baixa estructuració. Aquestes isoformes tenen doncs una habilitat especial per a coordinar Cd(II) envers Zn(II), mentre que la coordinació a Cu(I) en medis fisiològics no està gaire afavorida.
- b) MTT2 i MTT4: isoformes que en medis rics en Cu(II) són capaces de formar espècies molt ben estructurades, tant heterometàl·liques, Zn(II) i Cu(I), (oxigenació normal) com homometàl·liques de Cu(I) (baixa oxigenació), mentre que el rendiment de la biosíntesi en medis rics en Zn(II) i Cd(II) és molt baix, i quan s'obté proteïna, aquesta genera espècies molt poc estructurades i de difícil caracterització. Aquestes proteïnes mostren clarament una major preferència per Cu(I) que pels ions divalents, però el seu comportament dista força del d'una Cu-tioneïna genuïna.
- c) MTT3: proteïna que dóna lloc a la formació de diverses espècies en medis rics en Zn(II) i Cd(II), fins i tot generant espècies que contenen lligands sulfur làbils. Aquests trets, característics de Cu-tioneïnes, contrasten amb la impossibilitat d'obtenir complexos Cu-MTT3 a partir de cultius de *E.coli* crescuts en medis rics en Cu(II). Aquestes observacions, aparentment contradictòries, fan que sigui molt complicat poder classificar en aquests moments aquesta isoforma com a Cu- o Zn/Cd-tioneïna.

Tenint en compte la bibliografia, si bé és cert que les dades aquí obtingudes estan d'acord amb els patrons d'inducció observats en treballs anteriors [28-33], cal destacar que el comportament d'aquestes MTs és molt particular. En un cas paradigmàtic com és el de les MTs dels cargols *H. pomatia* i *C. aspersum* [37,38], s'ha trobat que aquests tenen isoformes especialitzades per enllaçar, respectivament, Cd(II) i Cu(I) en entorns fisiològics, però que quan són produïdes de forma recombinant en medis enriquits en el metall pel qual no tenen especificitat, o sigui, les Zn/Cd-tioneïnes en medis rics en Cu(II) o les Cu-tioneïnes en medis rics en Cd(II), també es poden obtenir preparacions metall-MT

amb un rendiment considerable. El fet que les isoformes de MT de *Tetrahymena* estudiades en aquest treball, sense mostrar un caràcter clarament genuí ni de Cu- ni de Zn-tioneïnes, siguin incapaces de ser produïdes en determinats medis enriquits amb metalls sembla indicar que no només l'especificitat metàl·lica és la responsable del seu baix rendiment, sinó també alguna altra característica intrínseca a les proteïnes.

Analitzant l'estructura primària (contingut de les cadenes d'aminoàcids d'aquestes proteïnes), **Taula 13**, es pot apreciar un fet molt particular: MTT1, MTT3 i MTT5 contenen tant dobles com triplets de cisteïnes, i pocs motius XCXCX. Contràriament, MTT2 i MTT4 no tenen cap doblet ni triplet de Cys, però sí un nombre important de motius XCXCX. Així, la relació entre el comportament observat i l'anàlisi de les seqüències d'aquestes 5 isoformes de MT de *T. thermophila* sembla indicar que la preferència metàl·lica per Cd(II) està lligada a la presència de dobles i triplets de Cys, que impedirien de manera important la coordinació de Cu(I) en entorns cel·lulars, mentre que l'absència de dobles i triplets, juntament amb la presència de motius XCXCX afavoriria una certa preferència per enllaçar Cu(I). Tot i així, seran necessaris treballs addicionals per tal de poder assegurar la relació, aquí observada, entre l'especificitat metàl·lica i els motius estructurals de les Cys.

	Nombre d' aa	Cys	XCXCX	XCCX	XCCCX	Cys/Cd
MTT1	162	48	2	11	6	1.92
MTT2	108	32	15	0	0	-
MTT3	162	42	5	11	2	2.33
MTT4	108	32	14	0	0	-
MTT5	99	24	1	7	1	3.00

Taula 13: Número d'aminoàcids totals, de cisteïnes, de motius XCXCX, de dobles i de triplets, i relació entre el nombre de Cys i l'espècie de Cd amb major contingut metàl·lic observada.

