

Eduardo Moltó Pérez

**CLONAJE, EXPRESIÓN Y CARACTERIZACIÓN
ESTRUCTURAL DE UNA NUEVA
METALOTIONEÍNA DE CRUSTÁCEOS A
PARTIR DE LA LANGOSTA
PANULIRUS ARGUS. ESTUDIOS DE SU FUNCIÓN
EN LA MITOCONDRIA**

I.S.B.N. Ediciones de la UCLM
84-8427-401-2



Ediciones de la Universidad
de Castilla-La Mancha

Cuenca, 2005



UNIVERSIDAD DE CASTILLA-LA MANCHA

Facultad de Ciencias Químicas

Departamento de Química Inorgánica, Orgánica y Bioquímica

**CLONAJE, EXPRESIÓN Y CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL DE
UNA NUEVA METALOTIONEÍNA DE CRUSTÁCEOS, A PARTIR DE
LA LANGOSTA *Panulirus argus*.
ESTUDIOS DE SU FUNCIÓN EN LA MITOCONDRIA.**

Eduardo Moltó Pérez

2005

Memoria que presenta el licenciado

EDUARDO MOLTÓ PÉREZ

Para aspirar al grado de

DOCTOR EN CIENCIAS QUÍMICAS

Director de esta tesis:

Dr. ANTONIO ANDRÉS HUEVA

El presente trabajo ha sido realizado en el laboratorio "Dra. Cubero Llabrés" del Área de Bioquímica de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad de Castilla-La Mancha, con ayuda de una beca de la Agencia Española de Cooperación Internacional (Octubre 2000- Septiembre 2003) y de una beca del Vicerrectorado de Cooperación Internacional de la UCLM (Octubre 2003- Septiembre 2004).

*"Lo que sabemos es una gota de agua.
Lo que ignoramos es el océano".*

Isaac Newton

Agradecimientos

Aunque es difícil agradecer a todas las personas que durante estos años de trabajo me han prestado su apoyo de una forma u otra y han contribuido de algún modo a la realización de esta tesis, intentaré hacerlo con mis mejores palabras tratando de no olvidar a nadie. No obstante, en muchos casos quedará muy escueto poderles expresar todo el agradecimiento que merecen en unas pocas líneas.

En mi primer lugar me gustaría dar las gracias a mi director de tesis, el Dr. Antonio Andrés, por la confianza que ha depositado en mí desde el principio, por todo el esfuerzo que ha realizado para que esta tesis pudiera llegar al final a pesar de la cantidad de obstáculos que hemos tenido y por su enorme ayuda personal. Asimismo, a la Dra. Nilda Gallardo por haberme introducido en el campo de la bioquímica, por su apoyo, sus consejos y su optimismo frente a los diferentes giros de la investigación.

A la Dra. Araceli del Arco por su inestimable ayuda en el clonaje y expresión de la proteína objeto de esta tesis y por lo dispuesta que en todo momento estuvo a aconsejarme lo más rápido posible a través del teléfono o el email. También en este aspecto quisiera darle las gracias a la Dra. Dulce M. López por iniciarme en la biología molecular y por el esfuerzo que me dedicó durante los años que compartimos, y a la Dra. Sílvia Atrian por donarnos tan gentilmente las bacterias *E. coli* BL-21 y los plásmidos pGEX-4T-1, cuando económicamente nos resultaba difícil comprarlos.

A la Dra. Jorgina Satrústegui por poner a nuestra disposición su laboratorio para realizar los experimentos con el electrodo de oxígeno, así como a su doctoranda Laura Contreras por todo lo que me ayudó con la realización de esos experimentos. A todos los miembros de ese laboratorio (CX-450 de la UAM) por acogerme durante esos días y tratarme tan bien.

A los miembros del Servicio Interdepartamental de Investigación de la UAM. En especial a Conchi Moreno, María Jesús Vicente y Ramón Fernández por el interés prestado en los análisis que les solicitamos, es decir, la secuenciación de DNA y el análisis por HPLC-RP-ESI-MS y TXRF. De igual forma a Alberto Adeva, del Servicio Científico-técnico de la Universidad de Barcelona por la ayuda prestada en el análisis aminoacídico.

Al Dr. Paulino Gómez, del Centro de Astrobiología y la Dra. Amalia Muñoz del Centro Nacional de Biotecnología por echarme una mano en la utilización de los programas de predicción y visualización de estructura de proteínas.

Gracias a todos mis compañeros del laboratorio por compartir buenos momentos, y también otros más duros; tanto a los que aún están: Carmen, Pablo, Charo, Mairena, María Angeles, José Luis, Macu, Sergio, como los que ya no están: Marga, David, Javier, Merche...así como a los que han llegado más recientemente y han aportado juventud y ánimo en la recta final.

A la Dra. Carmen Arribas por los buenos consejos que me dio a lo largo del trabajo.

A los doctores Félix Jalón y Roberto Cao por su disposición en aclararme y refrescarme algunas nociones de la química de los compuestos de coordinación.

A la Dra. Olimpia Carrillo por el apoyo brindado tanto durante la solicitud de la beca como en los años posteriores.

A la Universidad de Castilla-La Mancha, y en particular al Dr. Arroyo Zapatero, al Dr. Antonio Otero y a María Ortueta del Vicerrectorado de Cooperación Internacional, así como a Inma y Ana de la OCI, por el apoyo brindado durante estos años y por haber hecho posible la culminación del trabajo mediante la concesión de un año de beca luego de haberse finalizado la beca de la AECl.

A los amigos que en muchos momentos me escucharon y supieron darme ánimo.

A mi esposa que sin su amor, apoyo, comprensión y consejos esta tesis no se hubiera terminado. No hay palabras con las cuales pueda agradecer su dedicación a esta tesis porque ha sido en todo momento un pilar no sólo en lo personal, sino también en lo profesional.

A mi hermano por cuidar de mis padres y quererme como me quiere.

Esta Tesis esta dedicada a mis padres porque gracias a ellos soy lo que soy. Han sido mi apoyo y mi ejemplo constante incluso a pesar de la distancia física que hemos tenido que sufrir en los últimos años.

A todos, muchísimas gracias.

RESUMEN

Las metalotioneínas constituyen una superfamilia de proteínas de bajo peso molecular (menos de 9 kD), ricas en residuos de cisteína, que le confieren una alta capacidad para enlazar iones metálicos. A pesar de que el primer miembro de esta gran familia fue descubierto en 1957, aún no se ha podido establecer con precisión el papel biológico de estas proteínas, existiendo muy pocos trabajos que hayan contribuido a esclarecer sus funciones en invertebrados.

El presente trabajo describe la caracterización de una nueva metalotioneína (MTPA) obtenida, por vía recombinante, a partir del hepatopáncreas de la langosta del Caribe *Panulirus argus*. Mediante RT-PCR semicuantitativa se analiza la expresión de MTPA en hepatopáncreas, intestino, tejido nervioso y músculo; detectándose mRNA de MTPA en todos los tejidos examinados, aunque la mayor expresión se observa en el hepatopáncreas. Estos resultados demuestran por primera vez la expresión de mRNA de metalotioneína en crustáceos, no sólo en tejidos digestivos, sino también en músculo y tejido nervioso. Adicionalmente, se analiza la inducción por Cd del mRNA de MTPA en explantes de diferentes tejidos de la langosta, observándose el mayor nivel de inducción en el tejido nervioso.

La secuencia aminoacídica de MTPA, deducida a partir del cDNA obtenido, tiene 59 aminoácidos y presenta homología con el resto de las secuencias de metalotioneínas de crustáceos conocidas. Curiosamente, MTPA tiene una cisteína extra (19 en total) en la región correspondiente al dominio C-terminal, en comparación con la mayoría de las metalotioneínas de crustáceos, lo cual podría implicar una mayor capacidad para unir metales. Sin embargo, como se demuestra por 2 técnicas diferentes de análisis (ESI-MS y TXRF), esta proteína une 6 iones Zn^{2+} , al igual que las metalotioneínas de crustáceos que presentan 18 cisteínas. Por homología con las estructuras de los dominios C-terminal de MT-1 de *Callinectes sapidus* (**1dmc**) y de la MT de *Homarus americanus* (**1j5l**), se muestra un modelo preliminar de la estructura tridimensional del dominio C-terminal de MTPA, en el cual la cisteína extra estaría orientada hacia el exterior y por tanto no formaría parte del "cluster" Zn-S.

Por otro lado, MTPA- Zn^{2+}_6 inhibe la cadena de transporte electrónico mitocondrial y, como consecuencia, aumenta los niveles intramitocondriales de ROS, mientras que TPA tiene un efecto contrario. A pesar de esto, MTPA ejerce un efecto protector contra el estrés oxidativo, ya que la estimulación de la producción de ROS por esta proteína, es mucho menor en comparación con la provocada por cantidades equivalentes de Zn^{2+} libre. El hecho de que MTPA afecta al consumo de oxígeno mitocondrial en hepatopáncreas de crustáceos constituye el primer estudio de este tipo en invertebrados y concuerda con otros resultados descritos en la literatura para

mamíferos, que sugieren una relación de las metalotioneínas con el metabolismo energético.

SUMMARY

Metallothioneins comprise a superfamily of low molecular weight (less than 9 kD) proteins, rich in cysteine residues, with a high capacity to bind metallic ions. Although the discovery of the first member of this big family took place in 1957, the precise biological role of these proteins has not yet been established and only a few works have contributed to clarify metallothioneins' functions in invertebrates.

This work describes the characterization of a new metallothionein (MTPA) obtained by recombinant technology from the hepatopancreas of the Caribbean spiny lobster *Panulirus argus*. MTPA expression was analyzed by semi-quantitative RT-PCR in hepatopancreas, intestine, nervous tissue and muscle. MTPA mRNA was detected in all the examined tissues, although the highest expression was observed in the hepatopancreas. These results constitute the first report of metallothionein mRNA expression in crustaceans, not only in digestive tissues, but also in muscle and nervous tissue. Additionally, the induction of MTPA mRNA by Cd in different tissue explants from the lobster was analyzed. The highest induction level was observed in the nervous tissue.

The MTPA aminoacidic sequence, deduced from the obtained cDNA, has 59 amino acids and shares homology with other crustacean metallothionein sequences. Interestingly, MTPA has an extra cysteine (19 in total) in the region corresponding to the C-terminal domain, compared to most crustacean metallothioneins, which could mean a higher binding capacity for metals. However, as it has been demonstrated by means of two different analysis techniques (ESI-MS and TXRF), this protein binds 6 Zn²⁺ ions akin to other crustacean metallothioneins that have 18 cysteines. Also, a preliminary model of the tridimensional structure of the C-terminal domain from MTPA, obtained by homology with the structures of the C-terminal domains from MT-1 of *Callinectes sapidus* (**1dmc**) and MT of *Homarus americanus* (**1j5l**), is proposed. In this model, the extra cysteine would be located to the outside and therefore would not constitute the Zn-S cluster.

On the other hand, MTPA-Zn²⁺₆ inhibits mitochondrial electron transport chain, increasing thereby ROS production, meanwhile TPA effects are the opposite. However, MTPA exerts a protective effect against the oxidative stress, because the stimulation of ROS production by this protein is smaller than the generated by equivalent quantities of free Zn²⁺. The fact that MTPA affects mitochondrial oxygen consumption in crustacean hepatopancreas constitutes the first report on this issue in invertebrates and agrees well with other results described in the literature for mammals that suggest a connection between metallothioneins and the energetic metabolism.

INDICE

RESUMEN.....	I
SUMMARY	III
INDICE	IV
ÍNDICE DE FIGURAS.....	IX
INDICE DE TABLAS.....	XII
ABREVIATURAS.....	XIII
I INTRODUCCIÓN.....	1
I.1 CARACTERÍSTICAS BIOLÓGICAS DE LA LANGOSTA <i>PANULIRUS ARGUS</i>	2
I.2 CARACTERÍSTICAS ESTRUCTURALES DE LAS METALOTIONEÍNAS. SU CLASIFICACIÓN....	3
I.3 FORMAS E ISOFORMAS DE METALOTIONEÍNA. REGULACIÓN DE SU EXPRESIÓN GÉNICA. 6	
<i>I.3.1 En mamíferos.....</i>	7
<i>I.3.2 En invertebrados y organismos unicelulares.....</i>	8
I.4 MODIFICACIONES POST-TRADUCCIONALES DE LAS METALOTIONEÍNAS. REGULACIÓN DE SU DEGRADACIÓN.....	9
I.5 REACTIVIDAD DE LAS METALOTIONEÍNAS.	10
<i>I.5.1 Unión a metales.</i>	10
<i>I.5.2 Reactividad de los grupos tioles.</i>	12
I.6 FUNCIONES DE LAS METALOTIONEÍNAS.	14
<i>I.6.1 Destoxificación de metales no esenciales.</i>	14
<i>I.6.2 Homeostasis de metales esenciales.</i>	15
<i>I.6.3 Protección frente al estrés oxidativo.</i>	17
<i>I.6.4 Influencia sobre la proliferación celular y la apoptosis.....</i>	21
<i>I.6.5 Relación con el metabolismo energético.....</i>	24
<i>I.6.6 Papel de las metalotioneínas en el sistema nervioso.</i>	25
I.7 EL ZINC EN LOS SISTEMAS BIOLÓGICOS.....	27
<i>I.7.1 Flujo intracelular de zinc.</i>	27
<i>I.7.2 Papel biológico del zinc.</i>	29
<i>I.7.3 Propiedades químicas del zinc que le confieren un importante papel biológico.</i>	
30	
I.8 FORMACIÓN MITOCONDRIAL DE ROS. EFECTO DE LOS INHIBIDORES DE LA CADENA RESPIRATORIA MITOCONDRIAL Y DE LOS DESACOPLANTES DE LA FOSFORILACIÓN OXIDATIVA SOBRE LA PRODUCCIÓN DE ROS.	31

I.8.1	<i>Defensas enzimáticas contra el estrés oxidativo.</i>	34
II	OBJETIVOS	36
III	MATERIALES Y MÉTODOS	38
III.1	MATERIALES.....	38
III.2	ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN.....	38
III.3	EXTRACCIÓN DE RNA.....	39
III.4	TRANSCRIPCIÓN INVERSA DE MRNA A cDNA.	40
III.5	REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).	40
III.6	AMPLIFICACIÓN DE LOS EXTREMOS 5' Y 3' DEL cDNA DE LA METALOTIONEÍNA DE <i>P. ARGUS</i> MEDIANTE LA TÉCNICA DE RACE (RAPID AMPLIFICATION CDNA ENDS).	43
III.7	ELECTROFORESIS DE LOS PRODUCTOS DE LA PCR Y CUANTIFICACIÓN DE LAS BANDAS....	45
III.8	PROCESO DE CLONAJE DE LOS PRODUCTOS DE LA PCR.	46
III.8.1	<i>Formación de los plásmidos recombinantes.</i>	46
III.8.2	<i>Transformación de las bacterias competentes.</i>	47
III.8.3	<i>Selección de los clones positivos.</i>	47
III.9	TRADUCCIÓN DE LAS SECUENCIAS NUCLEOTÍDICAS A SECUENCIAS AMINOACÍDICAS Y ANÁLISIS DE ÉSTAS.	48
III.10	EXPOSICIÓN A CADMIO DE EXPLANTES DE DISTINTOS TEJIDOS DE <i>P. ARGUS</i>	49
III.11	EXPRESIÓN RECOMBINANTE DE LA METALOTIONEÍNA DE <i>P. ARGUS</i> (MTPA).	50
III.11.1	<i>Obtención y clonaje de la región codificante del cDNA de MTPA</i>	50
III.11.2	<i>Subclonaje de la región codificante de MTPA en un plásmido de expresión.</i> 51	
III.11.3	<i>Expresión de MTPA con fines analíticos.</i>	53
III.11.3.1	Optimización de la concentración de IPTG para la inducción de la expresión.	
III.11.3.2	Cuantificación de la proteína de fusión GST-MTPA soluble.	54
III.11.4	<i>Expresión de MTPA con fines preparativos.</i>	55
III.11.5	<i>Purificación de MTPA.</i>	56
III.11.5.1	Cromatografía de afinidad en Glutati6n-Sepharosa 4B.....	56
III.11.5.2	Digesti6n de la prote6na de fusi6n GST-MTPA con trombina.....	56
III.11.5.3	Cromatograf6a en Sephadex G-50.	57
III.12	ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS EN GELES DE POLIACRILAMIDA.....	57
III.13	DETERMINACI6N DE LA CONCENTRACI6N DE PROTEÍNAS.	58
III.14	ANÁLISIS DE AMINOÁCIDOS.	58
III.15	DETERMINACI6N DEL COEFICIENTE DE EXTINCI6N MOLAR.....	59

III.16 OBTENCIÓN DE TPA.....	59
III.17 DETERMINACIÓN DE LA ESTEQUIOMETRÍA DE ZN UNIDO A MTPA.....	60
III.17.1 Espectrometría de Masas de Ionización por Electrospray (ESI-MS).....	60
III.17.2 HPLC-RP-ESI-MS.....	60
III.17.3 ESI-MS en modo directo.....	61
III.17.4 Técnica de Fluorescencia de Rayos X por Reflexión Total (TXRF).....	61
III.18 CONSTRUCCIÓN DE UN MODELO PRELIMINAR DE LA ESTRUCTURA TRIDIMENSIONAL DEL DOMINIO C-TERMINAL DE MTPA.	62
III.19 DETERMINACIÓN DEL EFECTO DE MTPA (TPA-ZN) Y DE SU FORMA APO (TPA) SOBRE LA RESPIRACIÓN DE MITOCONDRIAS DE HÍGADO DE RATÓN Y DEL HEPATOPÁNCREAS DE BOGAVANTE <i>H. AMERICANUS</i>	63
III.19.1 Obtención de mitocondrias acopladas de hígado de ratón.....	63
III.19.2 Obtención de mitocondrias acopladas de hepatopáncreas del bogavante <i>H. americanus</i>.....	63
III.19.3 Medición del consumo de oxígeno de mitocondrias de hígado de ratón y de hepatopáncreas de <i>H. americanus</i> en presencia de MTPA (TPA-Zn) ó TPA.....	64
III.20 DETERMINACIÓN DEL EFECTO DE MTPA (TPA-ZN) Y DE SU FORMA APO (TPA) SOBRE LA PRODUCCIÓN DE ROS (H ₂ O ₂) DE MITOCONDRIAS AISLADAS A PARTIR DEL HEPATOPÁNCREAS DE <i>H. AMERICANUS</i>	65
III.21 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	66
IV RESULTADOS.....	68
IV.1 AMPLIFICACIÓN DE FRAGMENTOS DE CDNA DE METALOTIONEÍNA A PARTIR DEL HEPATOPÁNCREAS.....	68
IV.2 OBTENCIÓN DE LA SECUENCIA COMPLETA DEL CDNA MEDIANTE LA TÉCNICA DE RACE.....	70
IV.3 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DEL MRNA DE MTPA EN DIFERENTES TEJIDOS MEDIANTE RT-PCR.....	75
IV.4 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DEL MRNA DE MTPA INDUCIDA POR Cd EN EXPLANTES DE TEJIDOS DE <i>P. ARGUS</i>	76
IV.5 OBTENCIÓN POR VÍA RECOMBINANTE DE LA METALOTIONEÍNA DE <i>P. ARGUS</i> (MTPA). 78	
IV.5.1 Clonaje de la región codificante del cDNA de MTPA.....	78
IV.5.2 Subclonaje de la región codificante del cDNA de MTPA en un plásmido de expresión. 79	79
IV.5.3 Expresión de MTPA con fines analíticos.....	80
IV.5.3.1 Optimización de la concentración de IPTG para la inducción de la expresión.	

IV.5.3.2	Cuantificación de la proteína de fusión GST-MTPA soluble.	82
IV.5.4	Purificación de MTPA (TPA-Zn) con fines preparativos.	83
IV.5.4.1	Cromatografía de afinidad en Glutación-Sepharosa 4B.....	83
IV.5.4.2	Cromatografía de exclusión molecular en Sephadex G-50.	84
IV.5.4.3	Análisis de las distintas fracciones del proceso de purificación mediante SDS-PAGE.	84
IV.6	ANÁLISIS DE AMINOÁCIDOS DE MTPA.	86
IV.7	DETERMINACIÓN DEL COEFICIENTE DE EXTINCIÓN MOLAR.	88
IV.8	OBTENCIÓN DE LA FORMA APO (TPA) DE MTPA.	89
IV.9	DETERMINACIÓN DE LA ESTEQUIOMETRÍA DE ZN UNIDO A MTPA.	89
IV.9.1	HPLC-RP-ESI-MS	90
IV.9.2	ESI-MS	103
IV.9.3	Técnica de Fluorescencia de Rayos X por Reflexión Total (TXRF).	105
IV.10 CONSTRUCCIÓN DE UN MODELO PRELIMINAR DE LA ESTRUCTURA TRIDIMENSIONAL DEL DOMINIO C-TERMINAL DE MTPA.	108
IV.11	DETERMINACIÓN DEL EFECTO DE MTPA (TPA-ZN) Y DE SU FORMA APO (TPA) SOBRE EL CONSUMO DE OXÍGENO DE MITOCONDRIAS DE HÍGADO DE RATÓN.	111
IV.12	DETERMINACIÓN DEL EFECTO DE MTPA (TPA-ZN) Y DE TPA SOBRE EL CONSUMO DE OXÍGENO DE MITOCONDRIAS DE HEPATOPÁNCREAS DE <i>H. AMERICANUS</i>	114
IV.13	DETERMINACIÓN DEL EFECTO DE MTPA (TPA-ZN) Y DE TPA SOBRE LA PRODUCCIÓN DE ROS (H ₂ O ₂) DE MITOCONDRIAS AISLADAS A PARTIR DEL HEPATOPÁNCREAS DE <i>H. AMERICANUS</i>	116
V	DISCUSIÓN.....	119
V.1	CARACTERIZACIÓN DEL CDNA DE LA METALOTIONEÍNA DE <i>P. ARGUS</i>	119
V.2	ANÁLISIS DE LA SECUENCIA AMINOACÍDICA DE LA METALOTIONEÍNA DE <i>P. ARGUS</i> ..	120
V.3	ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DEL MRNA DE MTPA EN DIFERENTES TEJIDOS DE <i>P. ARGUS</i>	123
V.4	ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DEL MRNA DE MTPA EN RESPUESTA A CADMIO EN EXPLANTES DE TEJIDO DE <i>P. ARGUS</i>	124
V.5	EXPRESIÓN POR VÍA RECOMBINANTE Y PURIFICACIÓN.	125
V.6	CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL DE MTPA	126
V.6.1	Determinación de la capacidad de unión de zinc de MTPA.	126
V.6.1.1	Análisis mediante ESI-MS.	127
V.6.1.2	Análisis mediante TXRF.....	129
V.6.2	Análisis espectrofotométrico.	129

V.6.3	<i>Predicción de la estructura tridimensional del dominio C-terminal de MTPA.</i>	
	130	
V.7	ESTUDIO DE LA FUNCIÓN DE MTPA EN LA MITOCONDRIA.....	132
V.7.1	<i>Determinación del efecto de MTPA (TPA-Zn) y de su forma apo (TPA) sobre el consumo de oxígeno de mitocondrias de hígado de ratón y del hepatopáncreas de la langosta H. americanus.</i>	132
V.7.2	<i>Determinación del efecto de MTPA (TPA-Zn) y de TPA sobre la producción de ROS (H₂O₂) de mitocondrias aisladas a partir del hepatopáncreas de H. americanus.</i>	
	138	
VI	CONCLUSIONES	146
VII	BIBLIOGRAFÍA	149

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Distribución geográfica de la langosta <i>P. argus</i> ..	2
Figura 2. Anatomía externa e interna de un crustáceo decápodo.	3
Figura 3. Esquema de la estructura terciaria de la metalotioneína de mamíferos..	5
Figura 4. Regulación de la expresión del gen de la metalotioneína en mamíferos..	8
Figura 5. Esquema del acoplamiento de GSH/GSSG con tioneína/MT a través de selenoles catalíticos.....	12
Figura 6. Ruta de reacción del NO con la metalotioneína..	14
Figura 7. Control de la homeostasis de metales esenciales por la metalotioneína a través de reacciones redox del enlace metal/sulfuro.....	16
Figura 8. Esquema de la función protectora potencial de las metalotioneínas en los sitios de inflamación.	20
Figura 9. Esquema general de las vías principales de la apoptosis.	22
Figura 10. Esquema del flujo de electrones y protones a través de los cuatro complejos de la cadena respiratoria mitocondrial..	32
Figura 11. Optimización del número de ciclos de la RT-PCR semicuantitativa.....	41
Figura 12. Esquema de la reacción de RACE (<i>Rapid Amplification cDNA Ends</i>)..	44
Figura 13. Esquema del plásmido pCR 4-TOPO con su sitio de policlonaje..	46
Figura 14. Mapa del plásmido pSTBlue-1..	51
Figura 15. Mapa general de un plásmido pGEX con el sitio de policlonaje del plásmido pGEX-4T-1..	52
Figura 16. Amplificación de un fragmento del gen de la metalotioneína a partir de RNA de hepatopáncreas mediante RT-PCR..	68
Figura 17. Digestión con la enzima de restricción <i>EcoRI</i> de los plásmidos recombinantes pCR 4-TOPO con el fragmento de MTPA.....	69
Figura 18. Productos de la reacción de RACE en la dirección 5' y 3'.....	71
Figura 19. Secuencia nucleotídica del cDNA de la metalotioneína de <i>P. argus</i> obtenida mediante solapamiento de las secuencias de los productos del RACE en ambas direcciones..	72
Figura 20. Comparación de la secuencia aminoacídica de la metalotioneína de <i>P. argus</i> con las secuencias aminoacídicas de las metalotioneínas de crustáceos determinadas hasta la fecha.....	74
Figura 21. Análisis de la expresión del mRNA de MTPA en diferentes tejidos de <i>P. argus</i> ..	75

Figura 22. Análisis de la expresión de MTPA en respuesta a cadmio en explantes de tejidos de <i>P. argus</i>	77
Figura 23. Digestión con la enzima de restricción <i>EcoRI</i> de los plásmidos recombinantes pSTBlue-1 con la región codificante de MTPA.....	78
Figura 24. Digestión con las enzimas de restricción <i>SalI</i> y <i>BamHI</i> de los plásmidos recombinantes pGEX-4T-1 con la región codificante de MTPA.....	80
Figura 25. Optimización de la inducción de la expresión de la proteína de fusión GST-MTPA por IPTG.....	81
Figura 26. Cromatograma representativo de la purificación de MTPA en Sephadex G-50, equilibrado en tampón Tris-HCl 10 mM pH 8.6.	84
Figura 27. Análisis por SDS-PAGE en Tris-Gly de las distintas fracciones del proceso de purificación.....	85
Figura 28. Análisis por SDS-PAGE en Tris-Tricina de las distintas fracciones del proceso de purificación.....	86
Figura 29. Cromatograma representativo de MTPA en Sephadex G-25, equilibrado en tampón NH ₄ Ac 20 mM pH 8.6.....	87
Figura 30. Cromatograma representativo de la purificación de TPA (forma apo) en Sephadex G-25, equilibrado en HCl 10 mM.....	89
Figura 31. Cromatogramas de TPA en HPLC-RP-ESI-MS.....	91
Figura 32. Ampliación de los cromatogramas de TPA en HPLC-RP-ESI-MS.....	92
Figura 33. Espectro UV del pico minoritario de la forma apo en HPLC-RP-ESI-MS.....	93
Figura 34. Espectro UV del pico mayoritario de la forma apo en HPLC-RP-ESI-MS....	94
Figura 35. Espectro de masas del pico minoritario de la forma apo en HPLC-RP-ESI-MS.....	95
Figura 36. Deconvolución del espectro de masas del pico minoritario de la forma apo en HPLC-RP-ESI-MS.....	95
Figura 37. Espectro de masas del pico mayoritario de la forma apo en HPLC-RP-ESI-MS.....	96
Figura 38. Deconvolución del espectro de masas del pico mayoritario de la forma apo en HPLC-RP-ESI-MS.....	97
Figura 39. Cromatogramas de MTPA en HPLC-RP-ESI-MS.....	98
Figura 40. Ampliación de los cromatogramas de MTPA en HPLC-RP-ESI-MS.....	99
Figura 41. Espectro de masas del pico mayoritario de la forma holo en HPLC-RP-ESI-MS.....	100
Figura 42. Deconvolución del espectro de masas del pico mayoritario de la forma holo en HPLC-RP-ESI-MS.....	101

Figura 43. Deconvolución del espectro de masas del pico minoritario de la forma holo en HPLC-RP-ESI-MS.....	102
Figura 44. Espectro de masas representativo de la forma apo en ESI-MS en modo directo.....	103
Figura 45. Espectro de masas representativo de la forma holo en ESI-MS en modo directo.....	104
Figura 46. Espectro de dispersión de energía por TXRF de MTPA, utilizando un tiempo de conteo de 500 s.	107
Figura 47. Modelo preliminar de la estructura tridimensional del dominio C-terminal de MTPA, construido por homología con las estructuras de los dominios C-terminal de MT-1 de <i>C. sapidus</i> y de la MT de <i>H. americanus</i>	109
Figura 48. Modelo preliminar de la estructura del dominio C-terminal de MTPA donde se muestra la distancia entre el S de la cisteína intermedia del triplete de cisteínas y los S de las cisteínas contiguas..	110
Figura 49. Esquema representativo del efecto de MTPA y TPA sobre la velocidad del consumo de oxígeno de mitocondrias de ratón.....	112
Figura 50. Efecto de MTPA y TPA sobre la velocidad del consumo de oxígeno iniciado por succinato -S- (estado 4), de mitocondrias de ratón.....	113
Figura 51. Efecto de MTPA y TPA sobre la velocidad del consumo de oxígeno iniciado por ADP -A- (estado 3), de mitocondrias de ratón.....	113
Figura 52. Efecto de MTPA y TPA sobre la velocidad del consumo de oxígeno iniciado por succinato -S- (estado 4), de mitocondrias de <i>H. americanus</i>	115
Figura 53. Efecto de MTPA y TPA sobre la velocidad del consumo de oxígeno iniciado por ADP -A- (estado 3), de mitocondrias de <i>H. americanus</i>	115
Figura 54. Efecto de MTPA, TPA y Zn ²⁺ sobre la formación de H ₂ O ₂ , determinado mediante la aparición de diclorodihidrofluoresceína (DCF), en mitocondrias de <i>H. americanus</i>	117
Figura 55. Esquema de la disposición de los enlaces metal-tiolato en los dominios β de las metalotioneínas de <i>H. americanus</i> y de mamíferos.....	121
Figura 56. Mecanismo de transferencia de electrones en el ciclo Q del Complejo III.. ..	140
Figura 57. Eliminación del H ₂ O ₂ mitocondrial a través del sistema de tiorredoxina.. .	142

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Comparación de las secuencias aminoacídicas de las metalotioneínas 1a, 2a y 3 humanas.....	26
Tabla 2. Localización de las principales fuentes mitocondriales de anión superóxido.	32
Tabla 3. Cebadores usados para el clonaje y el análisis de expresión del gen de MTPA.	41
Tabla 4. Análisis FASTA de MTPA con el resto de las metalotioneínas de crustáceos y las MTs 1a, 2a y 3 de humano.....	73
Tabla 5. Comparación entre la concentración de proteína determinada por el método de Bradford y la determinada por actividad de la GST, en lisados crudos de bacterias.....	82
Tabla 6. Cuadro resumen de un proceso de purificación representativo.....	83
Tabla 7. Análisis aminoacídico de MTPA.....	88
Tabla 8. Masas moleculares de MTPA (forma holo) y TPA (forma apo), y números de iones Zn^{2+} por molécula de MTPA, determinados por ESI-MS y HPLC-RP-ESI-MS.....	105
Tabla 9. Análisis semicuantitativo de los elementos presentes en MTPA, mediante TXRF.....	106
Tabla 10. Comparación de las estequiometrías Zn:MTPA determinadas por HPLC-RP-ESI-MS, ESI-MS y TXRF.....	107

ABREVIATURAS

ADP	adenosina 5'-difosfato
Ala	alanina
AMP	adenosina 5'-monofosfato
Asn	asparagina
ATP	adenosina 5'-trifosfato
β-ME	β-mercaptoetanol
BSA	albúmina de suero bovino
cDNA	ácido desoxirribonucleico complementario
col.	colaboradores
C-terminal	carboxilo-terminal
Cys	cisteína
D	daltons
DCF	diclorodihidrofluoresceína
DCFDA	diclorodihidrofluoresceína diacetato
DEPC	dietilpirocarbonato
DNA	ácido desoxirribonucleico
DNasa	desoxirribonucleasa
dNTPs	desoxirribonucleótidos trifosfato
DTNB	ácido 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzoico)
DTT	ditiotreitól
EDTA	ácido etilendiamino tetraacético
EGTA	ácido etilenglicol (aminoetil éter) tetraacético
FBS	suero fetal bovino
Gly	glicina
GSH	glutación reducido
GSSG	glutación oxidado
GST	glutación S-transferasa
GTP	guanosina 5'-trifosfato
Hepes	ácido (n-[2-hidroxietyl] piperazina-N'-[2-etano sulfónico])
HPLC-RP	cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa
Ile	isoleucina
IPTG	isopropil-β-D-tiogalactopiranosido
ISP	ferrosulfoproteína de Rieske
K_i	constante de inhibición
LB	medio de cultivo Luria-Bertani
Lys	lisina
Me	metal
MOPS	ácido 3-(N-morfolino) propanosulfónico

mRNA	ácido ribonucleico mensajero
MT	metalotioneína
MT-Cd	metalotioneína específica de cadmio
MT-Cu	metalotioneína específica de cobre
MTPA	metalotioneína de <i>Panulirus argus</i>
NADH	dinucleótido de nicotinamida
NADPH	dinucleótido fosfato de nicotinamida
NO	óxido nítrico
N-terminal	amino-terminal
PAGE	electroforesis en gel de poliacrilamida
pb	pares de bases
PBS	tampón fosfato salino
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
PEG	polietilenglicol
PMSF	fenil metil sulfonyl fluoruro
Pro	prolina
RMN	resonancia magnética nuclear
RNA	ácido ribonucleico
RNasa	ribonucleasa
RNasin	inhibidor de RNasa
ROS	especies reactivas de oxígeno
rpm	revoluciones por minuto
RT	transcriptasa inversa
SD	desviación estándar
SDS	dodecil sulfato sódico
Ser	serina
SNC	sistema nervioso central
SOD	superóxido dismutasa
TBE	Tampón Tris-borato EDTA
TE	tampón de ensayo
TH	tampón de homogeneización
Thr	treonina
TIM	“translocasa” de la membrana mitocondrial interna
TOM	“translocasa” de la membrana mitocondrial externa
TPA	apo-metalotioneína de <i>Panulirus argus</i>
Tris	tris (hidroximetil) aminometano
U	unidades
U.A.	unidades arbitrarias
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido

I. INTRODUCCIÓN

I INTRODUCCIÓN.

Las metalotioneínas constituyen una superfamilia de proteínas de bajo peso molecular (menos de 9 kD), ricas en residuos de cisteína, que le confieren una alta capacidad para enlazar iones metálicos.

El primer miembro de esta gran familia fue descubierto en 1957, cuando Margoshes y Vallee (1957) identificaron en corteza de riñón de caballo una proteína de unión a cadmio, responsable de la acumulación natural de cadmio en este tejido. Posteriormente fue demostrado que no sólo el cadmio es uno de los componentes metálicos que *in vivo* pueden unirse a esta proteína, sino que el zinc y el cobre también pueden ser enlazados (Pulido y col., 1966).

Desde entonces han sido encontradas metalotioneínas en todo el reino animal, en las plantas superiores, en los hongos, en microorganismos eucariontes e incluso en algunos procariontes (cianobacterias). Su concentración varía en las diferentes especies y tejidos, y es reflejo de diferentes factores como la edad, el estado de desarrollo embrionario, la dieta, la exposición a metales pesados y agentes estresantes, etc. Aunque es una proteína citoplasmática (Tsujikawa y col., 1994), puede acumularse en los lisosomas (Sternlieb, 1987), y migrar al núcleo (Cherian y Apostolova, 2000) o al espacio intermembrana de la mitocondria (Ye y col., 2001). También se ha encontrado metalotioneína extracelular en el plasma de mamíferos (Bremner y Mehra, 1991), en cultivos primarios de adipocitos (Trayhurn y col., 2000b) y en cultivos de células acinares del páncreas (de Lisle y col., 1996). Aunque hasta ahora no se han encontrado receptores de metalotioneína, sí se han descrito sitios de unión en cultivos primarios de astrocitos humanos (El Refaey y col., 1997).

A pesar de que el estudio de las metalotioneínas ha sido objeto de numerosas publicaciones desde 1957, aún no se ha podido establecer con precisión el papel biológico de estas proteínas. Entre las múltiples funciones que se les han atribuido, las más concretas y antiguas han sido las de intervenir en la captación, distribución, almacenamiento y liberación de metales esenciales (zinc y cobre), y en la detoxificación de metales pesados (cadmio fundamentalmente) (Hamer, 1986). Sin embargo, en los últimos años se ha encontrado que podrían estar involucradas en procesos tan diversos como la apoptosis (muerte celular programada), la regulación del crecimiento neuronal, la protección contra los radicales libres y otros agentes oxidantes, y la regulación del metabolismo energético.

Casi todos estos estudios han sido llevados a cabo en mamíferos o vertebrados superiores, existiendo muy pocos trabajos que hayan contribuido a

esclarecer las funciones de estas proteínas en invertebrados. Los trabajos más relevantes en éste sentido se han efectuado en gastrópodos terrestres (*Helix pomatia*, *Arianta arbustorum*) (Dallinger y col., 1997) y en el crustáceo *C. sapidus* (Brouwer y col., 1995, 2002). Estas especies son capaces de acumular distintos metales en diferentes tejidos en los cuales se expresan diferentes isoformas de la metalotioneína. De esta forma, pueden destoxificar eficientemente elementos trazas no esenciales, tales como el cadmio, y al mismo tiempo mantener la homeostasis de elementos trazas esenciales como el cobre. Estos escasos ejemplos conducen a la idea de que las metalotioneínas de invertebrados representan un buen modelo para entender mejor la multiplicidad de funciones de estas proteínas y su evolución dentro del reino animal.

I.1 Características biológicas de la langosta *Panulirus argus*.

La langosta *Panulirus argus* es un crustáceo decápodo perteneciente a la familia Palinuridae. Se conoce popularmente como langosta común o del Caribe, y en los países de habla inglesa se identifica como langosta espinosa (*spiny lobster*). Esta especie se distribuye geográficamente desde Carolina del Norte en EEUU hasta Brasil, a través del Mar Caribe y el Golfo de México (Fig. 1), constituyendo un recurso pesquero muy importante para los países de la región.



Figura 1. Distribución geográfica de la langosta *P. argus*. En rojo aparecen señaladas las costas donde su localización es muy probable.

El cuerpo de este animal, como el de todos los decápodos, se divide en dos partes claramente diferenciadas: el cefalotórax o cabeza y el abdomen o cola (Fig. 2). Los órganos internos se alojan principalmente en la cavidad cefalotorácica. El intestino recorre el cuerpo entero y está ensanchado en su parte anterior formando un estómago masticador provisto de dentículos quitinosos. En él desemboca el hepatopáncreas, encargado de la digestión y la reabsorción del alimento. Sobre el intestino se halla el corazón. A ambos lados del intestino están las gónadas. Los órganos excretores están situados junto a la base del segundo par de antenas. El sistema nervioso empieza en la cabeza y recorre el cuerpo entero en forma de cordón nervioso ventral (Mantel y Bliss, 1983).

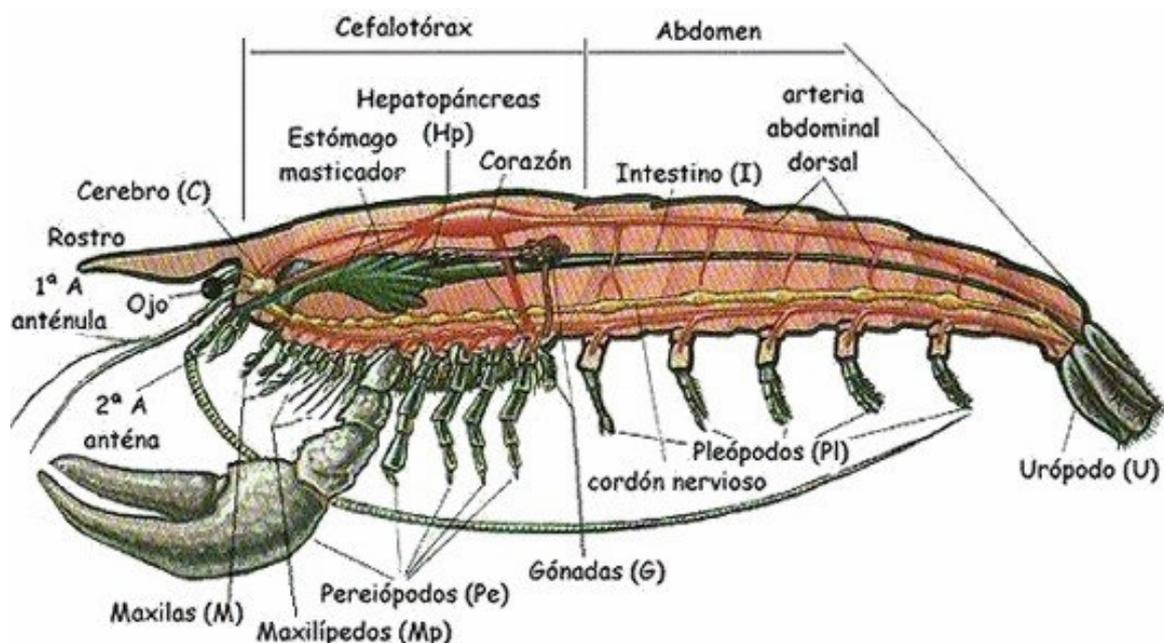


Figura 2. Anatomía externa e interna de un crustáceo decápodo.

I.2 Características estructurales de las metalotioneínas. Su clasificación.

La designación de metalotioneína se debe al alto contenido de metal y sulfuro de éstas proteínas, que en dependencia de la especie metálica enlazada podría representar hasta el 20 % de su peso (Fowler y col., 1987). El número de aminoácidos de las metalotioneínas varía desde 25 en algunos tipos de hongos, hasta 84 en las plantas; siendo en estas últimas, donde más variable es el número de residuos encontrados. Los aminoácidos aromáticos y la histidina están generalmente ausentes

y el número de cisteínas varía en dependencia de la especie, llegando a ser hasta 21 en determinados moluscos no-gastrópodos.

A pesar de estas diferencias, las metalotioneínas comparten un conjunto de características particulares en sus secuencias que le han permitido a Binz y a Kägi (1999) agruparlas en familias, subfamilias y subgrupos. Para ellos la inclusión de una metalotioneína dentro de una familia, presupone que la secuencia aminoacídica de ésta es alineable con todas las de los miembros de la familia. Así, existen 15 familias de metalotioneínas que guardan relación con la escala evolutiva (Binz y Kägi, 1999): la de vertebrados, la de moluscos, la de crustáceos, la de equinodermos, la de dípteros, la de nemátodos, la de los ciliados, 6 de hongos, la de procariontes y la de las plantas. Cada una de estas familias tiene un patrón específico de secuencia; por ejemplo, en los vertebrados se mantiene el patrón: K-x(1,2)-C-C-x-C-C-P-x(2)-C, mientras que los miembros de la familia de crustáceos comparten el patrón: P-[GD]-P-C-C-x(3,4)-C-x-C, localizado en el extremo N-terminal de la proteína.

La estructura tridimensional de la metalotioneína ha sido dilucidada mediante resonancia magnética nuclear y difracción de rayos X en numerosas especies de mamíferos (Otvos y Armitage, 1980; Furey y col., 1986; Arseniev y col., 1988; Messerle y col., 1990; Robbins y col., 1991; Zangger y col. 1999). En invertebrados, solo se conocen las estructuras tridimensionales de la metalotioneína-1 del cangrejo *C. sapidus* (Narula y col., 1995), del bogavante *H. americanus* (Zhu y col., 1994; Muñoz y col., 2002) y de la metalotioneína-A del erizo de mar *Strongylocentrotus purpuratus* (Riek y col., 1999). Todas estas estructuras muestran en común una proteína monomérica, compuesta por dos dominios estructurales, que constituyen un “cluster” metal-tiolato cada uno. La diferencia radica en el número de iones metálicos bivalentes que puede enlazar cada “cluster” de acuerdo al número de cisteínas que forman cada uno. En los mamíferos y el erizo de mar, cada “cluster” está formado por 9 residuos de cisteína en el dominio N-terminal (dominio β) y 11 en el dominio C-terminal (dominio α), que enlazan 3 y 4 iones bivalentes respectivamente (Fig. 3). Estos iones metálicos son coordinados en forma de tetraedro a través de enlaces con tiolatos terminales y puentes tiolatos. En las estructuras de crustáceos dilucidadas hasta ahora, ambos “cluster” están formados por 9 cisteínas que enlazan 3 iones bivalentes (6 en total) cada uno, al igual que los dominios β de mamíferos y de *S. purpuratus*.

En eucariontes unicelulares se han encontrado estructuras muy diferentes a las descritas anteriormente. Mientras que en *Neurospora crassa* (Malikayil y col., 1989) y *Saccharomyces cerevisiae* (Narula y col., 1993) se han caracterizado metalotioneínas

compuestas por un solo dominio estructural de unión a los iones metálicos, en *Tetrahymena pigmentosa* y *Tetrahymena pyriformis* (Piccinni y col., 1994) se han encontrado estructuras primarias con homología interna, capaces de formar dos o más dominios. Esto último ha sugerido que estas proteínas pueden haber surgido por duplicación de genes. Tales proteínas han sido consideradas por tanto formas primitivas a partir de las cuales surgieron probablemente los dominios existentes en las metalotioneínas de vertebrados e invertebrados (Boldrin y col., 2003).

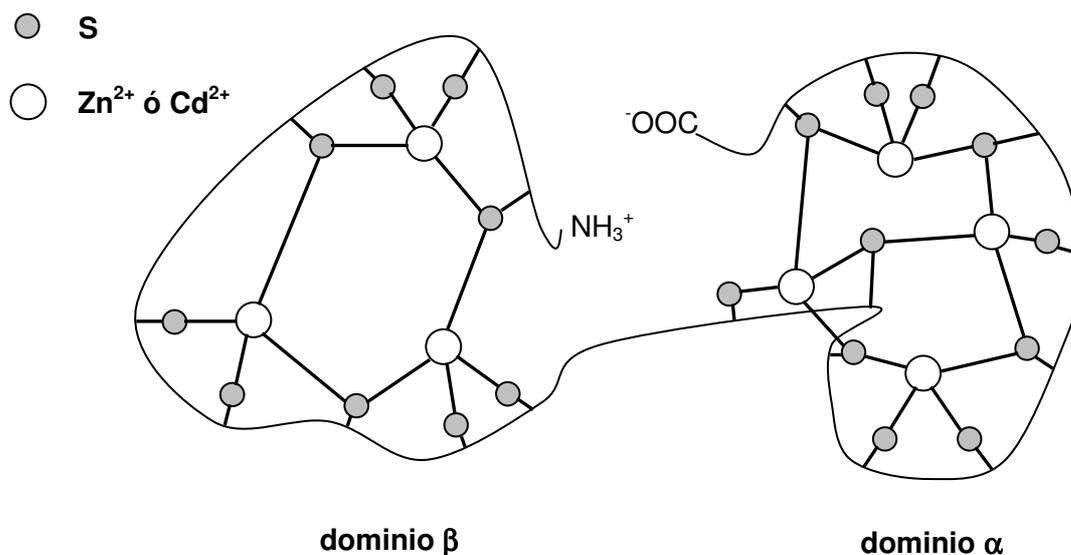


Figura 3. Esquema de la estructura terciaria de la metalotioneína de mamíferos. Existen 9 cisteínas en el dominio N-terminal (dominio β) que enlazan 3 iones Zn²⁺ y 11 cisteínas en el dominio C-terminal (dominio α), que enlazan 4 iones Zn²⁺.

En las metalotioneínas de bacterias es donde único se han encontrado “clusters” formados por grupos imidazoles de las histidinas además de los grupos tiolatos de las cisteínas. El núcleo inorgánico se parece bastante al del dominio α de las MT-1 y MT-2 de mamíferos, pero los 4 iones bivalentes son enlazados por 9 cisteínas y 2 histidinas (Blindauer y col., 2001; Robinson y col., 2001).

En cuanto a las especies metálicas enlazadas por cada “cluster”, de lo cual se hablará más adelante en el apartado I.5.1, Nielson y Winge (1985) demostraron utilizando péptidos sintéticos basados en las secuencias primarias de los dominios de las metalotioneínas de mamíferos, que el dominio β une tres iones bivalentes o seis iones monovalentes, mientras que el dominio α enlaza cuatro iones bivalentes o seis

iones monovalentes; aunque el número de iones Cu^+ enlazados por cada dominio a concentraciones saturantes del ión puede llegar a ser mayor según han demostrado posteriormente Merrifield y col. (2002) por espectrometría de masas. Las diferencias encontradas se deben a que en contraste con el tipo de coordinación tetraédrica de los iones bivalentes, los iones monovalentes son coordinados trigonal o digonalmente (Merrifield y col., 2002). En 1985, Winge y col. caracterizaron por primera vez una metalotioneína específica de cobre, a partir de cepas resistentes a cobre de *S. cerevisiae*. La síntesis de esta proteína fue inducida por cobre y la metalotioneína así obtenida contenía exclusivamente iones Cu^+ (8), aunque podía enlazar 4 iones bivalentes (Cd^{2+} o Zn^{2+}) por molécula. Desde entonces se han encontrado y caracterizado otras metalotioneínas específicas de cobre en el caracol de tierra *Helix pomatia* (Berger y col., 1997), en el cangrejo *C. sapidus* (Syring y col., 2000), en *Drosophila melanogaster* (Valls y col., 2000) y en *Tetrahymena pigmentosa* (Santovito y col., 2001). Además, recientemente Tío y col. (2004) han clasificado a la MT-4 de ratón como una metalotioneína específica de cobre, a partir de la caracterización estructural de la MT-4 nativa obtenida por vía recombinante en presencia de diferentes especies metálicas, y de sus formas reconstituidas por sustitución de metales. A excepción de MT-4, las metalotioneínas específicas de cobre comparten entre sí más similitud de secuencia aminoacídica que con las otras metalotioneínas de su familia o incluso de su misma especie, lo cual ha llevado a plantear a Valls y col. (2001) que quizás debería revisarse en los próximos años la clasificación actual en la medida que vayan surgiendo nuevas metalotioneínas específicas de cobre.

I.3 Formas e Isoformas de metalotioneína. Regulación de su expresión génica.

En general en todos los organismos donde ha sido encontrada la metalotioneína, esta proteína existe en dos formas: la forma enlazada al metal u holoproteína (MT) y la forma libre de metal o apoproteína (Apo-MT). Aunque la forma holo es la mayoritaria debido a que la forma apo es más susceptible a proteólisis (Miles y col., 2000), esta última se ha encontrado de forma transitoria en células tumorales bajo condiciones de deficiencia de Zn y de forma persistente en células tumorales independientemente de los niveles de Zn (Pattanaik y col., 1994; Theocharis y col., 2003).

I.3.1 En mamíferos.

En mamíferos se han encontrado hasta la fecha cuatro isoformas distintas de metalotioneína: MT-1, MT-2, MT-3 y MT-4; aunque en dependencia de la especie, pueden existir más de un tipo de la 1 y la 2. Por ejemplo, en humanos existen 13 isogenes de MT-1 (de los cuales al menos 7 son funcionales) y solo una isoforma 2 (MT-2a) (Cherian y col., 2003). En conejo existe solo una isoforma 1 y al menos 5 tipos de la isoforma 2 (Hunziker y col., 1995). Sin embargo en ratón, sólo existe un tipo de cada una (Searle y col., 1984). Las isoformas 1 y 2 han sido halladas en todos los órganos (con mayor abundancia en hígado, páncreas, intestino y riñón) (Palmiter, 1987), mientras que las isoformas 3 y 4 son expresadas principalmente en el cerebro (Palmiter y col., 1992; Tsuji y col., 1992) y en el epitelio escamoso estratificado respectivamente (Quaife y col., 1994). En hígado, páncreas, intestino y riñón de humanos, la isoforma 2a (MT-2a) a veces constituye más del 80% del total de metalotioneínas expresadas (Hunziker, 1991).

Tanto en humanos como en ratones los genes de metalotioneína están compuestos por 3 exones y dos intrones. El exón 1 cubre la región N-terminal del dominio β de la proteína. El exón 2 cubre el resto del dominio β , y el exón 3 todo el dominio α (Hamer, 1986).

La expresión de las metalotioneínas mejor estudiadas (MT-1 y MT-2) se regula a nivel transcripcional. Su expresión puede ser estimulada como respuesta a muchos factores como: metales (zinc y cadmio), hormonas (glucocorticoides, catecolaminas, glucagón), estímulos relacionados con la inflamación (citoquinas) y agentes estresantes (Davis y Cousins, 2000).