Finalment, analitzant el contingut metàl·lic de les espècies Cd-MT biosintetitzades amb més contingut metàl·lic, determinades a partir de les dades d'ESI-MS (Cd₂₅-MTT1, Cd₁₈-MTT3 i Cd₈-MTT5), i relacionant-les amb el nombre de Cys de cada isoforma, es pot apreciar una relació entre el contingut en Cys de la proteïna i la capacitat màxima d'enllaç a Cd(II). Així, quan el nombre de Cys augmenta, la relació Cys/Cd disminueix, la qual cosa implica que la quantitat de SCys pontals serà més gran en aquells casos en què aquesta relació és menor. Per tant, es pot considerar que, en el cas de les isoformes MTT1, MTT3 i MTT5 estudiades, quan augmenta el nombre de Cys, la capacitat per enllaçar ions Cd(II) també augmenta en base a tenir més Cys actuant com a lligands pont entre els ions metàl·lics, i menys Cys terminals, coordinades a un únic Cd(II).

5.- CONCLUSIONS

- 1.- La inusual longitud de les metal·lotioneïnes de *Tetrahymena thermophila*, així com el seu elevat contingut en residus cisteïnics, concorda amb el fet que les espècies obtingudes en ser biosintetitzades en cultius d'*E.coli* presentin un contingut metàl·lic força més elevat, en comparació amb les MTs d'altres organismes.
- 2.- Les isoformes MTT1 i MTT5 de *T. thermophila*, donen lloc a una única espècie homometàl·lica quan són produïdes en medis suplementats amb Cd(II), tret que ens permet classificar-les com a Cd-tioneïnes.
- 3.- La isoforma MTT1 de *T. thermophila* obtinguda tant en medis rics en Zn(II), com en medis rics en Cd(II), presenta una elevada resistència a alliberar tot el seu contingut metàl·lic, fins i tot en condicions dràsticament àcides, on, tot i detectar-se la presència de la forma apo-MT, aquesta no és mai l'espècie més abundant.
- 4.- Les isoformes MTT2 i MTT4 presenten una clara preferència metàl·lica envers ions monovalents, en concret Cu(I), tot i que el seu comportament no encaixa amb el de Cu-tioneïnes genuïnes.
- 5.- L'isoforma MTT3 presenta certes característiques típiques de Cu-tioneïna, com per exemple, el fet de generar diversos agregats en medis suplementats amb Zn(II) o Cd(II), fins i tot, obtenint-se espècies que contenen lligands sulfur. Contradictòriament, la seva síntesi en medis rics en Cu(II) no sembla estar gaire afavorida, la qual cosa impossibilita la seva classificació com a Cu- o Zn/Cd-tioneïna.
- 6.- Els resultats obtinguts posen de manifest que els motius estructurals de les cadenes polipeptídiques juguen un paper important en les preferències metàl·liques d'aquestes MTs. Així, sembla que la presència de doblats i triplets de cisteïnes està lligada a una preferència metàl·lica envers ions divalents, principalment Cd(II), mentre que els motius XCXCX afavoreixen la coordinació a Cu(I).
- 7.- En comparar les formes Cd-MT biosintetitzades de les diferents isoformes de *T. thermophila*, s'observa que la relació Cys/Cd entre les espècies majoritàries formades, no es manté. En augmentar el nombre de Cys, aquesta relació decreix, fet que indica que la quantitat de SCys pontals augmenta.

6.- PART EXPERIMENTAL I TÈCNiques UTILITZADES

Tot el material de vidre emprat en els diferents processos experimentals que es detallen a continuació ha estat prèviament rentat amb HNO₃ al 20% (v/v) i acte seguit amb abundant aigua milli-Q (aigua bidestil·lada). Aquestes pautes tenen com a objectiu eliminar possibles restes d'ions metàl·lics presents al material que poguessin contaminar les mostres. Per tal de mantenir aquesta precaució, el material de plàstic emprat ha estat sempre d'un sol ús.

6.1.- Obtenció i caracterització de les proteïnes

Les proteïnes emprades en aquest treball de recerca han estat les cinc isoformes de MT presents a *Tetrahymena thermophila* (MTT1, MTT2, MTT3, MTT4 i MTT5). La seva producció ha estat possible gràcies al grup de recerca de la Dra. Silvia Atrian, del Departament de Genètica (Facultat de Biologia), de la Universitat de Barcelona, que les ha obtingut mitjançant procediments d'enginyeria genètica. La metodologia del ADN recombinant permet obtenir proteïnes amb elevada puresa (superior al 95%) i concentracions prou elevades com per permetre la seva caracterització ($\sim 10^{-4}$ M) [35,36]. D'aquesta manera, s'ha produït en *E.coli* cadascuna de les isoformes esmentades en medis rics en Zn(II), Cd(II) i Cu(II), per tal d'obtenir, respectivament, les espècies Zn(II)-, Cd(II)- i Cu(I)-MT. Aquests complexos metall-MT són eluïts en tampó Tris-HCl 50 mM a pH 7 i es conserven a -80 °C fins el seu ús. Cal deixar clar que el coure coordinat a les MTs sempre presenta estat d'oxidació +1. Ara bé, als medis de cultiu s'introdueix una sal de Cu(II) donat que les cèl·lules d'*E. coli* permeten l'entrada de Cu(II) però no de Cu(I). Un cop incorporat el metall, dins la cèl·lula existeixen mecanismes de reducció que permetran la incorporació de Cu(I) a les MTs.

Per tal de dur a terme la caracterització de les diferents espècies s'han emprat diverses tècniques analítiques: ICP-AES, que permet quantificar les proteïnes i el seu contingut metàl·lic; espectrometria de masses (ESI-MS), per tal de determinar l'estequiometria i el nombre d'espècies formades *in vivo*; i espectroscòpies de DC i UV-visible, que aporten informació sobre el plegament de les proteïnes al voltant dels centres metàl·lics.

6.2. Espectroscòpia d'emissió atòmica amb plasma acoblat per inducció (ICP-AES)

Aquesta tècnica aprofita el fet que els electrons excitats emeten, en tornar a l'estat fonamental, energia a unes determinades longituds d'ona. La principal característica d'aquest procés és que cada element emet energia a longituds d'ona específiques depenent del seu caràcter químic; a més, la intensitat d'aquesta energia emesa és proporcional a la concentració de l'element a la mostra. Així doncs, mitjançant ICP-AES es possible determinar la concentració de diversos elements, com ara S, Zn, Cd i Cu, entre d'altres. D'aquesta manera, coneixent el contingut en Cys i Met de les proteïnes que es vol analitzar, es pot mesurar la concentració de proteïna, així com també la relació molar metall/proteïna promig de la mostra analitzada.

Pel que fa a la quantificació de les diverses preparacions metall-MT objecte d'aquest treball, cadascuna de les mostres s'analitza utilitzant el procediment anomenat "ICP-AES convencional" i "ICP-AES àcid". En el procediment "ICP-AES convencional", es preparen solucions prenent entre 75 i 150 µL de mostra, i afegint HNO₃ al 2% (v/v) fins un volum final de 3 mL. A partir d'estàndards comercials de S, Zn, Cd i Cu de concentració 1000 ppm, es preparen patrons de concentracions conegudes, els quals permeten construir la recta patró dels diferents elements en estudi on s'interpolarà la mostra que es vol quantificar. Normalment, les concentracions dels elements que conformen la recta patró tenen valors inferiors o iguals a 3 ppm per cada element.

El procediment de "ICP-AES àcid" consisteix en afegir a la mostra la mateixa quantitat, en volum, d'àcid nítric concentrat ultrapur i posteriorment escalfar la solució entre 60 i 80 °C durant 10 min amb el tub obert a l'aire. Finalment s'afegeix prou aigua i HNO₃ fins a tenir una concentració del 2 % (v/v) d'àcid nítric. La solució es mesura i s'interpola el valor mesurat en la recta anteriorment descrita. En totes les mesures realitzades, la massa de mostra i la massa de la solució final han estat mesurades en una balança de precisió.