Las regiones promotoras de los genes *MT-1* y *MT-2* tienen muchos elementos respuesta que regulan la transcripción (Fig. 4). Estos incluyen:

1. Los elementos de respuesta a metal (*MRE*), los cuales son activados por el factor de transcripción que responde a metales (MTF-1): una proteína que se une al DNA mediante dominios con estructuras de *dedos de zinc* (Giedroc y col., 2001), y que además de por Zn, es activado por Cd (Chen y col., 2004).
2. Los elementos de respuesta a glucocorticoides (*GRE*) (Kelly y col., 1997).
3. Los elementos activados por proteínas *STAT* (transductoras de señales y activadoras de la transcripción) a través de la señalización de citoquinas (Davis y Cousins, 2000).
4. El elemento de respuesta antioxidante (*ARE*) que como su nombre indica responde al estado redox de la célula (Andrews, 2000).

Además se ha visto que la metilación de las regiones promotoras, una acción asociada a la supresión del crecimiento en células tumorales, podría suprimir la expresión de metalotioneína independientemente de la acción de los otros reguladores citados anteriormente (Davis y Cousins, 2000).

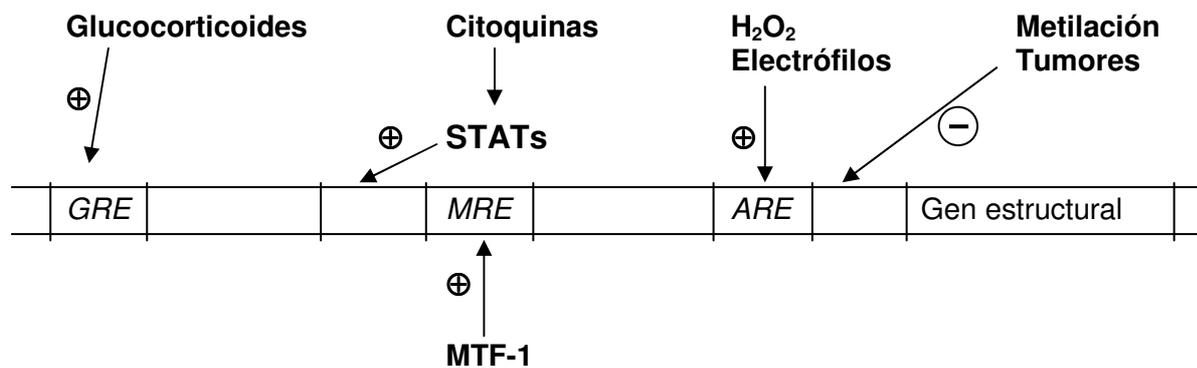


Figura 4. Regulación de la expresión del gen de la metalotioneína en mamíferos. *GRE* (elementos de respuesta a glucocorticoides), *MRE* (elementos de respuesta a metal) y *ARE* (elementos de respuesta a antioxidantes) constituyen sitios reguladores del promotor del gen de la metalotioneína. Las citoquinas activan la expresión de este gen a través de las proteínas STATs (transductoras de señales y activadoras de la transcripción) mientras que la metilación de la región promotora, en tejidos tumorales, inhibe su expresión.

Por otra parte, MTF-1 es a su vez regulado por un inhibidor sensible a los niveles de Zn. En ausencia de Zn, MTF-1 permanece unido a un inhibidor denominado MTI (Inhibidor de la transcripción de metalotioneína). En presencia de Zn, MTI se disocia de MTF-1, permitiendo que se una a las regiones promotoras *MRE* para activar la transcripción de metalotioneína. La recién sintetizada metalotioneína enlazaría entonces el Zn libre y se volvería a formar el complejo MTF-1/MTI hasta que se volviera a repetir el mismo ciclo (Palmiter, 1994; Klaassen y col., 1999).

1.3.2 En invertebrados y organismos unicelulares.

En invertebrados, al igual que en mamíferos, parece ser que existen dos o más isoformas de metalotioneína. Algunas de las especies examinadas así lo demuestran, aunque en un número considerable de especies aún solo se ha encontrado una isoforma por lo reciente que han sido los hallazgos.

En *C. sapidus*, por ejemplo, han sido encontradas tres isoformas de metalotioneínas: dos específicas de cadmio (isoformas-Cd) (MT-1 y MT-2) (Brouwer y col., 1995) y una específica de cobre (isoforma-Cu) (MT-3) (Brouwer y col., 2002). La expresión de ésta última se induce solamente por cobre (el zinc y el cadmio no inducen su expresión), mientras que la expresión de MT-1 y MT-2 se induce por zinc y cadmio. Además en el caso de MT-1 la expresión se induce también por cobre (Brouwer y col., 2002).

En *H. pomatia*, se ha encontrado una isoforma-Cd en el hepatopáncreas (Dallinger y col., 1993) y una isoforma-Cu en el manto (Berger y col., 1997). La concentración de la isoforma-Cd aumenta con el incremento de la concentración de cadmio en el hepatopáncreas, mientras que la expresión de la isoforma-Cu del manto no varía frente a concentraciones crecientes de cadmio en este tejido, pero se incrementa levemente al aumentar la concentración de cobre (Dallinger y col., 1997).

A pesar de las evidencias descritas anteriormente no se conoce la regulación a nivel transcripcional de las isoformas de metalotioneínas en estas especies ni en general en ninguna de las especies de invertebrados. En este sentido los hongos son el sistema mejor caracterizado y específicamente *S. cerevisiae*. En éste organismo, en el promotor del gen (*CUP1*) de la metalotioneína específica de cobre se han encontrado elementos que responden a los niveles de cobre a través del factor de transcripción ACE1 (Thiele, 1988), así como elementos de unión del factor de transcripción de choque térmico (HSF), del cual depende el aumento de la transcripción de *CUP1* en respuesta a choque térmico o carencia de glucosa (Tamai y col., 1994). Por otro lado Shinyashiki y col. (2000) han identificado al óxido nítrico (NO) como inhibidor del efecto estimulador del cobre sobre la expresión de *CUP1*, mediante la inhibición de la acción de ACE1.

La caracterización de los genes de metalotioneínas en invertebrados, se ha realizado solamente en *D. melanogaster*, encontrándose que están compuestos por dos exones y un intrón (Silar y col., 1990) al igual que en *Caenorhabditis elegans* (Freedman y col., 1993).

I.4 Modificaciones post-traduccionales de las metalotioneínas. Regulación de su degradación.

En mamíferos las regiones N-terminal de las metalotioneínas son generalmente bloqueadas por acetilación (Beattie y col., 1999). Esta modificación post-traducciona, probablemente no sea esencial para la exportación de estas proteínas, ya que tanto la

forma acetilada como la no acetilada han sido encontradas en niveles similares en el plasma de ratas recién nacidas (Theocharis y col., 2003).

En invertebrados se ha visto que la metionina del N-terminal puede perderse en el proceso post-traduccional. Así, en los cangrejos *Astacus astacus* (Pedersen y col., 1996), *Carcinus maenas* (Pedersen y col., 1994) y *C. sapidus* (Brouwer y col., 1995) se han encontrado isoformas que se diferencian solo en la metionina del N-terminal. En *C. maenas*, solo se encontró la isoforma carente de metionina en el N-terminal en dependencia de los niveles de exposición al Cd (Pedersen y col., 1994).

La degradación de metalotioneína es también un aspecto importante de su regulación. Mientras que la forma holo es degradada tanto en los compartimentos lisosomales como en los no-lisosomales (Chen y Failla, 1989; Klaassen y col., 1994), la forma apo es degradada fundamentalmente en los lisosomas (Klaassen y col., 1994) y es más susceptible a la degradación (Feldman y col., 1978). Estudios de titulación indican que al pH lisosomal, la mayoría del Zn es disociado de la metalotioneína mientras que la mayoría del Cd no lo está (McKim y col., 1992). Esta podría ser la razón de que MT-Cd tiene *in vivo* un tiempo de vida media mayor (3 días) que el de la MT-Zn (18-20 h) (Kershaw y Klaassen, 1992).

Por otro lado se ha visto que el tiempo de vida media de las metalotioneínas, no sólo se ve afectado por la especie metálica enlazada, sino también por la edad y el estado de desarrollo del organismo. Por ejemplo, se han encontrado diferencias entre el tiempo de vida media de metalotioneínas constitutivas de ratas adultas (aproximadamente 4 horas) con respecto a neonatos (aproximadamente 49 horas) (Kershaw y Klaassen, 1992). Además, durante el desarrollo fetal las concentraciones de MT-1 y MT-2 cambian dramáticamente. Las concentraciones de metalotioneína en hígado de ratas recién nacidas son 20 veces más altas que las encontradas en ratas adultas (Wong y Klaassen, 1979). Una posible explicación para esta diferencia es que durante el desarrollo la metalotioneína es localizada en el núcleo y por tanto no es susceptible a ser degradada por la "maquinaria" de degradación intracelular (Klaassen y col., 1994; Klaassen y col., 1999).

I.5 Reactividad de las metalotioneínas.

I.5.1 Unión a metales.

Aunque a partir de fuentes naturales las metalotioneínas son generalmente aisladas uniendo Zn^{2+} , Cd^{2+} y Cu^+ , se ha demostrado *in vitro* que otros iones metálicos pueden enlazarse a estas proteínas; estos son: Ag^+ , Au^+ , Bi^{3+} , Co^{2+} , Fe^{2+} , Hg^{2+} , Ni^{2+} ,

Pt²⁺ y Tc⁴⁺O (Romero-Isart y Vasak, 2002). Las constantes aparentes de afinidad para Zn²⁺ y Cd²⁺ han sido determinadas mediante técnicas espectrofotométricas y voltamétricas. Para la MT-2 de conejo, los valores obtenidos a pH neutro, están en el rango de (3.1–12)×10¹¹ M⁻¹ y (6-12.5)×10¹⁴ M⁻¹ para Zn²⁺ y Cd²⁺ respectivamente (Romero-Isart y Vasak, 2002). En el caso de la MT-3 humana se han obtenido valores cercanos a los obtenidos para la MT-2 de conejo: $K_{Zn} = 6.2 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$, $K_{Cd} = 2.0 \times 10^{14} \text{ M}^{-1}$ (Hasler y col., 2000). Existe un consenso en que la propiedad de las metalotioneínas de unir iones metálicos se debe a la presencia y distribución de residuos conservados de cisteína a lo largo de la cadena polipeptídica. Sin embargo, la sustitución de aminoácidos diferentes a la cisteína (lisina, aspártico y glutámico), en metalotioneínas recombinantes de mamíferos y en dominios sintéticos de metalotioneína de langosta, ha demostrado que dichos aminoácidos podrían contribuir en la propiedad de enlace (Cody y Huang, 1994; Pan y col., 1994; Yamasaki y col., 1997; Muñoz y col., 2000). De igual forma, estudios de mutagénesis dirigida en metalotioneínas de mamíferos y en sus dominios separados, han demostrado que el cambio de cisteínas por aminoácidos no-coordinantes tiene un efecto negativo sobre las propiedades de enlace (Cismowski y col., 1991 a y b), mientras que la sustitución de cisteínas terminales por histidinas, preserva la capacidad de enlace (Romero-Isart y col., 1999).

Por otro lado se ha visto que la unión de metales por las metalotioneínas es un proceso dinámico. Estudios de RMN han demostrado la existencia de un intercambio de metales inter- e intra-molecular con un tiempo de vida media de 0.5 s en los “cluster” de los dominios β de las metalotioneínas de mamíferos. En contraste, el intercambio de metales entre los dominios α ó entre los dominios α y β , resultó muy lento y no pudo ser medido (Romero-Isart y Vasak, 2002). Asimismo se ha visto que en solución, la MT-3 existe como una mezcla dinámica de múltiples metaloformas, que pueden enlazar más o menos iones bivalentes que las MT-1 y MT-2, a pesar de que la forma con 7 iones Zn²⁺ o Cd²⁺ enlazados es la predominante (Palumaa y col., 2002; Palumaa y col., 2005).

Las metalotioneínas aisladas a partir de fuentes naturales muestran una distribución no uniforme de zinc y cadmio entre los dos dominios. El zinc es unido preferentemente por el dominio N-terminal (dominio β) mientras que el cadmio se une de forma predominante al dominio C-terminal (dominio α) (Nettesheim y col., 1985; Robbins y col., 1991; Briggs y Armitage, 1982). De igual forma, Chen y col. (1996) demostraron que *in vitro* también el cadmio tiene preferencia por el dominio α , mientras que el cobre la tiene por el dominio β . Nettesheim y col. (1985) demostraron que por simple adición de Cd²⁺ a MT-Zn₇ o de Zn²⁺ a MT-Cd₇, no es posible generar la

distribución específica de zinc y cadmio que ha sido encontrada en las metalotioneínas aisladas a partir de fuentes naturales. Sin embargo, el intercambio intermolecular metal-metal, resultante luego de la mezcla de MT-Zn₇ y MT-Cd₇, conduce a la formación de la misma proporción de metales que la encontrada en las metalotioneínas de la naturaleza (Nettesheim y col., 1985).

I.5.2 Reactividad de los grupos tioles.

A pesar de que los grupos tioles de las metalotioneínas están enmascarados a través de sus interacciones con iones metálicos, estos grupos retienen un cierto grado de nucleofilia que les permite reaccionar con agentes alquilantes y oxidantes, tales como iodoacetamida y ácido 5,5'-ditio-bis-(2- nitrobenzoico) (DTNB), respectivamente (Shaw y col., 1991). Además, los "cluster" de zinc-tiolato pueden ser oxidados por agentes oxidantes suaves como glutatión oxidado (GSSG) o compuestos de selenio, liberando en este proceso el Zn enlazado (Jacob y col., 1998). Asimismo, se ha demostrado que el par redox GSH/GSSG puede acoplarse eficientemente con el sistema MT/tioneína en presencia de selenoles (Chen y Maret, 2001) (Fig. 5) y que la metalotioneína es capaz de reducir al citocromo c, liberando Zn en el proceso (Simpkins y col., 1993). Al reaccionar la metalotioneína con éstos agentes oxidantes, sus grupos tioles se oxidan formando puentes disulfuro intra- e inter-moleculares, que luego pueden ser reducidos para formar la forma apo de la proteína (Savas y col., 1993; Gopalakrishna y col., 1997; Maret y Vallee, 1998; Chen y Maret, 2001).

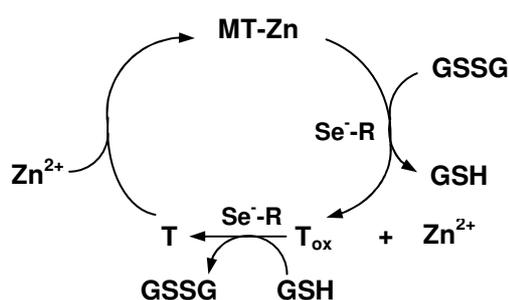


Figura 5. Esquema del acoplamiento de GSH/GSSG con tioneína/MT a través de selenoles catalíticos.

Por otro lado se ha encontrado una diferencia de reactividad entre los grupos tioles de dominios diferentes. Mediante estudios cinéticos y de espectrometría de

masas se ha demostrado que las reacciones preferidas de las metalotioneínas de mamíferos con agentes electrofílicos, desde un punto de vista cinético, pueden ocurrir tanto en el dominio α como en el β , en dependencia del agente específico. Así por ejemplo, se ha encontrado que mientras que iodoacetamida y *p*-(hidroximercurio) benzoato reaccionan preferentemente con el dominio β , los agentes terapéuticos aurotiomalato, melfalán y clorambucilo, reaccionan preferentemente con el dominio α (Yu y col., 1995; Zaia y col., 1996; Muñoz y col., 1999). En el caso del DTNB, se han obtenido resultados contradictorios, ya que mientras que Muñoz y col. (1999) encontraron que reaccionaba más rápido con el dominio α , Jiang y col. (2000) demostraron lo contrario analizando cada dominio por separado. En este contexto hay que señalar que estudios con modelos inorgánicos, han establecido que la reactividad selectiva de un tiolato, en un sitio de enlace multitiolato, puede ser controlada por las diferencias en el pK_a del tiol (Hammes y Carrano, 2001).

Estudios comparativos con diferentes isoformas de metalotioneína indican que la reactividad cinética de MT-3-Zn₇ con DTNB, es parecida la de MT-1-Zn₇ (Sewell y col., 1995). Sin embargo, esta reacción ocurre más rápido en el caso de la metalotioneína de *H. americanus*, en comparación con las isoformas de mamíferos, lo cual refleja la influencia de la topología del “cluster” y/o de la cadena polipeptídica de alrededor sobre la reactividad de los residuos de cisteína (Romero-Isart y Vasak, 2002). Además se ha visto que tanto el ATP como el ADP aceleran la reacción con el DTNB (Kangur y Palumaa, 2001).

Otro aspecto interesante de la reactividad de las metalotioneínas es su capacidad de reaccionar con especies de radicales libres. En este sentido ha sido demostrado que las isoformas de mamíferos (tanto con 7 Zn²⁺ como con 7 Cd²⁺) y la MT-Cu₇ de levadura son eficientes “scavengers” de radicales libres tales como hidroxilo (OH·), superóxido (O₂⁻·) (Felix y col., 1993), u óxido nítrico (NO) (Aravindakumar y col., 1999; Hartmann y Weser, 2000; Montoliu y col., 2000). En todos los casos, el ataque del radical libre ocurre sobre los tiolatos unidos al metal, provocando la oxidación y/o modificación de la proteína (Fig. 6). Curiosamente, estos efectos pueden ser revertidos bajo condiciones reductoras y en presencia del ión metálico apropiado (Hartmann y Weser, 2000).

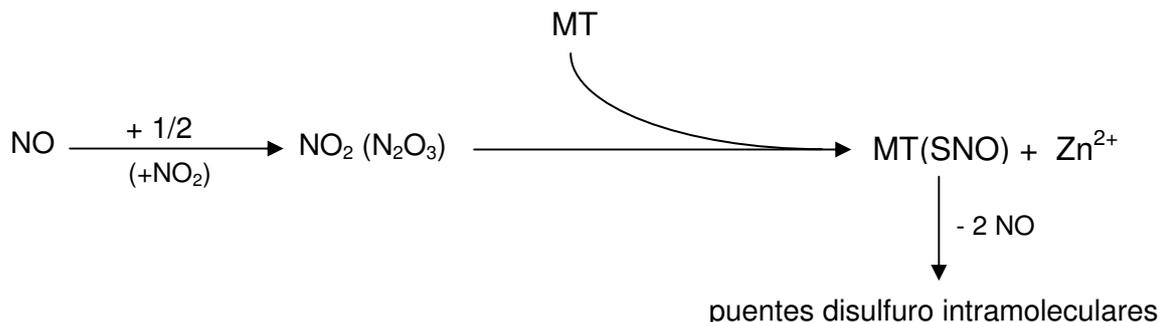


Figura 6. Ruta de reacción del NO con la metalotioneína.

Por otro lado, estudios recientes sobre las consecuencias estructurales de la interacción entre las metalotioneínas y el NO, mediante espectroscopía de RMN, revelaron que la exposición de MT-1-Cd₇ de ratón a NO llevó a una liberación selectiva de todos los iones metálicos (3) del dominio β N-terminal de la proteína, mientras que no tuvo lugar la liberación de los 4 iones metálicos del dominio α. Además se demostró la formación concomitante de puentes disulfuro en el dominio β de la proteína (Zangger y col., 2001a).

I.6 Funciones de las metalotioneínas.

La función mejor establecida para las metalotioneínas es su importancia en la detoxificación de metales no esenciales (cadmio fundamentalmente), aunque además se cree que pueden intervenir en la homeostasis de metales esenciales, en la protección frente al estrés oxidativo, en la proliferación celular y la apoptosis, en la regulación del metabolismo energético, y en la regeneración y protección del sistema nervioso.

I.6.1 Destoxificación de metales no esenciales.

Las concentraciones excesivas de iones metálicos esenciales, como cobre y zinc, e iones metálicos no esenciales, como cadmio y mercurio, pueden ser tóxicas tanto a niveles celulares, como de tejidos o de órganos. La mayoría de los organismos usan mecanismos celulares redundantes para limitar la toxicidad de los iones metálicos. Estos mecanismos de detoxificación no son específicos para la especie metálica en cuestión, ya que son usados para eliminar una variedad de metales. Los

iones metálicos esenciales pueden ser exportados de la célula mediante la acción de ATPasas, pero los iones metálicos no esenciales no pueden ser eliminados de esta forma y se acumulan en las células enlazados a metalotioneínas o dentro de vesículas (Dameron y Harrison, 1998).

La retención de metales es específica de tejido. En mamíferos este proceso puede causar patologías (Dameron y Harrison, 1998), mientras que en la mayoría de los moluscos y crustáceos es un proceso fisiológico normal conocido como bioacumulación. Esta propiedad excepcional de concentrar metales pesados en el hepatopáncreas y en las agallas ha sido a menudo usada como indicador de la contaminación ambiental. Sin embargo, muchos factores tales como el peso del animal, la edad, el sexo, la temperatura y la salinidad pueden influir sobre este proceso (Dallinger, 1994).

El papel de la metalotioneína en la disposición de cadmio, ha sido examinado en ratones transgénicos que sobreexpresan esta proteína y en ratones *knock-out* que no la expresan. Usando el primer modelo, se observó que la metalotioneína no inhibe la absorción intestinal de Cd (Liu y Klaassen, 1996). Por otro lado, estos ratones transgénicos que presentan unos niveles de metalotioneína en el hígado 10 veces más altos que el de los controles (Iszard y col., 1995), son resistentes a la hepatotoxicidad inducida por Cd (Liu y col., 1995). En contraste, los ratones *knock-out* del gen de la metalotioneína, muestran una mayor susceptibilidad, con respecto a los controles, a la letalidad y daños hepáticos inducidos con Cd (Masters y col., 1994a).

El papel de la metalotioneína en la detoxificación de mercurio parece ser menos importante, ya que si bien hay estudios que evidencian un vínculo en este sentido (Sato y col., 1997; Liu y col., 2003), parece ser que *in vivo* este metal se asocia fundamentalmente al selenio (Das y col., 2000; Arai y col., 2004)

I.6.2 Homeostasis de metales esenciales.

El hierro es el metal más abundante en humanos. Si no considerásemos la cantidad de éste enlazada a la hemoglobina, sería entonces el zinc el metal de transición más abundante (Vasak y Hasler, 2000). Los iones zinc han sido identificados como componentes catalíticos de muchas enzimas y juegan un papel estructural en numerosas proteínas y factores de transcripción (*dedos de zinc*) (Berg y Shi, 1996; apartado I.7). Sin embargo, si su concentración aumenta excesivamente, podría interferir con otros procesos dependientes de metales (calcio particularmente)

(Csermely y col., 1989) y desencadenar apoptosis no deseada, provocando estados patológicos (apartado I.6.4).

En este sentido, los “clusters” Zn-sulfuro de la metalotioneína juegan un papel muy importante en la regulación de los niveles intracelulares de zinc. Estos “clusters” operan a través de un mecanismo que permite que los sulfuros de la cisteína ligados a zinc, sean oxidados o reducidos (por ejemplo por el par GSSG/GSH como se describió en el apartado anterior), con la consiguiente liberación o enlace de zinc respectivamente (Fig. 7). De esta forma el estado redox de la célula es la fuerza que controla la mayor o menor liberación de zinc. Un aumento de las condiciones oxidantes provoca mayor liberación de zinc mientras que un aumento de las condiciones reductoras incrementa su enlace (Fig. 7) (Maret, 2000).

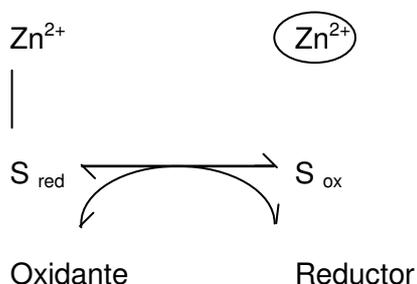


Figura 7. Control de la homeostasis de metales esenciales por la metalotioneína a través de reacciones redox del enlace metal/sulfuro.

Sin embargo, hay que destacar que bajo condiciones fisiológicas la concentración de GSH en el citoplasma es de 40 a 100 veces mayor que la de GSSG (Chen y Maret, 2001), por lo que otros factores deben intervenir en este mecanismo. Por ejemplo, compuestos como los selenoles que catalizan la oxidación de la metalotioneína por pequeñas cantidades de GSSG (apartado I.5.2), o especies reactivas de oxígeno, cuya generación transitoria podría cambiar el ambiente redox (Chen y Maret, 2001). En este sentido, se ha visto que la relación MT/apo-MT puede regular la homeostasis de Zn en respuesta a los eventos de señalización que involucran óxido nítrico (NO) (St Croix y col., 2002) por lo que la metalotioneína podría actuar en la cascada de señalización biológica, activando respuestas celulares dependientes de metal (Theocharis, 2003).

De esta forma, la metalotioneína pueda actuar como un dador de Zn y a la vez su forma apo como aceptor de Zn, a pesar de que la afinidad por el Zn de la mayoría

de enzimas estudiadas es alrededor de 1000 veces mas baja que la de la metalotioneína (Jacob y col., 1998).

De la misma manera puede controlarse la liberación o enlace del cobre, que además de ser un elemento catalítico de muchas enzimas, es un componente estructural y funcional de la hemocianina, la proteína responsable del transporte de oxígeno en la mayoría de los artrópodos y los moluscos (van Holde y Miller, 1995). De ahí que en estas especies exista un metabolismo activo de este metal en el que juegan un papel muy importante las cobre-metalotioneínas.

La metalotioneína podría ser importante en la homeostasis de metales esenciales, regulando además su absorción. El papel de la metalotioneína en la absorción intestinal de Zn fue reevaluado por Davis y col. (1998) usando tanto ratones transgénicos que sobreexpresaban MT-1, como ratones *knock-out* que tenían silenciado los genes de MT-1 y MT-2. Al cabo de las dos horas de haberles suministrado una dosis oral única de Zn a estos animales, las concentraciones séricas de Zn fueron 2.3 veces más altas en los ratones *knock-out*, y un tercio en los ratones transgénicos, con respecto a los controles, lo cual sugiere que la metalotioneína reduce la absorción intestinal de Zn. Este efecto ya había sido descrito anteriormente por Hoadley y col. (1988), quienes concluyeron que la metalotioneína en el intestino podría actuar como un atrapador de zinc que facilitaría el retorno de este ión al lumen.

Sin embargo, los ratones *knock-out* del gen de la metalotioneína son aparentemente normales, lo cual cuestiona que la metalotioneína pueda tener un papel crucial en la homeostasis de Zn, un metal imprescindible para el crecimiento y desarrollo de los animales. No obstante, la normal apariencia de estos ratones podría deberse a la presencia de sistemas secundarios de emergencia y por tanto no puede concluirse que la metalotioneína no intervenga en la homeostasis de Zn (Klaassen y col., 1999). De hecho, cuando se suministró una dosis tóxica de Zn a ratones *knock-out* del gen de la metalotioneína, se observó que tenían una mayor incidencia de degeneración de las células acinares del páncreas en comparación con los ratones controles (Kelly y col., 1996).

I.6.3 Protección frente al estrés oxidativo.