El procediment d'"ICP-AES àcid" es fa per eliminar la possible presència de lligands sulfur làbils, sovint presents a algunes solucions de MTs i que es desprenen en forma d'àcid sulfhídric gasós, de manera que es quantifica únicament el S present a la cadena d'aminoàcids en forma de residus de Cys i Met. Quan la concentració de proteïna mesurada pel procediment d'"ICP-AES àcid" és clarament inferior a la calculada mitjançant "ICP-AES convencional", es té evidència de la presència de lligands sulfur. En cas contrari, els dos valors coincideixen.

6.3.- Espectrometria de masses, ESI-TOF MS

L'espectrometria de masses (MS) es basa en la caracterització de matèria mitjançant la separació i detecció d'ions en fase gasosa en relació a la seva massa. Per tal d'estudiar proteïnes, com és l'objectiu principal d'aquest treball, el més indicat és utilitzar una font d'ionització suau com ara ionització per electroesprai (ESI). Un analitzador de temps de vol (TOF) permet determinar relacions m/z de manera molt acurada. Així, la metodologia ESI-TOF MS fa possible identificar el nombre d'espècies presents en les preparacions estudiades, l'estequiometria de les espècies metall-MT obtingudes, així com la massa de la proteïna sense metall coordinat, i també permet relacionar, de manera aproximada, les abundàncies relatives de les espècies presents, en funció de la seva intensitat.

Adicionalment, el dispositiu porta acoblada una bomba d'HPLC que permet treballar en diferents condicions de pH i tampons. Normalment es treballa a dos pH diferents: a pH 7.0, condició en la que els diferents agregats metall-MT mantenen tot el metall coordinat; i a pH 2.4, en què, normalment, el Zn(II) i Cd(II) no es mantenen coordinats a la proteïna, permetent observar únicament les espècies Cu-MT i apo-MT.

6.4.- Espectroscòpies DC i UV-visible

Les tècniques d'absorció UV-visible i de Dicroisme Circular (DC) permeten observar senyals relacionats amb l'estructuració de la proteïna al voltant dels metalls gràcies a les energies d'absorció característiques d'aquests metalls quan estan coordinats amb cada lligand. Els espectres d'absorció UV-visible proporcionen informació sobre l'enllaç dels metalls a la proteïna, i l'espectroscòpia DC sobre el plegament d'aquesta al voltant dels centres metàl·lics i la quiralitat de les espècies formades.

En ambdues tècniques, les energies dels senyals observats per sota dels 230 nm són degudes a la cadena peptídica, i aquelles que apareixen entre 220 i 500 nm es poden atribuir a bandes de Transferència de Càrrega (TC) entre els lligands i els metalls [6]. En les MTs, la formació d'agregats metall-proteïna comporta la formació de cromòfors i també la transferència de la quiralitat de la proteïna a aquest cromòfor (que esdevé un cromòfor quiral), condicionada per la quantitat i el tipus d'interacció entre ambdós. L'apo-MT no presenta cap absorció per sobre de 230 nm donat que no té metalls units (sempre que aquesta no tingui aminoàcids aromàtics, que sí poden presentar lleugeres absorcions per sobre de 230 nm).

Per UV-visible, els senyals obtinguts són molt amples i no aporten gaire informació, només indiquen la formació d'enllaços entre el metall i la proteïna. En canvi, els senyals de

DC, que presenten un grau de complexitat superior, permeten obtenir informació, entre 220 i 500 nm, que depèn del tipus de metall, del seu entorn de coordinació, i del grau d'estructuració de l'agregat metall-MT.