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) comprenden una variedad de moléculas tales como peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y radicales libres (especies químicas con un electrón desapareado) derivados a partir del oxígeno molecular como hidroxilo ($OH\cdot$), superóxido ($O_2^{\cdot-}$) y radicales NO (Turrens, 2003). En las células

no-fagocíticas, las ROS se forman fundamentalmente durante la respiración mitocondrial, de lo cual se hablará en el apartado I.8, aunque también se pueden generar debido a la acción de varios sistemas enzimáticos extramitocondriales, como por ejemplo, la NADPH-oxidasa de membrana plasmática, la xantina-oxidasa de citosol, la citocromo P450-oxidasa de peroxisomas, etc. (Gamaley y Klyubin, 1999).

La función fisiológica de las ROS no se conoce con exactitud, aunque resultados recientes indican que podrían jugar un papel en la señalización intracelular (Droge, 2002), en la defensa contra patógenos, en la proliferación celular y en la apoptosis (Davis y col., 2001).

El estado de óxido-reducción de la célula es consecuencia de un balance entre los niveles de los agentes oxidantes y los reductores. Por tanto, el incremento incontrolado de los ROS frente a defensas antioxidantes limitadas, provocaría un estado conocido como “estrés oxidativo” (Turrens, 2003). En este estado se generan reacciones en cadena, mediadas por radicales libres, que afectan indiscriminadamente a las proteínas (Stadtman y Levine, 2000), los lípidos (Rubbo y col., 1994), los polisacáridos (Kaur y Halliwell, 1994) y el DNA (LeDoux y col., 1999). También pueden ocurrir activaciones sostenidas de cascadas de señalización, así como expresión de determinados genes, que induzcan apoptosis (Davis y col., 2001). De esta manera, el estrés oxidativo se ha relacionado con una gran variedad de estados patológicos como son el cáncer (Brown y Bicknell, 2001), la inflamación (MacNee, 2001), las enfermedades neurodegenerativas (Jenner, 2003), la toxicidad de algunas drogas (Davis y col., 2001), etc.

Para protegerse del estrés oxidativo las células han desarrollado dos importantes sistemas de defensa: un conjunto de proteínas pequeñas con grupos sulfhidrilos activos desde el punto de vista redox (ej: glutatión y tioredoxina); y sistemas enzimáticos como la superóxido dismutasa, la catalasa y la glutatión peroxidasa (Nakamura y col., 1997).

Debido al alto contenido de residuos de cisteína que presentan las metalotioneínas, sería razonable suponer que estas proteínas podrían funcionar como potentes “atrapadores” o “scavengers” de ROS (apartado I.5.2). De esta forma las metalotioneínas podrían actuar como agentes anti-oxidantes en estados de estrés oxidativo, e incluso, intervenir en las cascadas de señalización biológicas mediadas por las ROS (St Croix y col., 2002; Theocharis, 2003).

El papel anti-oxidante de las metalotioneínas fue demostrado *in vivo* por primera vez en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, al interrumpir el gen que codifica para la superóxido-Cu,Zn dismutasa (SOD1), una enzima que participa en la

protección de las células de la toxicidad del oxígeno (Tamai y col., 1993). Dicha interrupción provocó varios defectos en el crecimiento e incapacidad para crecer en placas de agar con lactato como fuente de carbono. Sin embargo, estas anomalías fueron eliminadas sobreexpresando MT-Cu de levadura o MT-1 de mono en las células SOD1-deficientes (Tamai y col., 1993). Aunque la MT-Cu de levadura y la MT-1 de mamíferos no tienen homología estructural, estas pueden complementarse funcionalmente. De forma similar a los trabajos de Tamai y col. (1993) en levaduras, en los ratones *knock-out* del gen de la superóxido-Cu,Zn dismutasa, los niveles de MT-1 y MT-2 son 10 y 12 veces mayores respectivamente con respecto a los niveles de los ratones controles (Ghoshal y col., 1999), lo cual podría ser la causa de las características aparentemente normales de estos ratones. Estos datos demuestran claramente que las metalotioneínas de mamíferos y levaduras juegan un papel directo en la defensa celular contra el estrés oxidativo, actuando como antioxidantes (Theocharis y col., 2003).

En mamíferos, la actividad de las metalotioneínas como “atrapadores” de radicales libres, fue demostrada por primera vez en células madres embrionarias carentes de los genes MT-1 y MT-2. Estas células son altamente sensibles a agentes generadores de radicales libres tales como: t-butilo hidroperóxido, t-butilo hidroquinona y paraquat (Lazo y col., 1995). Sin embargo, la sobreexpresión de MT-1 las hace resistentes a estos agentes (Pitt y col., 1997).

Otra evidencia del papel protector de la metalotioneína frente al estrés oxidativo, la constituyen los experimentos en cultivos de células de corazón de ratón (Kang y col., 1997). La sobreexpresión de MT-2A humana en estas células disminuyó la citotoxicidad causada por especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno, y atenuó marcadamente la oxidación de moléculas reporteras como diclorofluoresceína y ácido cis-parinárico (Lazo y col., 1998). Contrariamente, en células derivadas de ratones deficientes de los genes MT-1 y MT-2, se observó un incremento de la oxidación intracelular. Sin embargo, los niveles de glutatión reducido (GSH) encontrados en estas células fueron similares a los encontrados en células normales, lo cual sugiere que el papel antioxidante de la metalotioneína es independiente del GSH (Lazo y col., 1998).

Por otro lado, se ha demostrado que la metalotioneína tiene un efecto protector contra la acción citotóxica del NO (Schwarz y col., 1995; Theocharis y col., 2003). Ejemplo de ello lo constituye la prevención por MT-3 de la neurotoxicidad provocada por NO en cultivos primarios de neuronas (Montoliu y col., 2000). Además en los sitios de inflamación, algunos de los estímulos que inducen la expresión de MT-1 y de MT-2

(ej: TNF- α e IL-1), causan además la inducción de la NO sintasa (NOS), resultando en una producción de NO que podría ser “atrapado” por la metalotioneína con una liberación concomitante de Zn. La liberación de Zn podría suprimir la posterior expresión y actividad de la NOS, cerrándose el ciclo de un mecanismo sugerido por Zangger y col. (2001a) para explicar como la metalotioneína podría actuar como agente anti-inflamatorio (Fig. 8).

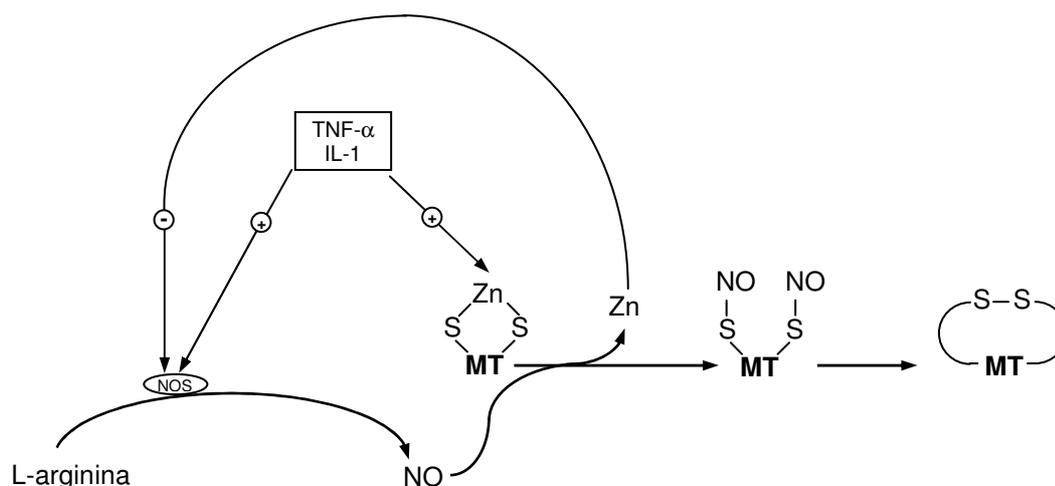


Figura 8. Esquema de la función protectora potencial de las metalotioneínas en los sitios de inflamación.

En invertebrados, el papel antioxidante de la metalotioneína ha sido demostrado tanto a nivel celular como a nivel de organismo en el mejillón *Mytilus galloprovincialis*. Viarengo y col. (1999) demostraron que la inducción de metalotioneína en estos animales, como consecuencia de una pre-exposición a Cd, abolió el incremento en la producción de ROS inducido por un tratamiento con Fe en extractos de la glándula digestiva, y por un tratamiento con H₂O₂ en células aisladas de la misma glándula. Además, los animales pre-tratados con Cd presentaron un porcentaje de supervivencia mayor frente a un estrés oxidativo generado por Fe. La resistencia dependiente de Cd frente al estrés oxidativo se asoció sólo al incremento de los niveles de metalotioneína, ya que otros sistemas de defensa anti-oxidantes (glutación reducido, catalasa, superóxido dismutasa y glutación peroxidasa) no sufrieron cambios. Si bien en esta especie es donde mejor se ha estudiado el papel antioxidante de las metalotioneínas en invertebrados, existen otros trabajos que hacen referencia al posible papel protector de estas proteínas frente al estrés oxidativo, luego

de una exposición a metales (Geret y col., 2002; Romero-Ruiz y col., 2003; Geracitano y col., 2004).

A pesar de todas las evidencias mencionadas arriba, que indican que la metalotioneína es un agente clave en la protección contra el estrés oxidativo, los mecanismos moleculares mediante los cuales se ejerce esta función aún no han sido dilucidados. Quesada y col. (1996) demostraron que en células HL-60 el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) puede reaccionar de forma directa con los grupos sulfidrilos de MT-Zn. Estos resultados unidos a los experimentos *in vitro* descritos en el apartado I.5.2, sugieren que uno de los mecanismos moleculares mediante el cual la metalotioneína podría proteger contra el estrés oxidativo, es reaccionando directamente con las ROS, aunque también la liberación concomitante de Zn podría activar respuestas celulares dependientes del metal (Theocharis, 2003).

I.6.4 Influencia sobre la proliferación celular y la apoptosis.

La apoptosis es una muerte celular programada, que está involucrada en numerosos procesos fisiológicos tales como la embriogénesis (Schutte y Ramaekers, 2000), la selección linfocitaria en el timo (Treves y col., 1994), la involución de la glándula mamaria después de un período de lactancia (Marti y col., 2000), etc. Este tipo de muerte celular es necesario para el desarrollo normal y la homeostasis de todos los organismos, tanto multicelulares como unicelulares (Horvitz, 1999; Lewis, 2000; Frohlich y Madeo, 2000). Sin embargo, su falta de regulación puede conducir a muchos procesos patológicos tales como el cáncer (Thompson, 1995), el SIDA (Ameisen y Capron, 1991) y desórdenes neurodegenerativos (Sastry y Rao, 2000).

En síntesis, se han descrito dos vías principales que conducen a la apoptosis: la vía extrínseca (o de receptores de muerte de la superficie celular) y la intrínseca (o de estrés). Las señales extracelulares de apoptosis, como la del factor de necrosis tumoral ($TNF-\alpha$) o la del ligando Fas (Fas-L), se transmiten vía caspasa-8, mientras que las de daños intracelulares (aumento de ceramida, ROS y calcio, entre otros), lo hacen a través de la liberación de citocromo *c* y ATP por la mitocondria, activando la caspasa 9 (Fig. 9). Tanto la caspasa 8 como la 9 activan la caspasa 3, y ésta a su vez, es la responsable de activar/degradar numerosas proteínas claves para la vida celular, resultando en la degradación del DNA y la muerte celular. Además de las proteasas, y otras enzimas como quinasas y fosfatasa, ambas vías de apoptosis dependen de la presencia de cofactores como el AMP cíclico, el GTP y los iones metálicos como el calcio, el magnesio y el zinc (Seve y col., 2002).

Se ha demostrado que el atrapamiento de Zn intracelular conduce a la apoptosis. En particular, se produce la activación de la caspasa 3 sin una activación de las caspasas 8 y 9. En este sentido se ha propuesto que los IAPs (*inhibitor of apoptosis proteins*) impiden el proceso apoptótico al interactuar con la caspasa 3 a través de dominios BIR. Dichos dominios unen zinc, lo cual hace suponer que el atrapamiento de zinc provocaría una desinhibición de la caspasa 3 y desencadenaría la muerte celular (Chimienti y col., 2001; Shindler y col., 2000).

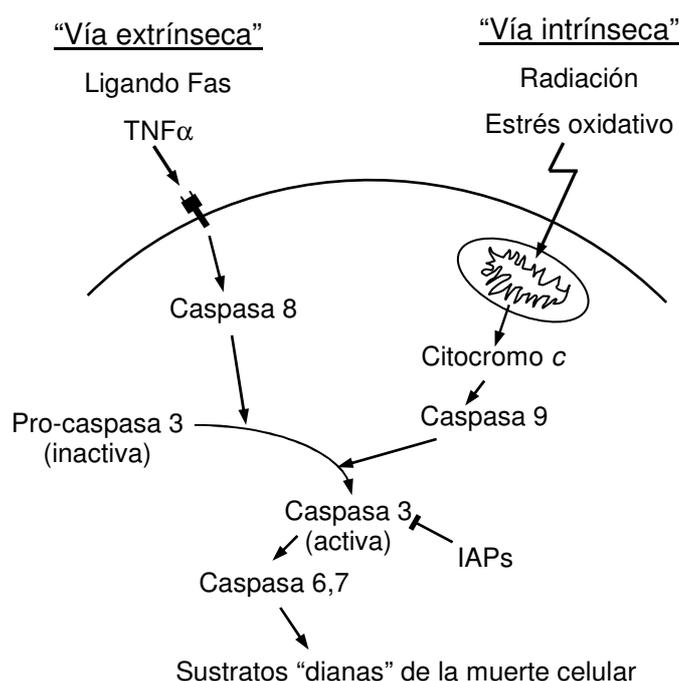


Figura 9. Esquema general de las vías principales de la apoptosis.

Adicionalmente, existen evidencias que sugieren un papel inhibitorio del zinc en etapas tardías de la apoptosis, como es la fragmentación del DNA. Este efecto, que en muchas líneas celulares se observa a concentraciones del metal alrededor de $50 \mu\text{M}$, podría deberse en parte a la inhibición por parte del zinc de endonucleasas dependientes de calcio y magnesio (Cohen y Duke, 1984). Sin embargo, se ha demostrado que el zinc no es capaz de inhibir los eventos más precoces de la apoptosis, como son la inversión de las fosfatidilserinas de la membrana plasmática o la alteración de la membrana mitocondrial interna y la liberación de citocromo c (Mathieu y col., 1996; Wolf y Eastman, 1999).

Por otro lado, se han visto efectos pro-apoptóticos del zinc. A concentraciones superiores a 200 μM el zinc potencia el efecto apoptótico de estímulos como el manganeso o la isquemia (Schrantz y col., 2001; Wood y Osborne, 2001). La entrada rápida de zinc extracelular induce la apertura del poro de transición de la permeabilidad mitocondrial, la liberación de citocromo *c* y la activación de la cascada de proteínas de la apoptosis (Jiang y col., 2001).

Dado que la concentración intracelular de Zn libre es muy baja (apartado I.7), encontrándose la mayor parte en forma unida fundamentalmente a las metalotioneínas, es de esperar que estas proteínas deben estar involucradas en la proliferación celular y la apoptosis. La migración de la metalotioneína del citosol al núcleo durante la proliferación celular, así como la inducción de la síntesis de metalotioneína por citoquinas, hormonas y agentes citotóxicos, sustentan además dicha hipótesis (Cherian y Apostolova, 2000). En este sentido, existen evidencias acerca del papel anti-apoptótico de la metalotioneína. Por ejemplo, se ha visto que la potenciación de la expresión de metalotioneína tanto en células tumorales como en cardiomiocitos estimula la multiplicación celular y tiene efectos anti-apoptóticos (Deng y col., 1998; Tsangaris y Tzortzidou-Stathopoulou, 1998; Wang y col., 2001; Shimoda y col., 2003). En contraste, tanto en células *knock-out* de metalotioneína, como en cultivos celulares tratados con oligómeros antisentido al mRNA de ésta, se produjo la inhibición del crecimiento y el inicio de la apoptosis (Kondo y col., 1997; Abdel-Mageed y Agrawal, 1997). En este último caso se descartó que la causa del incremento de la susceptibilidad a la apoptosis se debiera a la alteración de los niveles intracelulares de zinc.

Por otro lado se ha visto que el sistema tioneína/metalotioneína puede regular a la proteína p53: un factor de transcripción que necesita ligar un ión Zn en su estructura para poder unirse al DNA, y que actúa integrando múltiples señales de estrés en una serie de diversas respuestas antiproliferativas, de las cuales la más importante es que activa la apoptosis (Fridman y Lowe, 2003). Meplan y col. (2000) demostraron no sólo que la tioneína es capaz de inactivar *in vitro* a ésta proteína por secuestro del Zn unido, sino que además la sobreexpresión de metalotioneína en células, moduló la actividad transcripcional de la p53.

Otra muestra del papel anti-apoptótico de la metalotioneína lo constituyen los experimentos de Penkowa y Hidalgo (2001), que administraron por vía intravenosa MT-2-Zn, a ratas con Encefalomiелitis Autoinmune Experimental (EAE) (un modelo animal de la Esclerosis Múltiple humana), y observaron una significativa reducción de la muerte celular apoptótica de las neuronas y los oligodendrocitos, así como una

reducción de los niveles de interleuquina-6 (IL-6) y de TNF- α . Sin embargo, una cantidad de Zn equivalente a la que contenía la MT-2, falló en inhibir la apoptosis de los animales con EAE, lo cual demostró que el efecto observado no se debió al Zn *per se*.

A pesar de todas estas evidencias, el mecanismo molecular mediante el cual la metalotioneína podría ejercer la función anti-apoptótica no se conoce. Algunos de los posibles mecanismos podrían ser neutralizando las ROS, induciendo la reducción de los niveles de citoquinas pro-apoptóticas como el TNF- α (Penkowa y Hidalgo, 2001) o involucrando el factor nuclear kB (NF-kB), ya que se ha visto que la metalotioneína interactúa específicamente con la subunidad p50 de este factor nuclear (Abdel-Mageed y Agrawal, 1998).

I.6.5 Relación con el metabolismo energético.

La generación de ratones *knock-out* de genes de las metalotioneínas 1 y 2, ha sido una de las herramientas más recientes y valiosas para estudiar las funciones fisiológicas de éstas proteínas. Estos ratones no tienen problemas para reproducirse, y aparentemente son normales fenotípicamente. Sin embargo, han mostrado una obesidad moderada y tienen altos niveles de leptina (el producto del gen obeso) en sangre, además de ser más sensibles a la toxicidad de metales y al estrés oxidativo (Beattie y col., 1998). Asimismo, los ratones MT $-/-$ presentan niveles más bajos de lactato en sangre e hígado, en comparación con ratones normales, luego de una inflamación inducida por endotoxina (Rofe y col., 1996); y al mismo tiempo, la activación de la glicólisis por Zn en cultivos primarios de hepatocitos provenientes de estos ratones, es menor comparado con la activación que provoca el Zn sobre la glicólisis de cultivos de hepatocitos provenientes de ratones normales (Rofe y col., 2000). Estos resultados, unidos a la considerable expresión inducida por frío de MT-1 en el tejido adiposo marrón (tejido productor de calor) de ratas (Beattie y col., 1996) y a otros que se detallan más adelante, han llevado a sugerir la posible implicación de las metalotioneínas en la regulación del balance de energía.

En este sentido, *in vitro* se ha comprobado la participación de la MT-1 en la regulación de la actividad de enzimas claves del metabolismo energético como la glicerol-fosfato-deshidrogenasa (Maret y col. 2001) y la gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa (Maret y col., 1999). Además se ha observado que los adipocitos, células endocrinas claves en la regulación del balance energético, secretan metalotioneína (≈ 30 ng/ml) (Trayhurn y col., 2000a, 2000b), y que la importación de

ésta a las mitocondrias hepáticas modula la respiración (Ye y col., 2001). De igual forma, se ha comprobado que la entrada de metalotioneína al núcleo durante la diferenciación celular es ATP-dependiente (Woo y col., 2000).

Por otra parte en invertebrados, también se ha visto que el frío es un factor que induce considerablemente la expresión de metalotioneína. Mediante *Northern blot*, English y Storey (2003) demostraron que luego de mantener el molusco *Littorina littorea* a -8°C , la expresión a nivel transcripcional de la metalotioneína, tanto en el hepatopáncreas como en el músculo del pie, aumentó hasta 3 veces al cabo de 1 h y hasta 6 veces al cabo de las 12-24 horas.

Sin embargo, a pesar de todos estos indicios, no existe aún un consenso acerca de que las metalotioneínas estén involucradas directamente en la regulación del metabolismo energético, ya que los ratones *knock-out* de genes de las metalotioneínas 1 y 2, obtenidos por otros grupos distintos al de Beattie y col. (1998), no se han diferenciado en el peso con respecto a los controles (Michalska y Choo, 1993; Masters y col., 1994a). La razón de dicha contradicción podría deberse al genotipo de las cepas de ratones que usaron estos otros grupos en comparación con los de Beattie y col. (1998). Mientras que, tanto los *knock-out* como los controles de Michalska y Choo (1993) y de Masters y col. (1994a), pertenecían a una misma cepa (C57BL/6J y 129/SvCPJ respectivamente), Beattie y col. (1998) usaron una mezcla de cepas 129/Ola y C57BL/6J para la generación de los *knock-out* y los compararon con ratones controles que eran todos de la misma cepa C57BL/6J. Con lo cual, no es posible concluir que la obesidad moderada encontrada por Beattie y col. (1998) en los ratones *knock-out* de los genes de las metalotioneínas 1 y 2 se debiera efectivamente a la carencia de metalotioneína porque puede haberse debido a las diferencias genéticas entre los dos grupos de ratones.

I.6.6 Papel de las metalotioneínas en el sistema nervioso.

En 1991, Uchida y col. aislaron a partir de cultivos neuronales humanos, un nuevo miembro de la familia de las metalotioneínas (MT-3) designado inicialmente como factor inhibitorio del crecimiento neuronal (GIF). Esta proteína fue nombrada de esta forma porque su presencia provocaba una disminución de la supervivencia de neuronas corticales de neonatos *in vitro*; una propiedad no compartida por las metalotioneínas 1 y 2. Esta proteína de 68 aminoácidos exhibió un 70% de identidad de secuencia con las isoformas 1 y 2 de humanos, incluyendo los 20 residuos de cisteína, por lo que se incluyó en la familia de las metalotioneínas y se designó como

MT-3. La cadena polipeptídica de esta isoforma es más larga que la de las isoformas 1 y 2 porque tiene un hexapéptido extra en el extremo C-terminal. Además, en las posiciones 7 y 9 de la secuencia aminoacídica, tiene residuos de prolina (conservadas en todas las MTs-3 conocidas) que podrían ser los responsables de su efecto inhibitorio sobre el crecimiento neuronal (Sewell y col., 1995); en lo cual también podría ser importante la treonina adicional de la posición 5 (Romero-Isart y col., 2002) (Tabla 1).

Tabla 1. Comparación de las secuencias aminoacídicas de las metalotioneínas 1a, 2a y 3 humanas. En negrita aparecen señalados los aminoácidos que podrían ser responsables de la actividad funcional de MT-3.

Dominio- β			
MT-1a	1	MDPN.CSCATGGGCTCTGSCCKECKCNSCK	30
MT-2a	1	MDPN.CSCAAGDSCTCAGSCKECKCTSK	30
MT-3	1	MDPET TCPCP SGGSCTCADSCKCEGCKCTSKC	31
Dominio- α			
MT-1a	31	KSCCSCCPMSCAKCAQGCICKG.....ASEKCSCCA	61
MT-2a	31	KSCCSCCPVGCACAKCAQGCICKG.....ASDKCSCCA	61
MT-3	32	KSCCSCCPAECEKCAKDCVCKGGEEAAEAEKCSCCQ	68

A diferencia de MT-1 y MT-2, la isoforma MT-3 une Zn de forma no cooperativa (Burdette y Lippard, 2003), puede tener una mayor capacidad de unión a metales (apartado I.5.1), y su expresión no se induce por metales y glucocorticoides (Palmiter y col., 1992). En el cerebro la expresión de MT-1 y MT-2 ha sido localizada en astrocitos y células de glia (Young y col., 1991; Nakajima y Suzuki, 1995), mientras que la expresión de MT-3 tiene lugar fundamentalmente en las neuronas enriquecidas en zinc ("zinc-containing neurons"), y es más abundante en las neuronas piramidales del hipocampo y las células granulares del giro dentado del hipocampo, cuyas proyecciones contienen la mayor concentración de zinc de todo el cerebro (Masters y col., 1994b; Erickson y col., 1997). También, como se comentará más adelante, bajo algunas condiciones se ha descrito la expresión de MT-3 en astrocitos (Masters y col., 1994b; Kobayashi y col., 1993).

A pesar de que se le han atribuido a las metalotioneínas (1, 2 y 3) un papel muy importante en la regeneración y protección del sistema nervioso frente a diferentes daños, sus funciones aún no se conocen con precisión. MT-1 y MT-2

podrían estar involucradas en procesos inflamatorios del cerebro (Penkowa y col., 2000; van Lookeren Champagne y col., 1999; Chung y col., 2004), ya que su expresión aumenta considerablemente en patologías neurodegenerativas, cuya base es un proceso inflamatorio, como son la enfermedad de Alzheimer (Adlard y col., 1998), la enfermedad de Pick (Duguid y col., 1989), la esclerosis lateral amiotrófica (Sillevis Smitt y col., 1992) y luego de una isquemia cerebral (Neal y col., 1996). Los ratones *knock-out* de MT-1 y MT-2 presentan respuestas inflamatorias prolongadas, y un estrés oxidativo y apoptosis cerebral incrementados (Penkowa y col., 1999). Además la sobreexpresión de MT-1 protege de la isquemia cerebral focal (van Lookeren Champagne y col., 1999).

Por otro lado, el papel neurobiológico de MT-3 se ha estudiado en ratones *knock-out* del gen de MT-3. Dichos mutantes no presentan neuropatologías ni defectos en su comportamiento o capacidad de aprendizaje. Sin embargo, la región CA3 del hipocampo de estos ratones es más susceptible a la acción del ácido caínico, un agente neurotóxico que provoca convulsiones y apoptosis neuronal (Erickson y col., 1997). Por otro lado, se ha descrito que los niveles de MT-3 disminuyen en astrocitos circundantes de las áreas del cerebro con enfermedades degenerativas como la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, la esclerosis lateral amiotrófica y el síndrome de Down (Uchida, 1994), pero se incrementan en astrocitos adyacentes a zonas donde hubo infartos cerebrales, daños por heridas o daños excitotóxicos inducidos por N-metil-D-aspartato (NMDA) (Hozumi y col., 1998).

I.7 El zinc en los sistemas biológicos.

I.7.1 Flujo intracelular de zinc.

Debido al amplio papel tanto estructural como funcional que desempeña el zinc en los sistemas biológicos, lo cual se detallará en el próximo apartado, los niveles de este ion en los distintos compartimentos intracelulares deben estar altamente controlados. En este sentido se ha demostrado que en numerosos tipos celulares la concentración de zinc libre tanto en el núcleo como en la mitocondria es mucho menor (en el orden femtomolar) que la del citosol (alrededor de 1 nM) (Chimienti y col., 2003). Además los niveles de zinc en los distintos compartimentos celulares cambian según el estado fisiológico de las células. Por ejemplo, en casos de proliferación celular, la concentración citosólica del metal aumenta rápidamente de 5 a 3 veces, lo cual

permite el paso de la fase G1 a la fase S del ciclo celular (Schmidt y Beyersmann, 1999).

En los mamíferos el flujo de zinc hacia el citosol celular ocurre a través de transportadores de la familia ZIP (*Zrt/Irt-like proteins*), que se agrupan en cuatro subgrupos o subfamilias de acuerdo al grado de conservación de su secuencia (Gaither y Eide, 2001). Por otra parte se han identificado al menos 7 canales identificados como CDFs (*cation diffusion facilitator*) o ZnTs, que permiten el eflujo de zinc del citosol hacia el exterior de la célula o hacia organelos intracelulares (Kambe y col., 2004), protegiendo a la célula de un exceso del metal. Además el número de candidatos posibles a éstos transportadores, encontrados por homología de secuencias, aumenta cada año. La proteína ZnT-1, localizada en la membrana plasmática, asegura la exportación de zinc fuera de la célula (Palmiter y Findley, 1995), mientras el resto de los transportadores favorecen la acumulación de Zn en diferentes compartimentos y vesículas de secreción. Curiosamente, la expresión de ZnT-1 es regulada por MTF-1, que al igual que en el caso de la metalotioneína (apartado I.3.1), se une a regiones *MRE* presentes en el promotor del gen *ZnT-1* (Langmade y col., 2000). El ZnT-2 favorece la acumulación de zinc en los lisosomas y esta presente principalmente en el riñón (Palmiter y col., 1996). Los transportadores ZnT-3 y ZnT-4 sólo se expresan en determinados tejidos como el cerebro (Palmiter y col., 1996; Wenzel y col., 1997) o las glándulas mamarias (Michalczyk y col., 2002) respectivamente. ZnT-3 es el responsable en las neuronas de la acumulación de zinc en las vesículas sinápticas, mientras que ZnT-4 garantiza la acumulación de zinc en las vesículas que son destinadas a secretar su contenido en la leche, en la cual el Zn esta presente a altas concentraciones (Kambe y col., 2004). Por su parte ZnT-5, ZnT-6 y ZnT-7 podrían transportar Zn desde el citoplasma al aparato de Golgi (Huang y col., 2002; Kirschke y Huang, 2003), aunque su función especializada no ha sido dilucidada. ZnT-5 es muy abundante en el páncreas (Kambe y col., 2002) y está asociado con los gránulos de insulina de las células β pancreáticas. En dichos gránulos, la insulina es almacenada en forma de hexámeros sólidos que enlazan dos iones Zn^{2+} por hexámero (Gold y Grodsky, 1984; Emdin y col., 1980). Por otro lado, en la membrana nuclear se han detectado por la técnica de *patch-clamp* canales permeables tanto a calcio como a zinc que podrían contribuir a la regulación de la concentración de zinc nuclear (Longin y col., 1997), pero estas proteínas aún no han sido aisladas ni clonadas. Tampoco han sido encontrados hasta el momento canales de Zn en la mitocondria. Se cree que el Zn pudiera entrar a este organelo,

probablemente mediante el uniportador de calcio (Brierley y col., 1968; Saris y Niva, 1994).

La presencia de transportadores de Zn, tanto de la membrana plasmática como de organelos intracelulares, no sólo ha sido determinada en mamíferos. En *S. cerevisiae* y *C. elegans*, también han sido encontrados proteínas relacionadas con la familia de proteínas ZIPs y ZnTs de mamíferos (MacDiarmid y col., 2000; Bruinsma y col., 2002).

I.7.2 Papel biológico del zinc.

Como habíamos adelantado en el apartado I.6.1, el Zn juega un papel muy importante como elemento estructural en algunas proteínas, ya que contribuye al plegamiento de éstas. Por ejemplo, de manera general, las cadenas polipeptídicas que conforman los dominios de las proteínas alcanzan el plegamiento adecuado de forma autónoma, pero esto requiere que tengan una cierta longitud de aproximadamente 50 residuos aminoacídicos. En los últimos años, se han encontrado un número de creciente de dominios que son demasiado pequeños para plegarse por sí solos pero obtienen un plegamiento estable cuando unen iones zinc (Berg y Shi, 1996).

Además, el zinc ha sido encontrado como elemento estructural en otras proteínas y complejos de proteínas importantes que incluyen el supresor de tumores p53 (Cho y col., 1994) y el complejo de receptor de prolactina-hormona de crecimiento humana, en el cual el zinc forma un puente entre la hormona y el receptor (Somers y col., 1994). Las familias de proteínas en este grupo tienen en común sitios de enlace de zinc tetraédricos formados por las cadenas laterales de cisteína, histidina y ocasionalmente aspartato y glutamato (Berg y Shi, 1996).

Por otro lado, el zinc juega un importante papel funcional en muchas proteínas. La presencia de zinc en una enzima fue establecida por primera vez por Keilin y Mann (1940), quienes demostraron que era requerido para la actividad catalítica de la enzima anhidrasa carbónica (Keilin y Mann, 1940). Desde entonces el número de enzimas descubiertas que requieren de zinc ha ido aumentando hasta llegar a más de 300 en la actualidad, la mayoría de las cuales han sido caracterizadas en detalle (Coleman, 1992). En general, el zinc es cofactor de las 6 clases de enzimas existentes: oxidorreductasas, transferasas, hidrolasas, liasas, isomerasas y ligasas; ejemplos de enzimas que necesitan el Zn como cofactor son, además de la anhidrasa carbónica, las RNA polimerasas (Coleman, 1974), la carboxipeptidasa A (Vallee y Neurath, 1955), la termolisina (Latt y col., 1969), la alcohol deshidrogenasa (Hoch y

Vallee, 1956) y la fosfatasa alcalina (Plocke y col., 1962). En la mayoría de estas enzimas, el zinc está directamente involucrado en la catálisis, sin embargo en algunas juega un papel puramente estructural (Berg y Shi, 1996). El ejemplo clásico es la aspartato transcarbamoilasa de *Escherichia coli*, en la cual las subunidades reguladoras contienen zinc enlazado (Nelbach y col., 1972). La eliminación del zinc provoca la disociación de las subunidades reguladoras de las subunidades catalíticas con la consiguiente pérdida de la regulación alostérica pero no de la actividad catalítica.

Más recientemente ha sido descubierto que el zinc además juega un papel estructural y funcional muy importante en los factores de transcripción de eucariontes. El papel estructural del zinc en estas proteínas involucradas en la replicación del DNA y en la transcripción reversa de eucariontes, fue propuesto por primera vez en 1983 para el factor de transcripción IIIA (TFIIIA) (Hanas y col., 1983). Los análisis posteriores revelaron la presencia de pequeños dominios basados en la unión de zinc (llamados “dedos de zinc”) en TFIIIA y en una amplia variedad de otras proteínas involucradas en la regulación génica (Miller y col., 1985). En los últimos años, más de 10 clases de tales dominios basados en la unión de zinc, han sido descubiertos y caracterizados bioquímicamente (Laity y col., 2001).

Por otro lado en el sistema nervioso central, el zinc juega un papel adicional como producto de secreción neuronal. Este ion es altamente concentrado en las vesículas presinápticas de un tipo de neuronas enriquecidas en zinc, que presentan en particular abundancia MT-3 y transportadores ZnT-3 de membrana (Burdette y Lippard, 2003). Aunque todavía no se conoce con certeza el papel que puede jugar el zinc en este tipo de neuronas, que son un subgrupo de las neuronas glutamatérgicas, se cree que podría estar involucrado en la regulación de la excitabilidad del cerebro a través de la modulación de los receptores de glutamato (Frederickson y Bush, 2001).

1.7.3 Propiedades químicas del zinc que le confieren un importante papel biológico.

El zinc existe como un catión divalente, Zn^{2+} , que tiene el orbital *d* completamente lleno: $1s^2 2s^2 2p^6 3s^2 3p^6 3d^{10}$. Esta configuración electrónica tiene importantes consecuencias. En términos de la teoría ácido-base duro-blando, el Zn^{2+} es considerado un ácido intermedio. Debido a esto, el Zn^{2+} puede interactuar fuertemente con una variedad de diferentes ligandos que incluyen los sulfuros de las cisteínas, el nitrógeno de las histidinas, y el oxígeno de los glutamatos, aspartatos y agua. Por otro lado el ion Zn^{2+} no es activo desde el punto de vista redox; ni el

potencial de la forma oxidada, Zn^{3+} , ni el potencial de la forma reducida, Zn^+ , son accesibles bajo condiciones fisiológicas. Esto es importante para su papel como elemento estructural de las proteínas que se unen al DNA, ya que otros metales redox-activos, como cobre y hierro, podrían promover reacciones de radicales libres que dañarían el DNA, si sustituyeran al Zn^{2+} como elemento estructural clave de los factores de transcripción. Por último, el Zn^{2+} en términos cinéticos es relativamente lábil, con lo cual las reacciones de intercambio de éste son relativamente rápidas, facilitándose la captación y liberación de este ion entre ligandos (Berg y Shi, 1996).

I.8 Formación mitocondrial de ROS. Efecto de los inhibidores de la cadena respiratoria mitocondrial y de los desacoplantes de la fosforilación oxidativa sobre la producción de ROS.

La mayoría del oxígeno consumido por los organismos aerobios es reducido a agua por el complejo citocromo oxidasa en la última reacción de la cadena respiratoria mitocondrial (Fig. 10). Sin embargo, una pequeña proporción de las moléculas de oxígeno (1-2%) (Boveris y Chance, 1973) son convertidos a radical anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) en otros sitios de la cadena respiratoria. Este radical libre, que es el producto de la reducción del oxígeno molecular por un electrón, es el precursor de la mayoría de las ROS. La dismutación de $O_2^{\cdot-}$ (espontáneamente o a través de una reacción catalizada por las enzimas superóxido dismutasas) produce peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el cual puede ser reducido completamente a agua o reducido parcialmente a radical hidroxilo (OH^{\cdot}), uno de los oxidantes más fuertes en la naturaleza (Turrens, 2003). La formación de (OH^{\cdot}) es catalizada por metales de transición reducidos, los cuales a su vez podrían ser re-reducidos por $O_2^{\cdot-}$, propagándose este proceso (Liochev y Fridovich, 1999). Además, $O_2^{\cdot-}$ podría reaccionar con otros radicales como óxido nítrico (NO^{\cdot}), formando el peroxinitrito; un oxidante muy fuerte (Radi y col., 2002). Los oxidantes derivados a partir del NO^{\cdot} han sido llamados recientemente especies reactivas de nitrógeno (RNS) (Turrens, 2003).

Durante los últimos 35 años numerosos laboratorios han identificado una variedad de fuentes mitocondriales generadoras de $O_2^{\cdot-}$, que incluyen tanto complejos respiratorios como enzimas individuales. La formación de superóxido tiene lugar en la membrana mitocondrial externa, en la matriz y en ambos lados de la membrana mitocondrial interna (Turrens, 2003) (Tabla 2).

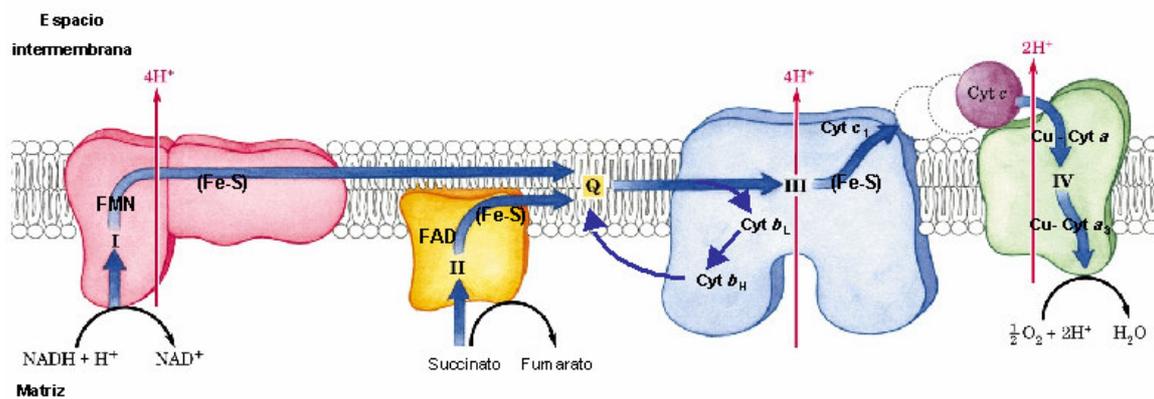


Figura 10. Esquema del flujo de electrones y protones a través de los cuatro complejos de la cadena respiratoria mitocondrial. Con números romanos se representan los complejos NADH deshidrogenasa (I), succinato deshidrogenasa (II), ubiquinona-citocromo *c* oxidoreductasa (III) y citocromo oxidasa (IV). Q y Cyt representan ubiquinona y citocromo respectivamente. Adaptado a partir de la figura 19-14 de Nelson y Cox (2000).

Tabla 2. Localización de las principales fuentes mitocondriales de anión superóxido. (Tomado de Turrens, 2003)

Componente	Localización	Referencias
Complejo I (NADH deshidrogenasa)	Membrana interna/ lado interior	(Genova y col., 2001; Kushnareva y col., 2002)
Complejo II (succinato deshidrogenasa)	Membrana interna/ lado interior	(Zhang y col., 1998; Lenaz, 2001)
Complejo III (ubiquinona-citocromo <i>c</i> oxidoreductasa)	Membrana interna/ lado interior	(Turrens y col., 1985)
Complejo III (ubiquinona-citocromo <i>c</i> oxidoreductasa)	Membrana interna/ lado exterior	(Han y col., 2001; Starkov y Fiskum, 2001)
NADH deshidrogenasa externa (levadura)	Membrana interna/ lado exterior	(Fang y Beattie, 2003)
Glicerol-fosfato deshidrogenasa	Membrana interna/ lado exterior	(Drahota y col., 2002)
Deshidroorotato deshidrogenasa	Matriz	(Forman y Kennedy, 1976)
Monoaminoxidasa	Membrana externa/ lado interior	(Hauptmann y col., 1996)

Aunque el Complejo III parece ser el responsable de la mayoría del $O_2^{\cdot-}$ producido en las mitocondrias de corazón y pulmón (Turrens y Boveris, 1980; Turrens y col., 1982), la formación de $O_2^{\cdot-}$ por el Complejo I parece ser la fuente primaria de $O_2^{\cdot-}$ en las mitocondrias de cerebro (Barja y Herrero, 1998). Además, el Complejo I es la fuente primaria de ROS en una variedad de estados patológicos (Barja y Herrero, 1998; Nicholls, 2002). En el Complejo I, la fuente primaria de $O_2^{\cdot-}$ parece ser uno de los “clusters” Fe-S (o N-1 α o N-2; Genova y col. 2001; Kushnareva y col., 2002). En el Complejo III, la mayoría del $O_2^{\cdot-}$ parece ser formada como resultado de la autooxidación de ambas ubisemiquinonas de la cara externa e interna de la membrana mitocondrial interna (Turrens y col., 1985; Han y col., 2001; Starkov y Fiskum, 2001) (tabla 3).

La contribución relativa de cada sitio a la producción global de $O_2^{\cdot-}$ varía no sólo entre los diferentes órganos, sino también en dependencia de si las mitocondrias están respirando activamente (estado 3; en presencia de O_2 , ADP y equivalentes de reducción) o la cadena respiratoria está altamente reducida (estado 4; ausencia de ADP) (Barja, 1999). La energía liberada por el flujo de electrones a través de la cadena respiratoria se conserva como gradiente de protones a través de la membrana mitocondrial interna (Mitchell, 1977). Este gradiente se disipa a través del complejo de la ATP sintasa (Complejo V) permitiendo que se sintetice ATP (Noji y Yoshida, 2001). En ausencia de ADP, el movimiento de H^+ a través de la ATP sintasa cesa y el gradiente de protones se hace máximo, lo cual provoca que disminuya la velocidad del flujo de electrones y por tanto que los componentes de la cadena respiratoria queden más reducidos (estado 4). Como resultado, las concentraciones de $O_2^{\cdot-}$ del estado estacionario fisiológico se incrementan (Boveris y col., 1972). La formación de $O_2^{\cdot-}$ podría además ser incrementada en presencia de inhibidores de la cadena respiratoria mitocondrial (por ejemplo la rotenona, la cual inhibe el Complejo I, o la antimicina A, un inhibidor del Complejo III), los cuales provocan que aquellos transportadores anteriores al sitio de inhibición queden totalmente reducidos (Turrens, 2003). Desde 1967 se conoce que el Zn^{2+} puede inhibir la respiración mitocondrial a concentraciones micromolares (Skulachev y col., 1967). Mediante estudios posteriores se ha establecido que el Complejo III (complejo bc_1), es el sitio primario de unión e inhibición por Zn^{2+} (Lorusso y col., 1991; Link y von Jagow, 1995; Berry y col., 2000), demostrándose que existen dos sitios de unión de este ion en el complejo. La inhibición es reversible ($K_i = 10^{-7}$ a pH 7.0 en bovino), y a concentraciones mayores de 5 μ M puede ser completa (Link y von Jagow, 1995). En este sentido, Sensi y

col. (1999) demostraron que en este rango de concentraciones (micromolar) el Zn^{2+} desencadena la producción mitocondrial de ROS.

Contrariamente, los agentes desacoplantes de la fosforilación oxidativa (por ejemplo 2,4 dinitrofenol y trifluorocarbonilcianuro fenilhidrazona) inhiben la formación de O_2^- , ya que incrementan la velocidad de la transferencia de electrones y por tanto disminuyen la reducción de los transportadores de electrones en el estado estacionario (Boveris y Chance, 1973).

I.8.1 Defensas enzimáticas contra el estrés oxidativo.

Las mitocondrias tienen numerosas defensas contra el estrés oxidativo para mantener en el estado estacionario una baja formación de oxidantes. En este organelo, el anión superóxido es eliminado fundamentalmente por una superóxido dismutasa dependiente de Mn (SOD2), similar a las de bacterias pero diferente a la isoenzima dependiente de Cu y Zn (SOD1), encontrada en el citosol (Weisiger y Fridovich, 1973). Mientras la forma citosólica es una enzima constitutiva, la superóxido dismutasa de la matriz mitocondrial podría ser inducida por una variedad de circunstancias como hiperoxia, radiación, o como una respuesta a citoquinas (Turrens, 1997). Recientemente se ha visto que la SOD1 puede además localizarse en el espacio intermembrana de las mitocondrias, con lo cual podría proteger del daño oxidativo, tanto los componentes citosólicos como los mitocondriales (Sturtz y col., 2001; Okado-Matsumoto y Fridovich, 2001). En el caso de los crustáceos decápodos, en lugar de tener una superóxido dismutasa dependiente de Cu y Zn en el citosol, lo que tienen es una isoenzima dependiente de Mn que se diferencia de la mitocondrial en que no tiene la secuencia señal de localización mitocondrial (Brouwer y col., 1997).

El peróxido de hidrógeno mitocondrial es eliminado por la glutatión peroxidasa (Chance y col., 1979) y por la tioredoxina peroxidasa o peroxirredoxina (Kang y col., 1998; Kowaltowski y col., 2001). En las mitocondrias de corazón es eliminado además por la catalasa, una enzima que en la mayoría de los órganos es confinada a los peroxisomas (Chance y col., 1979).

Además se ha encontrado una reductasa de membrana, dependiente de succinato, que podría ser responsable de la destoxificación de diferentes radicales *in vivo*, así como de la regeneración de la vitamina E reducida (Turrens, 1997).

II. OBJETIVOS

II Objetivos

Aunque las metalotioneínas han sido objeto de estudio desde hace más de cuatro décadas sin que se haya podido establecer su papel biológico preciso, la detoxificación de metales no esenciales ha sido la función que de forma más concluyente se les ha podido atribuir. Esta característica de las metalotioneínas ha sido frecuentemente utilizada como marcador de la contaminación ambiental tanto en mamíferos como en invertebrados, siendo este hecho por el que más se les conoce a éstas proteínas en especies de alto valor comercial como los crustáceos. Sin embargo otras funciones de las metalotioneínas en este grupo de animales no han sido estudiadas. Por esta razón seleccionamos la langosta *P. argus*, un recurso pesquero muy importante en los países de la costa atlántica del oeste, para estudiar otras posibles funciones de estas proteínas, además de la de detoxificación. Con estos antecedentes, los objetivos que nos planteamos en ese trabajo pueden resumirse en:

1. Obtener y caracterizar mediante técnicas de biología molecular, la secuencia génica y aminoacídica de un péptido (MTPA) perteneciente a la familia de las metalotioneínas, a partir del hepatopáncreas de la langosta *P. argus*.
2. Analizar la expresión del gen que codifica para MTPA, así como la inducción de su expresión por cadmio, en diferentes tejidos de la langosta.
3. Determinar la estequiometría de zinc unido a MTPA, mediante diferentes técnicas de análisis, luego de expresar y purificar esta proteína como tioneína-zinc, por vía recombinante.
4. Estudiar el efecto que produce MTPA (TPA-Zn) y su forma apo (TPA), sobre la velocidad de la cadena de transporte de electrones, de mitocondrias procedentes de hepatopáncreas de bogavante y de hígado de ratón.
5. Determinar la influencia de MTPA (TPA-Zn), y su forma apo (TPA), sobre la producción de ROS de mitocondrias hepatopancreáticas.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

III Materiales y Métodos

III.1 Materiales

Todos los reactivos y productos utilizados son de grado analítico y han sido suministrados por distintas casas comerciales, fundamentalmente: Sigma y Merck. Los oligonucleótidos sintéticos, así como el material radioactivo, eran de Amersham Pharmacia Biotech. Se han utilizado además una serie de productos más específicos cuya procedencia se indica en el texto.

Los medios de cultivo, las disoluciones empleadas, así como el material desechable (puntas de micropipetas, tubos, jeringuillas, pipetas *Pasteur*) fueron esterilizados en autoclave si no venían previamente estériles. El material de vidrio fue además esterilizado en horno a 180°C durante 8 horas o más.

El agua, disoluciones y tampones utilizados en los procesos de purificación de MTPA y en su posterior análisis estructural, fueron burbujeados con N₂ durante 30 minutos para eliminar el O₂ de estas disoluciones y así evitar la oxidación de la proteína.

III.2 Animales de experimentación.

Para la obtención de los explantes y la extracción de RNA total se han utilizado langostas adultas (600-700 g) de la especie *P. argus* procedentes de la costa norte occidental de Cuba. Estos animales fueron transportados humedecidos con agua de mar hasta el laboratorio y a una temperatura de aproximadamente 10°C para disminuir su actividad metabólica.

Para la realización de los experimentos con mitocondrias se han utilizado ratones de 2 meses de la raza Balb/c y bogavantes adultos (500-600 g) de la especie *H. americanus*. Los ratones se criaron en el animalario del Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa” de la Universidad Autónoma de Madrid, en condiciones estériles, con ciclos de luz-oscuridad de 12 horas, humedad relativa del 50-55% y temperatura de 20-25°C. Estos animales se alimentaron con una dieta estándar de laboratorio y tuvieron en todo momento libre acceso al alimento y al agua de bebida. Finalmente se sacrificaron por dislocación cervical. Los bogavantes *H. americanus* fueron obtenidos en pescaderías locales donde son mantenidos en peceras y al igual que en el caso de las langostas *P. argus*, se sacrificaron luego de ser anestesiados por enfriamiento a -20°C de 20 a 25 minutos.

III.3 Extracción de RNA

Todo el material empleado fue esterilizado en autoclave y horno a 180°C. El agua utilizada para la preparación de las disoluciones se trató con dietilpicrocarbonato (DEPC) al 0.1% (v/v) y posteriormente fue esterilizada en autoclave.

El aislamiento de RNA total se realizó a partir de 100–200 mg de tejido o explante de tejido, que fue congelado en nitrógeno líquido inmediatamente después de su extracción. El proceso de purificación de RNA fue llevado a cabo básicamente según Chomczynski y Sacchi, (1987) con algunas modificaciones que se describen a continuación.

El tejido fue desnaturalizado en 1 ml de disolución de tiocianato de guanidina 4 M, citrato de sodio 25 mM pH 7, N-laurilsarcosina 0.5% (p/v) y β -ME 0.1 M. Posteriormente se homogeneizó en Polytron (*PT3000 kinematica AG*) a 11000 rpm en hielo. Las cuchillas fueron lavadas después de cada extracción con: 1) agua destilada estéril, 2) NaOH 50 mM, 3) agua destilada estéril, 4) ácido acético 50 mM, 5) agua destilada estéril tratada con DEPC.

Teniendo en cuenta el volumen inicial, se añadió 1/10 de éste de acetato de sodio 2 M pH 4.0 y un volumen de fenol, agitando enérgicamente en vortex. Luego se añadió 0.2 volúmenes de mezcla clorofórmica [cloroformo-alcohol isoamílico en proporción 49:1 (v/v)], se agitó en vortex y se dejó en hielo durante 2 minutos. A continuación, se centrifugó en microcentrífuga a 14 000 rpm durante 20 minutos a 4°C. Tras la centrifugación, el RNA quedó en la fase superior mientras que el DNA y las proteínas quedaron en la interfase y en la fase fenólica respectivamente. Se extrajo la fase acuosa superior y el RNA total se precipitó con un volumen de isopropanol durante una hora a –20°C. Transcurrido ese tiempo se centrifugó a 14 000 rpm, 20 minutos a 4°C. El precipitado de RNA se secó unos minutos a temperatura ambiente y se resuspendió en 300 μ L de la solución desnaturalizante antes descrita. Se volvió a precipitar de nuevo con isopropanol durante una hora a –20°C, centrifugándose posteriormente a 14 000 rpm, 10 minutos a 4°C. El precipitado de RNA se lavó con etanol al 75% (v/v) tratado con DEPC, sin resuspender, y se centrifugó a 14 000 rpm, 5 minutos a 4°C. El nuevo precipitado de RNA total se secó 5 minutos a temperatura ambiente. Por último, se resuspendió en agua estéril tratada con DEPC y se determinó su concentración midiendo la absorbancia a 260 nm. Finalmente, el RNA se precipitó añadiendo 1/20 de su volumen de acetato de sodio 3M pH 7 y 2.5 volúmenes de etanol absoluto, guardándose a –70°C hasta su posterior uso.

III.4 Transcripción inversa de mRNA a cDNA.