6.5.- Aparells utilitzats

L'enregistrament dels espectres de masses ha estat possible gràcies a un aparell Micro Tof-Q II 28 de Bruker, amb ionització per ESI i analitzador TOF. La calibració de l'equip es porta a terme amb una solució de NaI (200 ppm NaI en H₂O/isopropanol 1:1). Per tal d'analitzar proteïnes que contenen Zn(II) o Cd(II) s'utilitzen les següents condicions experimentals: Injecció de 30 µL de proteïna a través d'un tub llarg de PEEK (2.0 m x 0.17 mm i.d.) a 45 µL/min; temperatura del injector a 25°C; voltatge del capil·lar de 5000 V; temperatura zona d'assecament 100°C; velocitat gas d'assecament 6.0 L/min, rang de m/z 800-3000. Pel que fa a les mostres que contenen Cu(I), les condicions són lleugerament diferents: Injecció de 30 µL de proteïna a través d'un tub llarg de PEEK (2.0 m x 0.17 mm i.d.) a 45 µL/min; temperatura del injector a 25°C; voltatge del capil·lar de 4400 V; temperatura zona d'assecament 90°C; velocitat gas d'assecament 6.0 L/min, rang de m/z 800-3000. La fase mòbil consisteix, en tots dos casos, en una mescla 85:15 d'acetat amònic/amoniac amb acetonitril a pH 7.0. Els espectres de masses enregistrats a pH àcid requereixen les mateixes condicions experimentals que les emprades per analitzar proteïnes que contenen metalls divalents (Zn, Cd), exceptuant la composició de la fase mòbil, que en aquest cas consisteix en una barreja 85:15 d'àcid fòrmic amb acetonitril a pH 2.4.

La quantificació de les proteïnes es duu a terme per espectroscòpia d'emissió atòmica de plasma acoblat per inducció, utilitzant un espectròmetre ICP-AES Perkin Elmer Optima 3200 RL. Per l'anàlisi de S, Zn, Cd i Cu, es treballa a les longituds d'ona de 182.04, 213.85, 228.80 i 324.75, respectivament.

Un espectropolarímetre Jasco-715 permet l'enregistrament dels espectres de DC de les mostres, aquests són obtinguts entre 200 i 500 nm, a 50 nm/min, 0.5 nm de resolució i a una temperatura de 25 °C. Les mostres, diluïdes amb aigua milli-Q fins a una concentració entre 5-10 µM (depenent del contingut en cisteïnes), es dipositen en una cubeta de quars d'1 cm de pas de llum per tal d'introduir-les a l'instrument. S'obté el blanc mitjançant una solució de Tris-HCl de la mateixa concentració que les mostres. Els espectres d'absorció UV-vis es realitzen en un espectrofotòmetre HP8453A de *diode array* amb 15 segons de temps d'integració, entre 200 i 800 nm.

Tant els espectres d'absorció de DC com els de UV-vis són, posteriorment, tractats amb el programa informàtic GRAMS/32.