El RNA total (5 µg) de cada tejido (hepatopáncreas, intestino, sistema nervioso y músculo) fue tratado con *DNasal* libre de RNasas (2U/µg RNA) (Roche) durante 30 minutos a 37°C, en presencia RNasin (4 U/µg) (Promega) y DTT 8 mM, para eliminar la posible contaminación de DNA. Seguidamente, se incubó durante 5 minutos a 95°C con el fin de desnaturalizar la *DNasal*, y se procedió a la copia del RNA a DNA (cDNA) según el método descrito por Sambrook y col. (1989). En esta reacción se emplearon 4 U/µl de la enzima transcriptasa inversa (RT) procedente del virus de la leucemia murina de Moloney (M-MLV) (Gibco BRL) en un volumen final de 20 µl de tampón de reacción (Tris-HCl 50 mM pH 8.3, KCl 75 mM, MgCl₂ 3 mM), 1 mM de cada desoxinucleótido trifosfato (dNTPs), 50 nM de hexanucleótidos sintéticos degenerados p(dN)₆ (Boehringer Mannheim) y el resto de los componentes del tratamiento previo con la *DNasal*. La reacción transcurrió durante 1 hora a 37°C, y luego la mezcla se calentó 5 minutos a 95°C, para desnaturalizar la enzima. El cDNA así generado, se amplificó mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o se guardó a -20°C hasta su posterior utilización.

III.5 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

El cDNA generado se amplificó por PCR, para lo cual se empleó la enzima *Taq* DNA polimerasa de la bacteria termófila *Thermus thermophilus* (Biotools) y como cebadores los oligonucleótidos sintéticos que se indican en la tabla 3.

La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 50 µl que contenía 1 µl del producto de reacción de la RT, tampón de reacción (TrisHCl 75 mM pH 9.0, KCl 50 mM, (NH₄)₂SO₄ 20 mM), MgCl₂ 2mM, 0.2 mM de cada dNTP, 0.5 µM de cada uno de los cebadores y 1.25 U de la enzima *Taq* DNA polimerasa (Biotools). En todos los casos se utilizó un termociclador de la marca Perkin Elmer, Gene Amp PCR System 2400. Para obtener las condiciones óptimas de amplificación, en la fase exponencial de la PCR, se ensayaron diferentes números de ciclos tanto para la amplificación de MTPA, como para la amplificación del rRNA 18S (control interno de la cantidad de cDNA de partida). Dicho procedimiento es presentado en detalle en la Figura 11, donde se observa una relación lineal entre el número de ciclos de amplificación y la intensidad de la señal de la PCR (expresada como U.A. de la DO absoluta), entre los ciclos 20-30 para MTPA, y entre los ciclos 16-20 para el rRNA 18S. Teniendo en cuenta esto, para la determinación de los niveles de expresión de MTPA por RT-PCR

semicuantitativa, el cDNA molde se desnaturalizó a 94°C 4 minutos, seguido por 24 ciclos para MTPA y 18 ciclos para el rRNA 18S con las siguientes temperaturas: 94°C 30 segundos, 55°C 45 segundos, 72°C 1 minuto; y extensión final a 72°C 10 minutos. Concluida la reacción, las muestras se llevaron a 4°C y el DNA resultante se sometió a electroforesis en las condiciones que más adelante se detallan.

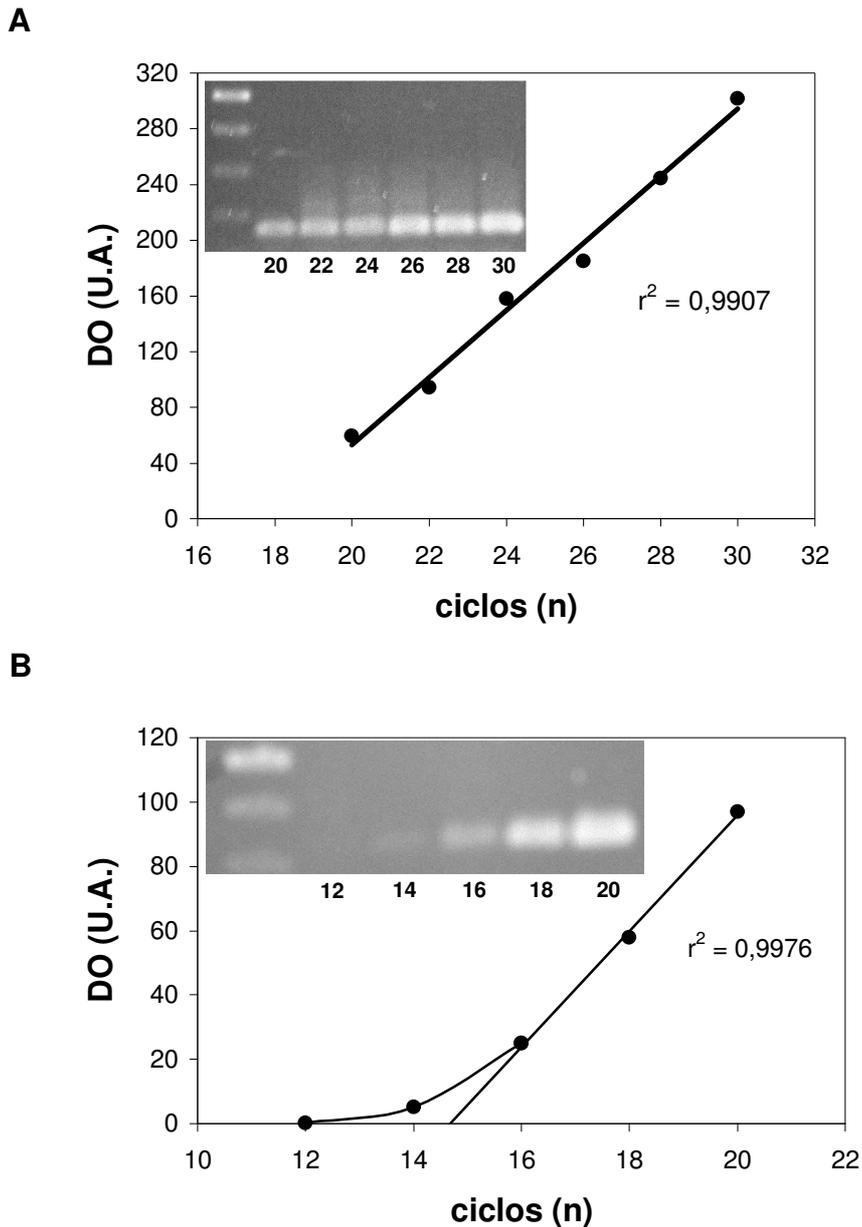


Figura 11. Optimización del número de ciclos de la RT-PCR semicuantitativa. A. Amplificación de MTPA. **B.** Amplificación del rRNA 18S.

Tabla 3. Cebadores usados para el clonaje y el análisis de expresión del gen de MTPA.

Nombre	Secuencia (5'→3')	Información
Directo MtA ₁	TGYTGYAWNGAYVWNTGY	Degenerado a partir de las secuencias de las MTs de crustáceos, cubriendo desde el aminoácido de la posición 4 hasta el aminoácido de la posición 9*.
Inverso MtB ₁	RCARCANBNNGSYTTNSWRCA	Degenerado a partir de las secuencias de las MTs de crustáceo, cubriendo desde el aminoácido de la posición 49 hasta el aminoácido de la posición 55*.
Directo MtA ₂	ACCATGCCTGGTCCCTGCTGC	Empleado en el análisis de expresión mediante RT-PCR. Abarca desde el nucleótido de la posición -3 hasta el nucleótido de la posición 18 con respecto al sitio de iniciación de la traducción de la secuencia completa del cDNA. Subrayado en naranja en la figura 18.
Inverso MtB ₂	CTAAGGGCAGCATTGCAAGG	Empleado en el análisis de expresión mediante RT-PCR. Abarca desde el nucleótido de la posición 159 hasta el nucleótido de la posición 180 con respecto al sitio de iniciación de la traducción de la secuencia completa del cDNA. Subrayado en verde en la figura 18.
Directo 18S-1	CGGAACCCGAGGTAATGACTAATAGG A	Empleado para determinar la cantidad relativa de amplificación en la PCR. Abarca desde el nucleótido 867 hasta el nucleótido 893 del gen del rRNA 18S (No. Acceso GenBank: U19182) de <i>P. argus</i> .
Inverso 18S-2	CACTCCTGGTGGTGCCCTCCGTCAA T	Empleado para determinar la cantidad relativa de amplificación en la PCR. Abarca desde el nucleótido 1168 hasta el nucleótido 1194 del gen del rRNA 18S (No. Acceso GenBank: U19182) de <i>P. argus</i> .
Directo GSP ₂	GTGAGTGTGCCGAGGGCAAATGC	Empleado en el RACE 3'. Diseñado en base al fragmento de 159 pb del cDNA de MTPA.
Inverso GSP ₁	CTTGCTAGCGCATTCTCCTTCG	Empleado en el RACE 5'. Diseñado en base al fragmento de 159 pb del cDNA de MTPA.
GeneRacer™ 3'	GCTGTCAACGATACGCTACGTAACG	Empleado en el RACE 3'. Suministrado con el kit.
GeneRacer™ 5'	CGACTGGAGCACGAGGACACTGA	Empleado en el RACE 5'. Suministrado con el kit.
Directo MTPA	ACGAGTGTNTTTCCTGTCTCTGAAG	Usado para confirmar la secuencia de cDNA. Abarca desde el nucleótido de la posición -67 hasta el nucleótido de la posición -42 con respecto al sitio de iniciación de la traducción de la secuencia completa del cDNA.
Inverso MTPA	GGTGCTAACCGAACTCATGGA	Usado para confirmar la secuencia de cDNA. Abarca desde el nucleótido de la posición 579 hasta el nucleótido de la posición 600 con respecto al sitio de iniciación de la traducción de la secuencia completa del cDNA.

(Y=C+T, W=A+T, N=A+C+G+T, V=G+A+C, R=A+G, B=G+T+C, S=G+C)

* Sin tener en cuenta la Met del N-terminal.

III.6 Amplificación de los extremos 5' y 3' del cDNA de la metalotioneína de *P. argus* mediante la técnica de RACE (Rapid Amplification cDNA Ends).

La obtención de la secuencia hacia los extremos 5' y 3' del cDNA, a partir del fragmento de secuencia obtenido por RT-PCR, se llevó a cabo mediante la técnica de RACE (*Rapid Amplification cDNA Ends*) empleando el *kit: GeneRacer*, de la casa comercial Invitrogen. El RNA total (5 µg) fue tratado con la enzima fosfatasa intestinal de ternero (*FIT*) (10 U) durante 1 hora a 50°C, en presencia de 10 U de *RNasin* y tampón de reacción (Tris-HCl 50 mM pH 8.5, EDTA 0.1 mM) en 10 µl de volumen final, para eliminar los grupos fosfatos del extremo 5' de los mRNA truncados e impedir así que luego puedan unirse al Oligo RNA 5'. Seguidamente, se precipitó y se separó el RNA de la enzima (según las recomendaciones del *kit*). Se resuspendió en un volumen de 7 µl de agua tratada con DEPC y se incubó durante 1 hora a 37°C con la enzima pirofosfatasa ácida del tabaco (*PAT*) (0.5 U), en presencia de 10 U de *RNasin* y tampón de reacción (acetato de sodio 50 mM pH 6.0, EDTA 1 mM, β-ME 0.1%, Tritón X-100 0.01%) en 10 µl de volumen final, para eliminar la estructura "cap" 5' de los mRNA intactos (enteros) y dejar así un grupo fosfato (requerido para unirse al Oligo RNA 5') en este extremo. Transcurrida esta incubación, se precipitó el RNA al igual que en el paso anterior, y se resuspendió en un volumen de 6 µl de agua tratada con DEPC para proceder a la unión del Oligo RNA al extremo 5' (Fig. 12). Para ello se resuspendieron 250 ng del Oligo RNA 5'-CGACUGGAGCACGAGGACACUGACAUGGACUGAAGGAGUAGAAA-3' suministrado por el *kit* en los 6 µl que contenían el RNA y se trató con la enzima ligasa (5 U) durante 1 hora a 37°C, en presencia de 10 U de *RNasin*, 1 mM de ATP y tampón (Tris-acetato 33 mM pH 7.8, acetato de potasio 66 mM, acetato de magnesio 10 mM, DTT 0.5 mM) en un volumen final de 10 µl. Seguidamente, se precipitó el RNA y se guardó a -20°C.

Al día siguiente, el RNA se resuspendió en 13 µl de agua tratada con DEPC y se incubó con oligo dT (5'-CTGTCAACGATACGCTACGTAACGGCATGACAGTG(T)₁₈-3') (1.72 µM), suministrado por el *kit*, durante 5 minutos a 70°C. Seguidamente, se incubó con la enzima *RT* (5 U) procedente del virus de la mieloblastosis de aves (AMV) durante 1 hora a 42°C, en presencia de 20 U de *RNasin*, 1.25 mM de cada dNTP y tampón (Tris-HCl 25 mM pH 8.3, MgCl₂ 5 mM, KCl 50 mM, DTT 2 mM) en un volumen final de 20 µl. Transcurrida esta reacción, la muestra se incubó durante 2 minutos a 94°C para inactivar la enzima *RT*. El cDNA así generado, seguidamente

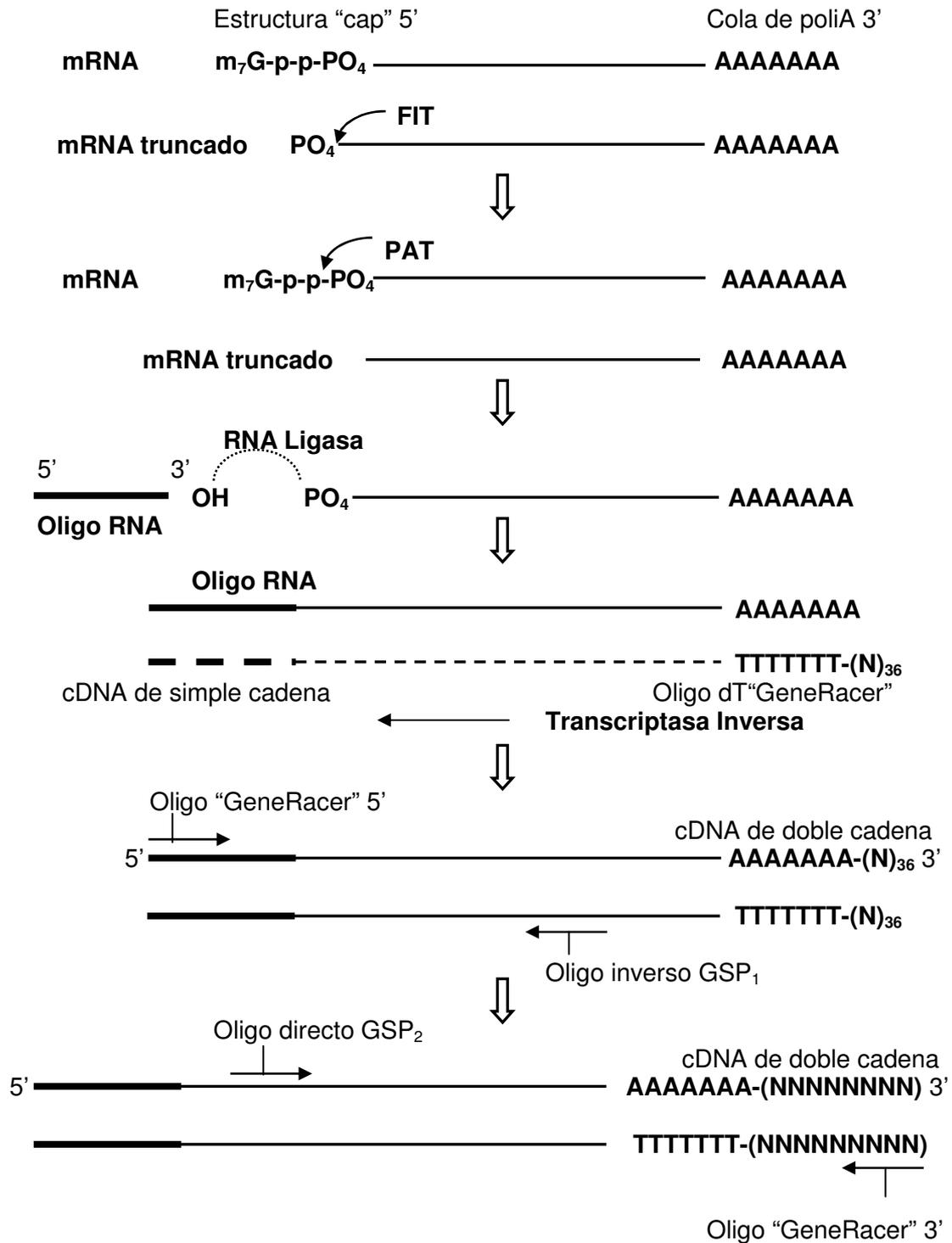


Figura 12. Esquema de la reacción de RACE (*Rapid Amplification cDNA Ends*). FIT: fosfatasa intestinal de ternero. PAT: pirofosfatasa ácida del tabaco. El tratamiento con la enzima FIT elimina los grupos fosfatos del extremo 5' de los mRNA truncados para que luego no puedan unirse al Oligo RNA. El tratamiento con la enzima PAT elimina la estructura "cap" 5' de los mRNA intactos (enteros) dejando un grupo fosfato (requerido para unirse al Oligo RNA) en este extremo. GSP₁ y GSP₂: oligos sintéticos específicos diseñados a partir del fragmento de secuencia conocido. El resto de los oligos son suministrados por el *kit*.

se amplificó mediante la reacción de PCR empleando la enzima *Taq* DNA polimerasa (Biotools). La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 50 μ l que contenía 2 μ l del producto de reacción de la *RT* (previamente diluido 1:4) y el resto de los componentes descritos en el apartado III.5, en las mismas concentraciones. En la reacción hacia el extremo 5' se utilizó como oligonucleótido sintético en el sentido inverso GSP₁ y en el sentido directo el oligo "GeneRacer" 5' suministrado por el *kit* (Tabla 3). En la reacción hacia el extremo 3' se utilizó como oligonucleótido sintético en el sentido directo GSP₂ y en el sentido inverso el oligo "GeneRacer" 3' (Tabla 3). Los oligonucleótidos GSP₁ y GSP₂ flanquean un fragmento de aproximadamente 120 pb de la región codificante de MTPA, como se observa en la Figura 12. La PCR consistió en un primer paso a 94°C 2 minutos, 5 ciclos a 94°C 30 segundos, 69°C 30 segundos, 72°C 1 minuto; 28 ciclos de 94°C 30 segundos, 67°C 30 segundos, 72°C 1 minuto, y finalmente un paso a 72°C 10 minutos. Concluida la reacción las muestras se llevaron a 4°C y el DNA resultante se sometió a electroforesis en las condiciones que en el próximo apartado se detallan.

III.7 Electroforesis de los productos de la PCR y cuantificación de las bandas.

Para la separación e identificación de los productos de la PCR, se empleó la técnica de electroforesis en geles sumergidos de agarosa. Los geles se prepararon al 2% (salvo excepciones que se especifican en el capítulo *Resultados* y en el apartado III.10.2 de este capítulo) con el mismo tampón de electroforesis TBE (Tris-borato 0.09 M, EDTA 0.02M pH 8.0) (Sambrook y col., 1989). En todos los casos, a 15 μ l de cada una de las muestras procedentes de la reacción de PCR, se añadieron 3 μ l de tampón de carga 6x (azul de bromofenol 0.25% (p/v), xileno cianol 0.25% (p/v), glicerol en agua 50% (v/v)). Como marcador de peso molecular se empleó 0.5 μ g de marcador en escalera de 100 pb (Roche) en un volumen final de 6 μ l al que se añadieron 1 μ l de tampón de carga 6X. Las muestras fueron sometidas a un campo eléctrico de 100 mA de intensidad hasta lograr una separación conveniente. Concluida la electroforesis, el gel fue teñido con bromuro de etidio (10 μ g/ml) durante 5 minutos, lavado en agua bidestilada durante 30-40 minutos y después fotografiado, en película Polaroid, sobre un transiluminador de luz ultravioleta.

La densidad óptica de las bandas fue cuantificada por densitometría, empleando un densitómetro GS-690 y el programa informático Multi-Analyst 1.1, ambos de Bio-Rad. Los niveles de amplificación fueron expresados relativos al rRNA 18S, como

control interno de la cantidad de cDNA en cada reacción. Mediante este procedimiento solamente se obtiene la expresión relativa de los mRNAs, y no su concentración real.

III.8 Proceso de clonaje de los productos de la PCR.

III.8.1 Formación de los plásmidos recombinantes.

Los productos de la PCR se clonaron sin ser purificados previamente a partir de la agarosa empleando el *kit* de clonaje *Topo TA Cloning Kit for Sequencing* (Invitrogen) que utiliza como vector de clonaje el plásmido pCR 4-TOPO (Fig. 13). Este *kit* permite unir el inserto a clonar al vector sin necesidad de la enzima ligasa ya que se basa en la acción de la enzima topoisomerasa I del virus *Vaccinia*. El principio del *kit* se basa en que las enzimas *Taq* DNA polimerasas tienen una actividad transferasa terminal que añade una desoxiadenosina (A) a los extremos 3' de los productos de PCR, lo cual permite que éstos se ligan eficientemente al plásmido mediante la

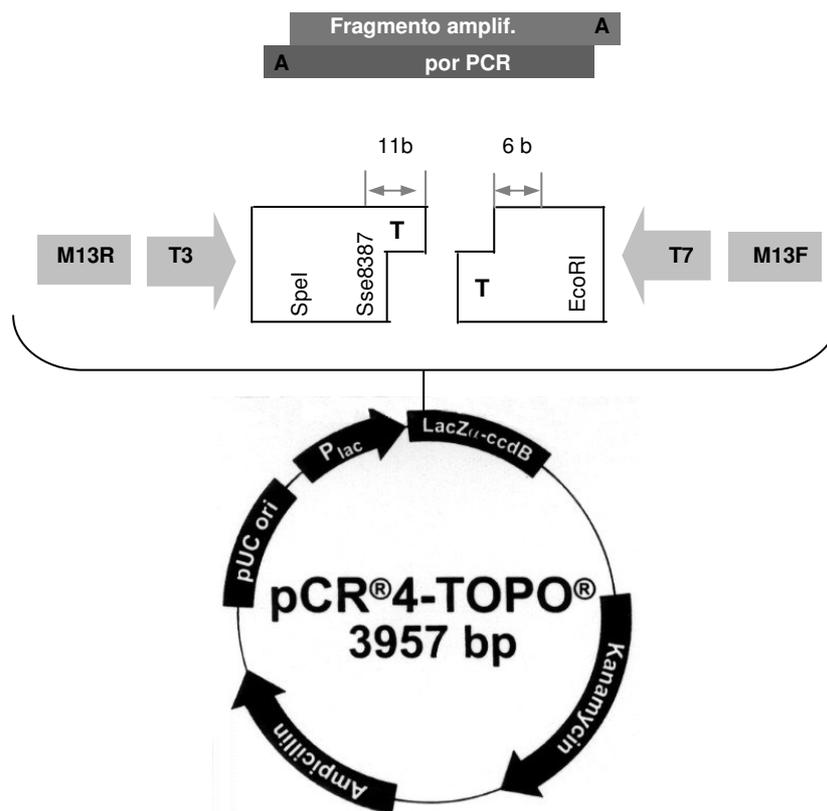


Figura 13. Esquema del plásmido pCR 4-TOPO con su sitio de policlonaje. En cursiva aparecen señaladas las diferentes enzimas de restricción que pueden cortar el sitio de policlonaje. *EcoRI* corta a ambos lados del sitio de inserción (11 pb hacia el extremo 5' y 6pb hacia el extremo 3'). Con flechas grises se indican los cebadores que se pueden emplear en la secuenciación.

acción de la topoisomerasa, ya que el mismo viene linearizado y con una timidina (T) saliente en cada extremo 3' de la doble cadena de DNA. En el vector pCR 4-TOPO el sitio de policlonaaje esta situado en el interior del gen (*lacZ*) y posee genes de selección para la resistencia a los antibióticos ampicilina y kanamicina.

Los fragmentos a clonar (4 μ l del producto de PCR) fueron incubados con el vector (1 μ l, 10 ng) y la solución salina (1 μ l) suministrada por el *kit* (NaCl 1.2 M, MgCl₂ 60 mM) durante 30 minutos a temperatura ambiente (22-23°C). Transcurrida esta incubación la mezcla se llevó a hielo o se almacenó a -20°C en los casos en que no se realizó seguidamente la transformación.

III.8.2 Transformación de las bacterias competentes.

Se emplearon bacterias *E. coli Top 10* ya competentes, suministradas por el *kit* de Invitrogen. La transformación se realizó mediante choque térmico (Sambrook y col., 1989). Tras añadir 2 μ l de la mezcla de reacción del apartado anterior (plásmido recombinante) a las bacterias competentes *Top 10* (50 μ l), la mezcla se dejó reposar en hielo durante 15 minutos. Transcurrido este tiempo la mezcla se incubó durante 30 segundos a 42°C y luego se volvió a llevar a hielo. Se le añadió 250 μ l de medio SOC suministrado por el *kit* y se dejó crecer durante una hora a 37°C en agitación.

III.8.3 Selección de los clones positivos.

El cultivo de transformantes en medio líquido se sembró (20-50 μ l) en placas de medio LB sólido (Sambrook y col. 1989) preparadas con ampicilina (50 μ g/ml) (Boehringer Mannheim), sobre las que previamente se habían extendido 60 μ l de 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido (X-gal) (Boehringer Mannheim) disuelto en dimetilformamida en proporción 20 mg/ml y 4 μ l de isopropil- β -D-tiogalactopiranosido (IPTG) (Sigma) 4 M. El X-Gal es un agente cromógeno, sustrato artificial de la β -galactosidasa, cuya digestión enzimática genera un intermediario de color azul. Asimismo, el IPTG es un inductor del operón lactosa (Sambrook y col., 1989). De esta forma, las bacterias que contengan el plásmido recombinante serán incapaces de expresar el gen de la β -galactosidasa y presentarán un color blanco o incoloro, mientras aquellas bacterias que contengan el plásmido sin inserto serán de color azul.

Tras una noche de incubación a 37°C, se seleccionaron las colonias de color blanco (positivas) y se crecieron en 2.6 ml de medio LB en presencia de 50 μ g/ml de

ampicilina durante otra noche a 37°C en agitación. Al otro día se tomaron 2.4 ml de las colonias que crecieron en esta segunda selección y se les extrajo el DNA plasmídico por el procedimiento de lisis alcalina (minipreparaciones) (Sambrook y col., 1989) con el fin de comprobar si tenían plásmidos recombinantes. Para ello se empleó el *kit Wizard Plus Minipreps DNA Purification Systems* (Promega). Los 200 µl restantes se guardaron a 4°C para volver a crecer a partir de ellos las colonias que dieran positivas y poderlas guardar para posteriores fines.

El DNA plasmídico aislado se resuspendió en 50 µl de agua estéril. Para comprobar si tenían insertos, y el tamaño de éstos, 4 µl de plásmidos se digirieron con 15 unidades de *EcoRI* (Amersham Pharmacia Biotech) durante una hora a 37°C, en el tampón suministrado por la casa junto con la enzima y en un volumen final de 10 µl. Una vez digeridas, las distintas muestras se separaron en un gel de agarosa como se describe en el apartado III.7. Aquellas que presentaron el inserto de interés fueron secuenciadas en el Servicio Interdepartamental de Investigación (SIDI) de la Universidad Autónoma de Madrid, empleando el *kit BigDye Terminators* (versión 3) y el secuenciador automático Abi Prism 3700 (Applied Biosystems). Por otro lado se tomaron 50 µl de los 200 µl de cultivo guardado y se crecieron en 4 ml de medio LB con 50 µg/ml de ampicilina durante toda la noche a 37°C en agitación. Al día siguiente se guardaron alícuotas (200 µl) de cada cultivo (clon) a -70°C en glicerol al 20%.

III.9 Traducción de las secuencias nucleotídicas a secuencias aminoacídicas y análisis de éstas.

La secuencia completa del cDNA de MTPA se obtuvo por solapamiento de las secuencias de los fragmentos obtenidos en los RACE 5' y 3' (apartado III.6), y se confirmó mediante RT-PCR empleando los oligos Directo MTPA e Inverso MTPA (Tabla 3), diseñados sobre las regiones UTR 5' y 3'. La búsqueda de semejanza de la secuencia completa de cDNA obtenida, con las secuencias nucleotídicas ya conocidas y disponibles en las bases de datos, fue llevado a cabo mediante la Herramienta de Búsqueda de Alineamiento Local Básico "*Basic Local Alignment Search Tool*" (BLAST) (Altschul y col., 1990), disponible en el sitio web: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>. La traducción de las secuencias nucleotídicas a secuencias aminoacídicas se realizó mediante la herramienta *on line* disponible (<http://us.expasy.org/tools/dna.html>) del Servidor de Biología Molecular *ExpPASy* "*Expert Protein Analysis System*" (Appel y col., 1994) del Instituto Suizo de Bioinformática (SIB).

Una vez determinado el marco de lectura correcto en la traducción, el grado de homología de MTPA con el resto de las secuencias aminoacídicas conocidas de

metalotioneínas de crustáceos, así como el alineamiento con dichas secuencias se realizó mediante los programas FASTA (v3) (Pearson y Lipman, 1988) y ClustalW (v1.8) (Thompson y col., 1994), respectivamente, disponibles en el sitio web (<http://www.ebi.ac.uk/services/index.html>) del Instituto Europeo de Bioinformática (EBI). En el ClustalW se usó la matriz Gonnet 250 y los siguientes parámetros de brecha-proteína (*protein-gap*): una distancia de separación de brecha (*gap open*) de 8 y la función de penalidad para aumentar la probabilidad de aparición de brechas por residuos específicos y residuos hidrofílicos activada. Estos parámetros se refieren al máximo número (8) de residuos aminoacídicos que se pueden “correr” en el alineamiento y al aumento de probabilidad de “corrimiento” que provocan aminoácidos específicos como glicina y aminoácidos hidrofílicos, que frecuentemente forman lazos en las proteínas. En el programa FASTA se usó la matriz BLOSUM50 y una *gap open* de 10.

El cálculo teórico del peso molecular y el punto isoeléctrico de MTPA se realizó mediante la herramienta ProtParam disponible en sitio web de ExPASy: <http://www.expasy.ch/tools/protparam.html>.

III.10 Exposición a cadmio de explantes de distintos tejidos de *P. argus*.

Las langostas fueron anestesiadas sobre hielo y su caparazón fue lavado con etanol absoluto. Los tejidos (hepatopáncreas, músculo, intestino y tejido nervioso) fueron transferidos a placas petri estériles conteniendo 30 ml de solución salina de Panulirus (SP) (458 mM NaCl, 13.4 mM KCl, 13.4 mM Na₂SO₄, 13.6 mM CaCl₂, 9.8 mM MgCl₂, 2 mM D-glucosa, 10 mM HEPES, pH 7.4), suplementada con estreptomina (100 µg/ml), penicilina (100 U/ml) y anfotericina-B (2.5 µg/ml) (Zhainazarov y col., 2001). De 200 a 400 mg de cada tejido fueron lavados con 50 ml de SP estéril y el intestino fue además perfundido con esta solución. Una vez lavados, los tejidos se incubaron a 22°C en 25 ml de medio M199, con o sin 25 µM de CdCl₂, de acuerdo al rango de concentración de Cd empleado en experimentos de exposición a este ión en *C. elegans* (Swain y col., 2004). El medio de cultivo fue adaptado para invertebrados marinos por adición de: 8.3 mM Na₂SO₄, 293 mM NaCl, 10.3 mM KCl, 13.4 mM Na₂SO₄, 33 mM CaCl₂, 12.9 mM MgCl₂, 4.1 mM NaHCO₃, pH 7.4 (Cancre y col., 1995); y suplementado con 20% de FBS inactivado, estreptomina (100 µg/ml), penicilina (100 U/ml) y anfotericina-B (2.5 µg/ml) (Brouwer y Hoexum-Brouwer, 1998). Todas las soluciones usadas fueron esterilizadas por filtración a través de membranas

de 0.2 μm . Después de una incubación de 5 horas, los explantes de tejido fueron lavados con medio sin Cd, congelados inmediatamente en N_2 líquido, y almacenados a -70°C hasta su posterior análisis.

III.11 Expresión recombinante de la metalotioneína de *P. argus* (MTPA).

III.11.1 Obtención y clonaje de la región codificante del cDNA de MTPA .

La región codificante del cDNA de MTPA fue amplificada por PCR a partir de los clones positivos obtenidos según lo descrito en el apartado III.8.3. El cebador utilizado en el sentido directo fue el 5'CCCGGATCCCCTGGTCCCTGCTGCATC3', y en el inverso el 5'CGGGTTCGACCTAAGGGCAGCATTGCA3'. Los cebadores fueron diseñados de manera tal que se introdujera un sitio de restricción *Bam*HI inmediatamente antes del sitio de iniciación ATG, y un sitio de restricción *Sal*I inmediatamente después del codón de parada de la traducción. Las condiciones del PCR consistieron en desnaturalización a 94°C 4 minutos, 35 ciclos de 94°C 30 segundos, 55°C 1 minuto, 72°C 1 minuto, y finalmente un paso de extensión a 72°C 10 minutos. Los productos de PCR se corrieron en un gel de agarosa 1.2% en TBE, según lo descrito en el apartado III.7.

La banda de 180 pb correspondiente a la región codificante de MTPA se purificó empleando el *kit* de purificación a partir de agarosa *QIAQuick Gel Extraction Kit* (QIAGEN) y se clonó en el plásmido pSTBlue-1 (Fig. 14) con el *kit* de clonaje por extremos romos *Perfectly Blunt Cloning Kit* (Novagen) en las condiciones que a continuación se describen. Los extremos del producto de PCR purificado (2 μl , \approx 40 ng) se convirtieron a extremos romos fosforilados utilizando la "End Conversion Mix" (contiene la enzima polinucleótido quinasa -PQ-, ATP y tampón de PQ) (5 μl) suministrada por el *kit*, completando con agua estéril a un volumen final de 10 μl e incubando a 22°C , 15 minutos. Transcurrida esta incubación la mezcla se calentó a 75°C , 5 minutos, para inactivar la quinasa, se enfrió, y se le añadió 1 μl (50 ng) de pSTBlue-1 y 4U de T4 DNA-ligasa (Fermentas). La reacción de ligación transcurrió a 22°C , 2 horas. El plásmido ya venía linearizado con la enzima *Eco*R V y con extremos desfosforilados para disminuir el número de religantes.

La transformación de bacterias *E. coli* XL-Blue-1 competentes ("caseras", obtenidas según Sambrook y col., 1989) se realizó igual que en el caso de las *E. coli* *Top-10* (apartado III.8.2.), con la diferencia de que se pusieron 6 μl del producto de ligación para 100 μl de bacterias competentes, y el choque térmico a 42°C fue de

2 minutos en lugar de 30 segundos. El análisis de los clones positivos, el aislamiento del DNA plasmídico, así como el análisis de restricción de dichos clones con la enzima *EcoR* I (Amersham Pharmacia Biotech), que corta a ambos sitios del sitio de inserción (Fig. 14), se realizó según lo descrito en el apartado III.8.3.

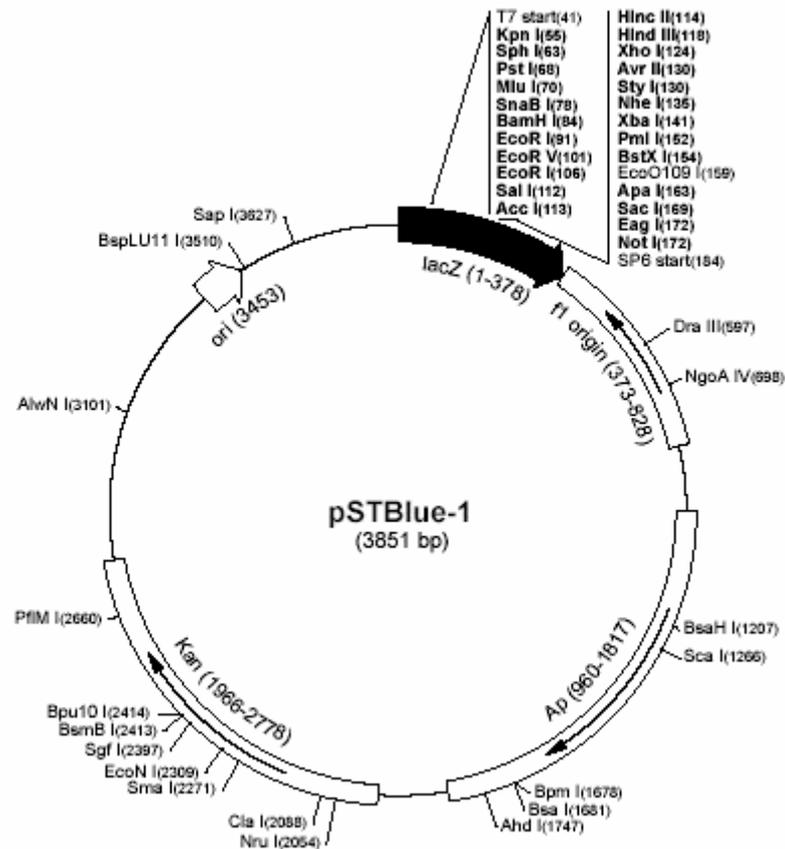


Figura 14. Mapa del plásmido pSTBlue-1. Resaltadas en negro se señalan las enzimas de restricción que cortan el sitio de policonaje. El sitio de inserción está ubicado en el nucleótido 101 donde corta la enzima *EcoR* V.

III.11.2 Subclonaje de la región codificante de MTPA en un plásmido de expresión.

La región codificante del cDNA de MTPA, amplificada y clonada como ha sido descrito en el apartado anterior, fue subclonada en el plásmido de expresión en *E. coli* pGEX-4T-1 (Fig. 15), donado gentilmente por el grupo de la Dra. Sílvia Atrian. Como se observa en la Figura 14, los plásmidos pGEX-4T-1 están diseñados para una sobreexpresión inducible de fragmentos de genes como proteínas de fusión a la enzima glutatión-S-transferasa (GST) de *Schistosoma japonicum*. Las proteínas de

fusión se purifican a partir de los lisados celulares por cromatografía de afinidad usando Glutación-Sepharosa 4B como matriz. La separación de la proteína de interés a partir de la proteína de fusión se logra utilizando la proteasa trombina, cuya secuencia de reconocimiento está situada hacia el extremo 5' del sitio de policlonaje (Fig. 15).

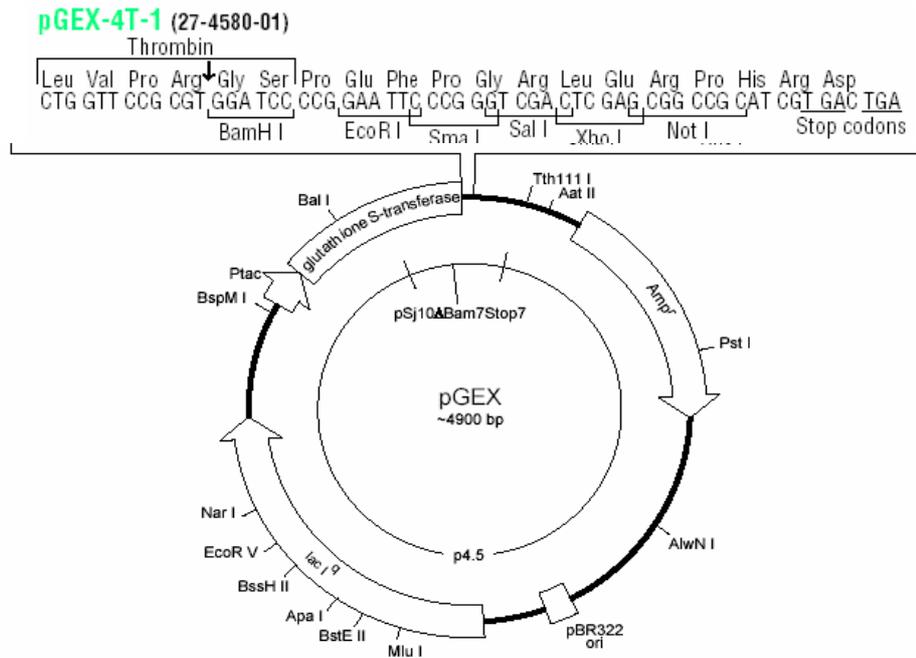


Figura 15. Mapa general de un plásmido pGEX con el sitio de policlonaje del plásmido pGEX-4T-1. En la parte superior aparecen señaladas las enzimas de restricción que cortan el sitio de policlonaje, así como la secuencia de corte reconocida por trombina.

El proceso de subclonaje se hizo de la siguiente manera: el DNA plasmídico de pSTBlue-1 (40 μ L) de los clones positivos obtenidos en el apartado anterior se digirió con las enzimas de restricción *SalI* (20 U) y *BamHI* (20 U) (Fermentas) simultáneamente 1 hora, a 37°C, en tampón *Y+/Tango* (33 mM Tris-acetato, 10 mM acetato de magnesio, 66 mM acetato de potasio, 0.1 mg/ml BSA, pH 7.9) (Fermentas) para extraer el fragmento codificante de MTPA.

Por otro lado, el plásmido pGEX-4T-1 fue purificado a partir de bacterias DH5 α (clones donados gentilmente por la Dra. Sílvia Atrian) mediante el *kit* de lisis alcalina *QIAfilter Plasmid Midi Kit* (QIAGEN). 4 μ g de dicho plásmido se digirieron con *SalI/BamHI* en las mismas condiciones que el DNA plasmídico de pSTBlue-1.

Las mezclas de digestión tanto del fragmento codificante de MTPA/ pSTBlue-1, como del plásmido pGEX-4T-1 se aplicaron a una electroforesis en agarosa 1.2 y 0.8%, respectivamente (ver apartado III.7.) y las bandas de interés (fragmento codificante de MTPA y pGEX-4T-1 linearizado) se purificaron mediante el *QIAQuick Gel Extraction Kit* (QIAGEN).

La región codificante de MTPA (77 ng) con extremos cohesivos *Sall/BamHI* se puso a ligar con pGEX-4T1 (132 ng) con extremos cohesivos complementarios *Sall/BamHI*, durante 3 horas a 22°C en presencia de Ligasa T4 (1U) (Fermentas) en tampón de Ligasa T4 (Fermentas) en un volumen final de 10 µl.

Luego se transformaron bacterias *E. coli* XL-Blue-1 (apartado III.10.1), y los clones positivos se sometieron a un análisis de restricción con *Sall/BamHI*, según lo descrito en el apartado III.8.3.

El plásmido pGEX-4T-1, así como la construcción pGEX-4T-1/MTPA fueron utilizados para transformar bacterias *E. coli* BL-21 competentes (“caseras”, obtenidas según Sambrook y col., 1989 y cedidas gentilmente por la Dra. Sílvia Atrian) según lo descrito en el apartado III.10.1. Esta cepa de *E. coli* carece de las proteasas endógenas OmpT y Lon y por eso se utiliza para expresar altos niveles de proteínas de fusión GST. Los clones positivos se congelaron en 20% glicerol a -70°C hasta su uso según lo descrito en el apartado III.8.3. La secuencia de la construcción pGEX-4T-1/MTPA fue confirmada por secuenciación automática en el Servicio Interdepartamental de Investigación (SIDI) de la Universidad Autónoma de Madrid según lo descrito en el apartado III.8.3, para comprobar que tenía el marco de lectura correcto.

III.11.3 Expresión de MTPA con fines analíticos.

Para sobreexpresar MTPA en bacterias *E. coli* BL-21 se utilizaron cultivos a pequeña escala (2 ml) con fines analíticos y a mayor escala (400 ml) con fines preparativos. Durante los estudios de expresión a pequeña escala se analizó la concentración de IPTG óptima para la inducción de la expresión, así como la cantidad de proteína de fusión GST-MTPA expresada en forma soluble por ml de cultivo a través de la medición de la actividad de la GST.

III.11.3.1 Optimización de la concentración de IPTG para la inducción de la expresión.

Para optimizar la concentración de IPTG necesaria para inducir la expresión de la proteína de fusión GST-MTPA, las bacterias transformantes (tanto con pGEX-4T-1/MTPA como con pGEX-4T-1 solamente) se crecieron en 4 ml de medio LB en presencia de 50 µg/ml de ampicilina durante toda la noche a 37°C en agitación. Al día siguiente 50 µl de dicho cultivo se inocularon en 2 ml de medio LB en presencia de 0.3 mM ZnCl₂, 50 µg/ml de ampicilina y se crecieron en agitación a 37°C hasta que la absorbancia a 600 nm alcanzó el valor de 0.6 (lo que indica que el cultivo está en fase de crecimiento exponencial). En ese momento se apagó la temperatura del baño y se indujo la expresión añadiendo IPTG hasta 0, 50, 100 y 200 µM. Al cabo de 3 horas de agitación se tomaron 0.3 ml de cada cultivo, se centrifugaron en minifuga a velocidad máxima 1 min, y el sedimento de bacterias se resuspendió en 100 µl de tampón de muestra de SDS-PAGE 2 x (SDS 4%, glicerol 20%, Tris 125 mM pH 6.8, β-ME 10%, azul bromofenol 0.004%). Las muestras se hirvieron 15 min antes de ser aplicadas a una SDS-PAGE al 15% (apartado III.11). Luego de visualizar las bandas por tinción con Azul de Coomassie 0.25% en metanol 50%, ácido acético 7% (apartado III.11), la cuantificación de las mismas por densitometría se realizó con un densitómetro GS-690 y el programa informático Multi-Analyst 1.1 de Bio-Rad.

III.11.3.2 Cuantificación de la proteína de fusión GST-MTPA soluble.

Para determinar la cantidad de proteína de fusión GST-MTPA expresada en forma soluble se determinó la actividad de la enzima GST en los lisados bacterianos. Para cumplir con este objetivo se indujo la expresión tanto de la GST, como de la proteína de fusión GST-MTPA con 100 µM de IPTG (concentración óptima determinada en el apartado anterior), según lo descrito en el apartado III.11.3.1. Los 2 ml de cultivo se centrifugaron 2 min a velocidad máxima en una microcentrífuga a 4°C, se resuspendieron en 1 ml de PBS frío (0.14 M NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1.8 mM KH₂PO₄, pH 7.3) y se volvieron a centrifugar en las mismas condiciones. Las bacterias se resuspendieron en 150 µl de PBS frío con β-ME 0.5% y se sonicaron en un UP 200 S *Ultrasonic Processor* (dr.hielscher, GmbH) con sonotrodo S2/Micro Tip 2 (Ø2mm), 5 pulsos de 30 % amplitud durante 10 segundos cada uno, a 4°C. El lisado se centrifugó a velocidad máxima en una microcentrífuga durante 20 min, 4°C y el sobrenadante se utilizó para la determinación de la actividad GST.

La GST es una enzima que cataliza la conjugación de 1-Cloro-2,4-dinitrobenzoceno (CDNB) con glutatión reducido, que resulta en un producto CDNB-glutatión que absorbe a 340 nm ($\epsilon = 9.6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$). La actividad GST puede ser determinada tanto con los lisados crudos de bacterias como con proteínas de fusión GST purificadas. En el ensayo, una muestra que contiene proteína de fusión GST (5-40 μl) es incubada en el tampón de reacción (fosfato de potasio 100 mM pH 6.5), conteniendo CDNB (1 mM) y glutatión reducido (1 mM) en un volumen de ensayo de 500 μl . El cambio en la absorbancia a 340 nm es monitoreado en un espectrofotómetro UV-VIS, y trabajando en la zona de velocidad inicial, se calcula $\Delta\text{DO}_{340 \text{ nm}}/\text{min}/\text{ml}$ mediante la siguiente ecuación:

$$\Delta\text{DO}_{340 \text{ nm}} / \text{min} / \text{ml} = \frac{\text{DO}_{340 \text{ nm}}(t_2) - \text{DO}_{340 \text{ nm}}(t_1)}{(t_2 - t_1) \cdot \text{ml}_{\text{muestra}}}$$

Luego, se calcula la cantidad de proteína de fusión con GST, basándonos en una curva patrón ($\Delta\text{DO}_{340 \text{ nm}} / \Delta t$ v.s $\mu\text{g GST} / \text{ml}$ ensayo) previamente realizada. La ecuación de la curva patrón obtenida fue la siguiente:

$$Y = 0.0274 X + 0.0047, \quad r^2 = 0.9794, \quad \text{donde } Y \text{ es } \Delta\text{DO}_{340 \text{ nm}} / \Delta t$$

X son los $\mu\text{g GST} / \text{ml}_{\text{ensayo}}$

La curva patrón fue realizada con la GST de hígado de caballo (Sigma) y comprendió el intervalo entre 0.6 y 5.3 $\mu\text{g}/\text{ml}_{\text{ensayo}}$ de GST. Una unidad de actividad enzimática GST se define como la cantidad de enzima que cataliza la unión de 1 μmol de CDNB y glutatión reducido por minuto a pH 6.5 y $T = 25^\circ\text{C}$.

El cálculo de la cantidad de proteína de fusión con GST se realizó según la siguiente ecuación:

$$\text{Prot.fusión } (\mu\text{g}/\text{ml}) = \frac{\frac{\Delta\text{DO}_{340 \text{ nm}}}{\Delta t} - 0.0047}{0.0274} \times \frac{0.5 \text{ ml}}{V_{\text{muestra}}} \times \text{dilución}$$

III.11.4 Expresión de MTPA con fines preparativos.

Para sobreexpresar MTPA en la cepa *E. coli* BL-21 con fines preparativos, se crecieron las bacterias transformantes en 10 ml de medio LB en presencia de 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$

de ampicilina durante toda la noche a 37°C en agitación. Al día siguiente dicho cultivo se inoculó en 400 ml de medio LB en presencia de 0.3 mM ZnCl₂ y 50 µg/ml de ampicilina, y se creció en agitación a 37°C hasta que la absorbancia a 600 nm alcanzó el valor de 0.6. En ese momento se apagó la temperatura del baño y se indujo la expresión añadiendo IPTG hasta 100 µM. Al cabo de 3 horas de agitación se centrifugó a 7700 g, 10 min, a 4°C en centrífuga Beckman. El sedimento de bacterias se resuspendió en 40 ml de PBS frío y se centrifugó a 4500 g 10 min, a 4°C. El sobrenadante se desechó y el sedimento bacteriano se guardó a -70°C hasta su uso.

III.11.5 Purificación de MTPA.

III.11.5.1 Cromatografía de afinidad en Glutación-Sepharosa 4B.

El sedimento bacteriano guardado a -70°C se resuspendió en 20 ml PBS, 0.5% β-ME, 0.1 mM PMSF frío y se sonicó (en alícuotas de 5 ml) en hielo en un UP 200 S *Ultrasonic Processor* (dr.hielscher, GmbH) con sonotrodo S2/Micro Tip 2 (Ø2mm), 5 pulsos de 80% amplitud durante 10 segundos cada uno. El lisado se centrifugó a 12000 g, 15 min, a 4°C en centrífuga Beckman. El sobrenadante se colectó, se le midió el volumen y se guardó una alícuota (Lis) de este para la realización de los ensayos de actividad enzimática de GST, determinación de concentración de proteínas y electroforesis en SDS-PAGE al 12.5%.

El sobrenadante se mezcló en un tubo Falcon de 50 ml con 1 ml de Glutación-Sepharosa 4B (Amersham) al 50% en PBS, 0.5% β-ME y se agitó por inversión en una noria 30 min a temperatura ambiente. Transcurrido ese tiempo de fijación, la mezcla se transfirió por tandas a una columna de 1.6 cm x 2.5 cm (Ø_{interno} x altura), centrifugando a 500 g durante 15 segundos, y se colectó la fracción no-fijada (NF) para medir su volumen y tomar una alícuota para la realización de los ensayos de actividad enzimática de GST, determinación de concentración de proteínas y SDS-PAGE al 12.5%. Posteriormente la matriz se lavó 3 veces con 2 ml de PBS por centrifugación en las condiciones ya descritas.

III.11.5.2 Digestión de la proteína de fusión GST-MTPA con trombina.

Gracias al sistema de expresión utilizado (apartado III.11.2), GST y MTPA están unidas en la proteína de fusión por una secuencia de aminoácidos que es reconocida por trombina. Es por ello que la matriz con la proteína de fusión fijada se incubó con 50U de trombina en 1 ml de PBS durante 20 horas a temperatura ambiente

y agitando la columna por inversión en una noria. Al cabo de ese tiempo la matriz se centrifugó a 500 g durante 15 segundos, se colectó lo fijado y se guardó una alícuota de esta fracción (F). A lo fijado se le burbujeó nitrógeno durante 10 min, se le añadió β -ME hasta 75 mM y se dejó a temperatura ambiente hasta su uso. La matriz se lavó 2 veces con 1 ml de PBS por centrifugación en las condiciones ya descritas, se colectaron estos lavados juntos y se guardó una alícuota (L).

La matriz se regeneró de la siguiente forma: primero se lavó por centrifugación 2 veces con 1 ml de PBS. Luego para eluir la GST unida a la matriz se añadió 1 ml de glutatión reducido (GSH) 10 mM en Tris-HCl 50 mM pH 8, y al cabo de una incubación de 10 min a temperatura ambiente la matriz se centrifugó y se guardó el eluato. Esta elución con GSH se repitió 3 veces y se guardaron alícuotas (E1, E2, E3 y E4).