7.- BIBLIOGRAFIA

- 1 Margoshes M., Vallee B.L., *J. Am. Chem. Soc.*, 1957, **79**, 4813-4814.
- 2 <https://scifinder.cas.org/>, (consulta 27.06.12).
- 3 <http://www.isiknowledge.com>, (consulta 27.06.12).
- 4 Stillman M.J., *Coord. Chem. Rev.*, 1995, **144**, 461-511.
- 5 Capdevila M., Bofill R., Palacios Ò., Atrian S., *Coord. Chem. Rev.*, 2011, **256 (1-2)**, 46-62.
- 6 Kägi J.H.R., Kojima Y., *Experientia Supplementum Metallothionein II [International Metallothionein Meeting]*, **52**, Birkhäuser Verlag, Basel, 1987.
- 7 Fowler B.A., Hildebrand C.E., Kojima T., Webb M., *Experientia Supplementum*, 1987, **52**, 19-22.
- 8 Kägi J.H.R., Schäffer A., *Biochemistry*, 1988, **27**, 8509-8515.
- 9 Domènech J., *Tesi doctoral*, Dept. Genètica, Universitat de Barcelona, 2007.
- 10 Binz P.A., Kägi H.R., Metallothionein: Molecular evolution and Classification. Dins: *Metallothionein IV [International Metallothionein Meeting]*, Klasen C., Birkhäuser Verlag, Basel, 1999, 7-13.
- 11 <http://www.bioc.uzh.ch/mtpage/classif.html>, (consulta 10.07.12).
- 12 Valls M., Bofill R., González-Duarte R., Capdevila M., Atrian S., *J. Biol. Chem.*, 2001, **276**, 32835-32843.
- 13 Palacios Ò., Atrian S., Capdevila M., *J. Biol. Inorg. Chem.*, 2011, **16**, 991-1009.
- 14 Capdevila M., Domènech J., Pagani A., Tío L., Villareal L., Atrian S., *Angew. Chem. Int.*, 2005, **44**, 4618-4622.
- 15 Orihuela R., Monteiro F., Pagani A., Capdevila M., Atrian S., *Chem. Eur. J.*, 2010, **16**, 12363-12372.
- 16 Pérez-Rafael S., Mezger A., Lieb B., Dallinger R., Capdevila M., Palacios Ò., Atrian S., *J. Inorg. Biochem.*, 2012, **108**, 84-90.
- 17 Bofill R., Capdevila M., Atrian S., *Metallomics*, 2009, **1**, 229-234.
- 18 Palmiter R.D., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1998, **79**, 8428-8430.
- 19 Carpenè E., Andreani, G., Isani G., *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 2007, **21**, 35-39.
- 20 Serra M., *Tesi doctoral*, Dept. Química, Universitat Autònoma de Barcelona, 2008.
- 21 Vašák M., Romero-Isart N., *Encyclopedia of Inorganic Chemistry*, 2006, **V**, 3208-3221.
- 22 Orihuela R., *Tesi doctoral*, Dept. Química, Universitat Autònoma de Barcelona, 2009.
- 23 Greisen P., Jaspersen J.B., Kepp K. P., *Dalton Trans.*, 2012, **41**, 2247-2256.
- 24 Pymol 2006, by DeLano Scientific. <http://www.pymol.org/>.
- 25 Blindauer C.A., Harrison M.D., Parkinson J.A., Cavet J.S., Robinson N.J., Sadler P.J., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2001, **98 (17)**, 9593-9598.
- 26 Gutiérrez J.C., Amaro F., Díaz S., Francisco P.de, Cubas L.L., Martín-González A., *J. Biol. Inorg. Chem.*, 2011, **16**, 1025-1034.
- 27 Amaro F., *Tesi doctoral*, Dept. Microbiología III, Universidad Complutense de Madrid, 2009.
- 28 Gutiérrez J.C., Amaro F., Martín-González A., *Bioessays*, 2009, **31**, 805-816.
- 29 Díaz S., Amaro P., Rico D., Campos V., Benítez L., Martín-González A., Hamilton E., Orias E., Gutiérrez J.C., *PLoS One*, 2007, **2(3)**, e291.
- 30 Amaro F., Pilar de Lucas M., Martín-González A., Gutiérrez J.C., *Gene*, 2008, **423**, 85-91.
- 31 Fu C., Miao W., *Protist*, 2006, **157**, 193-203.
- 32 Piccini E., Bertaggia D., Santovito G., Miceli C., Kraen A., *Gene*, 1999, **234**, 51-59.
- 33 Shang Y., Song X., Bowen J., Corstange R., Gao Y., Gaertig J., Gorovsky M.A., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2002, **99**, 3734-3739.
- 34 Domènech J., Bofill R., Tinti A., Torreggiani A., Atrian S., Capdevila M., *B.B.A.*, 2008, **1784**, 693-704.
- 35 Capdevila M., Cols N., Romero-Isart N., González-Duarte R., Atrian S., González-Duarte P., *Cell. Mol. Life Sci.*, 1997, **53**, 681-688.
- 36 Cols N., Romero-Isart N., Capdevila M., Oliva B., González-Duarte P., González-Duarte R., Atrian S., *J. Inorg. Biochem.*, 1997, **68**, 157-166.
- 37 Palacios Ò., Pagani A., Pérez-Rafael S., Egg M., Höckner M., Brandstätter A., Capdevila M., Atrian S., Dallinger R., *BMC Biology*, 2011, **9**:4.
- 38 Pérez-Rafael S., Atrian S., Capdevila M., Palacios Ò., *Talanta*, 2011, **83**, 1057-1061.