Finalmente, a las alícuotas (Lis, NF, F, L, E1-4) se les determinó la concentración de proteínas, la actividad enzimática de GST y se les realizó un análisis por SDS-PAGE al 12.5% (apartado III.11).

III.11.5.3 Cromatografía en Sephadex G-50.

La fracción fijada (F) (\approx 1 ml) de la cromatografía de afinidad se aplicó a una columna (0.7 cm x 25.7 cm; $\varnothing_{\text{interno}}$ x altura) de Sephadex G-50 fino (Amersham Pharmacia), equilibrado en tampón Tris-HCl 10 mM pH 8.6. La corrida cromatográfica se siguió midiendo la absorbancia a 226 nm, se colectaron alícuotas de aproximadamente 0.7 ml y el flujo fue de 0.16 ml/min. El pico de MTPA se colectó y se le midió el volumen, se le burbujeó nitrógeno durante 10 min, se alicuotó en volúmenes de 0.8-1ml, se liofilizó y se guardó en viales sellados, a 4°C hasta su uso. Una alícuota se resuspendió en 40 μ l de H₂O (Milli-Q 18.2 M Ω), se le determinó la concentración de proteínas y se aplicó a una SDS-PAGE al 12.5%.

III.12 Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida.

La separación de las proteínas presentes en las distintas fracciones de las etapas de la purificación, así como en los lisados bacterianos durante la expresión con fines analíticos, se llevó a cabo en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE) según el método descrito por Laemmli (1970), tal y como se describe a continuación. Las distintas muestras se resuspendieron en tampón de carga de electroforesis o tampón de Laemmli (62 mM Tris-HCl pH 6.8, 10% glicerol, 5% β -ME, 2% SDS y 0.001% azul de bromofenol) y se hirvieron durante 5 minutos (excepto los

lisados bacterianos que se hirvieron 15 minutos). Las muestras así tratadas se sometieron a una electroforesis en minigeles (Bio-Rad) de 1.5 mm de grosor, en el caso de los lisados bacterianos, y de 0.75 mm de grosor, en el caso de las fracciones de las etapas de la purificación. En la parte superior (gel concentrador) se utilizó un porcentaje de acrilamida del 3%, y en la parte inferior (gel separador) un porcentaje de 15 y 12.5% respectivamente. El tampón utilizado en la electroforesis estaba compuesto por 25 mM Tris, 192 mM glicina y 0.1% SDS. La electroforesis se realizó a 150 V constantes.

El análisis de las proteínas presentes en las distintas etapas del proceso de purificación se realizó además mediante geles de Tris-Tricina, según el método descrito por Schagger y von Jagow (1987). En el gel concentrador, en el espaciador y en el separador, se utilizó un porcentaje de acrilamida del 4, 10 y 16.5% respectivamente. El grosor del gel en este caso fue de 1.6 mm, y la electroforesis se corrió a 50 mA constantes hasta que la muestra alcanzó el gel espaciador y luego a 20 mA durante toda la noche.

La cantidad de proteína aplicada, así como los patrones de peso molecular, variaron tanto en los geles Tris-Gly como Tris-Tricina, y se especifican en el capítulo Resultados. Las bandas se visualizaron mediante tinción con Azul de Coomassie 0.25% en metanol 50%, ácido acético 7% durante 5 min, y posterior destinción con ácido acético 10%.

III.13 Determinación de la concentración de proteínas.

La concentración de proteínas se determinó por el método de Bradford (Bradford, 1976) empleando el reactivo *BIO-RAD Protein Assay* (BIO-RAD) y BSA como proteína patrón.

III.14 Análisis de aminoácidos.

Una alícuota de MTPA liofilizada en tampón Tris-HCl 10 mM pH 8.6, se resuspendió en 30 μ l de agua (milli-Q 18.2 M Ω) y se llevó a 70 μ l con NH₄Ac 20 mM pH 8.6. Seguidamente se le realizó un cambio de tampón mediante cromatografía en Sephadex G-25 medio (Amersham Pharmacia) en una columna de 3 ml (1.6 cm x 2.5 cm; $\varnothing_{\text{interno}}$ x altura), equilibrada en el mismo tampón (NH₄Ac 20 mM pH 8.6). La corrida cromatográfica se siguió midiendo la absorbancia a 226 nm, se colectaron alícuotas de aproximadamente 0.6 ml y el flujo fue a gravedad. Las fracciones que contenían el pico a 226 nm se unieron, se midió el volumen, se alicuotearon y se

liofilizaron. Una alícuota se reservó para la determinación del coeficiente de extinción molar de MTPA (apartado III.14), otra para la determinación de la estequiometría de unión MTPA/Zn por TXRF (apartado III.16.2), y a la tercera se le determinó cantidad de proteínas por análisis de aminoácidos en el Servicio de Síntesis de Péptidos de la Universidad de Barcelona. Para esto último la muestra se sometió a hidrólisis en HCl 6 N (1% fenol), 1 h a 155°C, se evaporó a sequedad y se disolvió en tampón citrato pH 2.2. Se analizaron 50 µl de esta solución en un analizador de aminoácidos Beckman 6300 system Gold.

III.15 Determinación del coeficiente de extinción molar.

Una alícuota de MTPA (apartado III.13) se resuspendió en 30 µl H₂O (Milli-Q 18.2 MΩ) y se llevó hasta 1 ml con HCl 0.1 N. Se leyó la absorbancia de varias diluciones de la muestra a 220 nm contra un blanco en las mismas condiciones. El coeficiente de extinción molar se calculó según la fórmula:

$$\epsilon^{220\text{nm}} (M^{-1} \text{cm}^{-1}) = \frac{\text{DO}_{220\text{nm}} \cdot \text{PM}}{c \cdot b},$$

donde $\epsilon^{220\text{nm}}$ es el coeficiente de extinción molar ($M^{-1} \text{cm}^{-1}$),
 $\text{DO}_{220\text{nm}}$ es la absorbancia a 220 nm,
 c es la concentración de la muestra en mg/ml,
 b es el paso de luz = 1 cm,
 PM es el peso molecular de MTPA (6175.2 D).

III.16 Obtención de TPA

La obtención de la forma apo (libre de metal) de MTPA se realizó mediante una adaptación del protocolo descrito por Vasak (1991). Una alícuota de MTPA liofilizada en tampón Tris-HCl 10 mM pH 8.6, se resuspendió en 40 µl de agua (milli-Q 18.2 MΩ) y se llevó a 300 µl con HCl 10 mM. Seguidamente se aplicó a una cromatografía en Sephadex G-25 medio (Amersham Pharmacia) en una columna de 3 ml (1.6 cm x 2.5 cm; $\varnothing_{\text{interno}}$ x altura), equilibrada en HCl 10 mM. La corrida cromatográfica se siguió midiendo la absorbancia a 220 nm, se colectaron alícuotas de aproximadamente 0.6 ml y el flujo fue a gravedad. Las fracciones que contenían el pico a 220 nm se unieron, se midió la absorbancia a esta longitud de onda, se midió el volumen, se alícuotearon y se liofilizaron. La cantidad de apo-metalotioneína liofilizada se calculó a partir del

valor de absorbancia a 220 nm utilizando el coeficiente de extinción molar determinado según el apartado III.14.

III.17 Determinación de la estequiometría de Zn unido a MTPA.

III.17.1 Espectrometría de Masas de Ionización por Electrospray (ESI-MS).

La estequiometría de unión MTPA/Zn se determinó mediante la diferencia de pesos moleculares entre las formas holo y apo de la proteína, determinados por Espectrometría de Masas de Ionización por Electrospray (ESI-MS) con HPLC-RP acoplado y por ESI-MS en modo directo (sin HPLC-RP acoplado), teniendo en cuenta que la masa de la forma holo es igual a (la masa de la forma apo + la masa de n Zn) – (la masa de $2n$ H); siendo n el número de iones Zn enlazados por la metalotioneína (Yu y col., 1993). En nuestro caso en particular:

$$n = \frac{M_{\text{holo}} - M_{\text{apo}}}{M_{\text{Zn}} - 2M_{\text{H}}} = \frac{M_{\text{holo}} - M_{\text{apo}}}{65.38 - 2} = \frac{M_{\text{holo}} - M_{\text{apo}}}{63.38}$$

donde, M_{holo} = masa molecular de la forma holo
 M_{apo} = masa molecular de la forma apo
 M_{Zn} = masa atómica del Zn
 M_{H} = masa atómica del H

III.17.2 HPLC-RP-ESI-MS

Los espectros ESI-MS con HPLC-RP acoplado se obtuvieron en el Servicio Interdepartamental de Investigación (SIDI) de la Universidad Autónoma de Madrid en un equipo VG AutoSpec (Fison/VG Instruments) con analizador cuadrupolar y fuente de ionización mediante electrospray a presión atmosférica (API-ES), acoplado a un HPLC 1100 MSD (Agilent Technologies), empleando las siguientes condiciones: voltaje capilar, 4000V; temperatura de la fuente, 335°C; potencial del cono, 40 V; presión del nebulizador, 50 psi y flujo de nitrógeno, 10 L/min.

19 µg de MTPA liofilizada (apartado III.15.1) se resuspendieron en 100 µl de H₂O (Milli-Q 18.2 MΩ). 40 µl se inyectaron para obtener la forma holo, y otros 40 µl se usaron para la forma apo de la proteína. Las condiciones cromatográficas del HPLC-RP para la forma apo fueron las siguientes: flujo 0.3 ml/min, columna Zorbax C18

300A de 15 cm x 2.1 mm, la fase móvil fue TFA 0.1% en acetonitrilo (eluyente A) y TFA 0.1% en agua (eluyente B). Se aplicó un gradiente de 90% de B hasta 5% de B en 30 min. Las condiciones cromatográficas para la forma holo fueron las siguientes: flujo 0.6 ml/min, columna Vydac C4 de 5 cm x 2 mm, fase móvil acetonitrilo (eluyente A) y acetato de amonio 10 mM en agua (eluyente B). Se aplicó un gradiente desde 90% B hasta 5% B en 30 min. Para ambas formas de la proteína la detección se realizó a 220 nm.

La deconvolución de los espectros de masas y el cálculo de los pesos moleculares, tanto de la forma holo como de la apo de MTPA, fueron realizados usando el programa (Agilent ChemStation) del equipo de HPLC 100 MSD.

III.17.3 ESI-MS en modo directo.

Se tomaron 25.6 µg de MTPA liofilizada en Tris-HCl 10 mM pH 8.6, y se resuspendieron en 100 µl de H₂O, que se repartieron de la siguiente forma: 50 µl se aplicaron a una columna de Sephadex G-25 equilibrada con formiato de amonio 3 mM pH 8.0 para obtener la forma holo y los otros 50 µl se aplicaron a una columna de Sephadex G-25 equilibrada con TFA 0.04% pH 2.5 para obtener la forma apo. Se recogieron fracciones de aproximadamente 0.7 ml en cada caso y el flujo fue a gravedad. Las fracciones con mayor absorbancia a 226 nm y a 220 nm, de la forma holo y la forma apo, respectivamente, se inyectaron a un flujo de 5 µl/min en un equipo LCQ Deca XP^{Plus} (Thermo Finnigan) con analizador cuadrupolar y fuente API-ES, empleando las siguientes condiciones: voltaje capilar, 4500V; temperatura de la fuente, 320°C; potencial del cono, 40 V y presión del nebulizador, 50 psi.

La identificación de los iones en los espectros de masas se hizo por comparación con los espectros obtenidos por Yu y col. (1993) para la apometalotioneína y la MT-2A-Zn₇ de hígado de conejo, y con los obtenidos por nosotros mediante HPLC-RP-ESI-MS.

III.17.4 Técnica de Fluorescencia de Rayos X por Reflexión Total (TXRF).

Con esta técnica la estequiometría de unión MTPA/Zn se obtuvo evaluando la relación másica Zn:S por TXRF en una muestra de MTPA. La TXRF fue realizada en el Servicio Interdepartamental de Investigación (SIDI) de la Universidad Autónoma de Madrid en un espectrofotómetro Seifert EXTRA-II (Rich Seifert & Co.), empleando una fuente de rayos X de molibdeno, ánodos de wolframio y molibdeno, y un detector de

Si(Li) con un área activa de 80 mm². La radiación fue filtrada a través de una película de Mo de 50 μm de grosor para optimizar el rango de energía utilizado (0 – 20 KeV). Las condiciones de excitación consistieron en aplicar una diferencia de potencial de 50 kV entre el filamento y el ánodo, y una intensidad variable entre 5 y 25 mA para obtener alrededor de 5000 cps en todas las mediciones, en un tiempo de conteo de 500 s.

La muestra fue preparada para el análisis por TXRF en las condiciones que a continuación se describen. Una alícuota de MTPA (en NH₄Ac 20 mM pH 8.6) liofilizada (aproximadamente 20 μg) se resuspendió en 100 μl de H₂O (Milli-Q 18.2 MΩ), se sonicó 30 minutos para disgregar las partículas de proteínas, y 5 μl de esta suspensión fueron depositados sobre un portamuestras de cuarzo. El tiempo de adquisición fue de 500 segundos con un tiempo muerto del 33%.

A partir de las unidades de masa relativa (u.m.r) de Zn con respecto al S (100%), se calculó la cantidad de Zn por molécula de proteína (n Zn), por regla de tres, teniendo en cuenta que cada molécula de proteína esta compuesta por 19 S:

$$n = \text{u.m.r (Zn)} \times 19/100$$

III.18 Construcción de un modelo preliminar de la estructura tridimensional del dominio C-terminal de MTPA.

La obtención de un modelo preliminar del dominio C-terminal de MTPA se realizó utilizando el sistema SWISS-MODEL (<http://swissmodel.expasy.org>) (Guex y Peitsch, 1997), un servidor automatizado de modelación de estructura tridimensional de proteínas por homología. Como estructuras moldes se utilizaron las estructuras de los dominios C-terminal de MT-1 de *C. sapidus* y de la MT de *H. americanus*, depositadas en PDB (Banco de Datos de Proteínas) con los códigos **1dmc** y **1j5l**, respectivamente. Para la visualización y tratamiento de la estructura obtenida se utilizaron las herramientas Swiss-PdbViewer (v3.7; <http://www.expasy.org/spdbv>) (Guex y Peitsch, 1997) y RasMol (v2.6; <http://www.umass.edu/microbio/rasmol/>) (Sayle y Milner-White, 1995).

III.19 Determinación del efecto de MTPA y de su forma apo (TPA) sobre la respiración de mitocondrias de hígado de ratón y del hepatopáncreas de bogavante *H. americanus*.

III.19.1 Obtención de mitocondrias acopladas de hígado de ratón.

Se emplearon de 2 a 3 g de hígados provenientes de 3 ratones de 2 meses decapitados. El tejido se lavó con PBS frío, se troceó en placa Petri sobre hielo con un poco de tampón de homogeneización (TH) (250 mM sacarosa, 25 mM Hepes, 10 mM KCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM DTT, 1.5 mM MgCl₂, 0.1% BSA, PMSF 1 mM, leupeptina 10 µM, pH 7.4) frío y se homogeneizó en homogeneizador manual vidrio-vidrio tipo *Dounce*, realizando 10 pases con el pistilo A y 10 pases con el pistilo B en TH hasta una proporción de 1:10 (g tejido: ml TH). El homogenado se centrifugó 10 min, 750 g, 4°C y el sobrenadante se volvió a centrifugar 10 min, 750 g, 4°C. El sedimento se descartó y el sobrenadante se centrifugó 15 min, 10000 g, 4°C. Transcurrida esta centrifugación, el sedimento se resuspendió en el mayor volumen posible (de acuerdo al tubo, aproximadamente 25 ml) de tampón de ensayo (TE) (225 mM sacarosa, 10 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 10 mM K₂HPO₄·3H₂O, 10 mM Tris-HCl, 0.1% BSA, pH 7.4) y se volvió a centrifugar en las mismas condiciones. El sedimento mitocondrial se resuspendió en TE hasta una concentración de proteínas entre 50 y 60 mg/ml y se reservó en hielo hasta su uso en el día.

III.19.2 Obtención de mitocondrias acopladas de hepatopáncreas del bogavante *H. americanus*.

La obtención de mitocondrias acopladas de hepatopáncreas del bogavante *H. americanus* se realizó mediante una adaptación de la metodología descrita por Tsokos y col. (1983) para la obtención de mitocondrias de hepatopáncreas de la langosta *P. argus*. Se emplearon de 20 a 23 g de hepatopáncreas proveniente de un animal anestesiado por frío (15-20 minutos a -20°C). El tejido se troceó en placa Petri sobre hielo con un poco de tampón de homogeneización 1 (TH₁) (83 mM sacarosa, 600 mM manitol, 5 mM MOPS, 1 mM EDTA, 0.5% BSA, PMSF 1 mM, leupeptina 10 µM, pH 7.6) frío y se homogeneizó en homogeneizador manual vidrio-vidrio tipo *Dounce*, realizando 5 pases con el pistilo B en TH₁ hasta una proporción de 1:2 (g tejido:ml TH₁). El homogeneizado se centrifugó 10 min, 1100 g, 4°C y el sobrenadante (evitando coger la capa de grasa de la superficie) se volvió a centrifugar 10 min, 7800 g, 4°C. El sobrenadante se descartó (eliminando primero la grasa de la superficie) y el sedimento se resuspendió en el mayor volumen posible (de acuerdo al

tubo, aproximadamente 25 ml) de TH₂ (83 mM sacarosa, 600 mM manitol, 5 mM MOPS, 0.25 mM EDTA, 0.125% BSA, PMSF 1 mM, leupeptina 10 μM, pH 7.6) y se centrifugó 15 min, 10000 g, 4°C. El sedimento mitocondrial se resuspendió en tampón de resuspensión (83 mM sacarosa, 600 mM manitol, 4 mM MOPS, 0.1% BSA, pH 7.4) hasta una concentración de proteínas entre 30 y 40 mg/ml y se reservó en hielo hasta su uso en el día.

III.19.3 Medición del consumo de oxígeno de mitocondrias de hígado de ratón y de hepatopáncreas de *H. americanus* en presencia de MTPA (TPA-Zn) ó TPA.

La evaluación del efecto provocado por MTPA (TPA-Zn) o TPA sobre el consumo de O₂ de mitocondrias de hígado de ratón y de hepatopáncreas de *H. americanus* se realizó en el laboratorio de la Dra. Jorgina Satrústegui, usando un electrodo polarográfico de oxígeno tipo Clark con agitación (Hansatech Instruments, modelo DW1), acoplado a un registrador gráfico (Yokogawa Hokushin Electric, modelo 3066). La temperatura fue mantenida a $27 \pm 1^\circ\text{C}$ mediante circulación de agua con un baño termostatzado. Las mitocondrias fueron añadidas a la cámara de reacción de 0.5 ml que contenía tampón de ensayo (TE), e inmediatamente se cerró la cámara con el émbolo. En el caso de las mitocondrias de ratón el TE fue el descrito en el apartado III.18.1 mientras que para las mitocondrias de bogavante el TE fue: 65 mM sacarosa, 167 mM KCl, 470 mM D-manitol, 3.3 mM MgCl₂, 4 mM K₂HPO₄, 4 mM MOPS, 0.067% BSA, pH 7.2. Las adiciones posteriores se realizaron con microjeringillas a través de un pequeño orificio del émbolo, y ninguna sobrepasó los 10 μl. Se utilizó una microjeringuilla para la adición del succinato y el ADP, y otra para la adición de la metalotioneína y su forma apo. El orden de adición se especifica en el capítulo de Resultados. Entre adición y adición transcurrieron de 3 a 5 min y las microjeringuillas se lavaron repetidas veces primero con etanol y luego con agua. El succinato y el ADP, disueltos en agua, se añadieron a una concentración final de 5 mM y 0.6 mM respectivamente. Tanto la metalotioneína como su forma apo fueron añadidas disueltas en TE a una concentración final de 10 μM. Las mitocondrias fueron añadidas a una concentración final de 0.35 a 0.45 mg proteína/ml para el volumen final de 0.5 ml. La velocidad del consumo de oxígeno se expresó como nmoles de oxígeno atómico/min/mg de proteína y fue calculada a partir de la calibración del electrodo con ditionito sódico, considerando que el contenido de oxígeno atómico en el ensayo era de 245.8 nmoles. Este último valor se determinó calculando los ppm de O₂ según la fórmula empírica de Truesdale y Downing (1954):

$$\text{ppm O}_2 = 14.16 - 0.3943 T + 0.007714 T^2 - 0.0000646 T^3$$

donde T es la temperatura del ensayo: 27°C

III.20 Determinación del efecto de MTPA (TPA-Zn) y de su forma apo (TPA) sobre la producción de ROS (H₂O₂) de mitocondrias aisladas a partir del hepatopáncreas de *H. americanus*.

La determinación del H₂O₂ producido por mitocondrias aisladas de *H. americanus*, en presencia o ausencia de MTPA (TPA-Zn) o de su forma apo (TPA), se realizó mediante una adaptación de la metodología descrita por Degli Esposti y McLennan (1998). Este método se basa en la utilización de la sonda diclorodihidrofluoresceína diacetato (H₂DCFDA) (Sigma), que luego de atravesar la membrana mitocondrial interna, pierde los grupos acetatos por la acción de las esterasas mitocondriales y es oxidada por el H₂O₂ (la contribución de otras ROS es mínima según McLennan y Degli Esposti, 2000), pasando a la forma fluorescente diclorofluoresceína. De esta forma el incremento de la producción de H₂O₂ es proporcional al incremento de la fluorescencia.

A un volumen final de 0.2 ml en placas negras para fluorescencia (Nunc), que contenía el mismo tampón TE (pero sin 470 mM D-manitol) descrito para las mitocondrias de bogavante en el apartado III.17.3, se le añadió: DCFDA 1 µM, mitocondrias a una concentración de 0.5 mg/ml y succinato 10 mM. En los ensayos con MTPA, TPA (ambos a 10 µM) y ZnCl₂ (60 µM), éstos se añadieron antes de la DCFDA.

Las medidas de fluorescencia (excitación a 485 nm y emisión a 528 nm, con ancho de banda de 20 nm) fueron tomadas inmediatamente después de la adición de succinato, cada 30 segundos durante 15 minutos a 28°C, en un lector de fluorescencia para microplacas Synergy HT (Bio-Tek Instruments), con una sensibilidad del 85% y empleando el programa informático KC4 v3.1 (Bio-Tek). La velocidad de producción de ROS se expresó en pmoles de DCF/min/mg de proteína de mitocondria, mediante el uso de una curva patrón de DCF (Sigma) en presencia de mitocondrias (0.5 mg/ml) en TE. La curva patrón comprendió el rango de 0.1 a 10 µM y se realizó con la misma sensibilidad (85%) del equipo que la utilizada en el ensayo con MTPA/TPA.

III.21 Análisis estadístico.

Para el análisis estadístico se utilizó el programa GraphPad Prism versión 3.03 para Windows (GraphPad Software, San Diego, California, USA). Las diferencias entre los valores de las distintas muestras y tratamientos fueron evaluadas utilizando el análisis de varianza (ANOVA) de una vía, seguido del test de Tukey para múltiples comparaciones. Los datos se presentan como el valor medio \pm SD (desviación estándar). Se consideró que existían diferencias significativas cuando $p < 0.05$.

IV. RESULTADOS

IV RESULTADOS

IV.1 Amplificación de fragmentos de cDNA de metalotioneína a partir del hepatopáncreas.

Como ya se describió en el capítulo de Materiales y Métodos, se empleó el método de RT-PCR para obtener fragmentos del gen de la metalotioneína a partir de RNA total extraído del hepatopáncreas. Se ensayaron diferentes programas de amplificación variando las condiciones de hibridación y el número de ciclos con oligonucleótidos degenerados a 5' y a 3' (MtA1 y MtB1) (Tabla 3), hasta lograr obtener el menor número de fragmentos posible.

Como muestra la Figura 16, se obtuvo un fragmento de 159 pb, que se clonó directamente en el plásmido pCR 4-TOPO. Como se observa en la Figura 13, el inserto quedó flanqueado dentro del plásmido pCR 4-TOPO por dos dianas para el enzima de restricción *EcoRI*, necesarias para su posterior extracción.

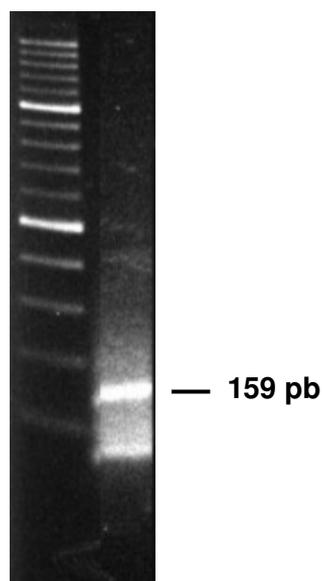


Figura 16. Amplificación de un fragmento del gen de la metalotioneína a partir de RNA de hepatopáncreas mediante RT-PCR. Marcador de peso molecular empleado: escalera de 100 pb (Roche).

Después de crecer las colonias blancas durante toda la noche y llevar a cabo las minipreparaciones de DNA, los plásmidos fueron digeridos con *EcoRI* y separados en geles de agarosa. El resultado se muestra en la Figura 17, donde puede apreciarse la presencia de insertos con el tamaño esperado (aproximadamente 170 pb, por incluir 17 pb del sitio de policlonaje una vez digeridos con *EcoRI*) en los clones 1, 2 y 4. Dado que los clones 1 y 2 contenían además insertos de otros tamaños, se decidió secuenciar sólo el clon 4.

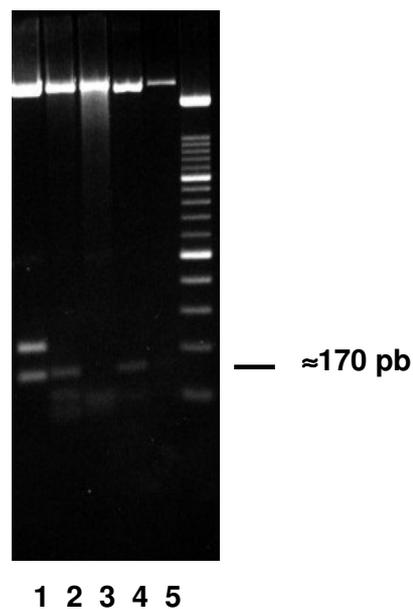


Figura 17. Digestión con la enzima de restricción *EcoRI* de los plásmidos recombinantes pCR 4-TOPO con el fragmento de MTPA. Marcador de peso molecular empleado: escalera de 100 pb.

La secuencia de 159 pb del cDNA del clon 4, al compararla con las secuencias nucleotídicas disponibles en las bases de datos mediante el programa BLAST, demostró tener homología con fragmentos de cDNA de metalotioneínas de crustáceos.

IV.2 Obtención de la secuencia completa del cDNA mediante la técnica de RACE.

A partir de la secuencia del fragmento de 159 pb obtenido se diseñaron oligonucleótidos específicos (GSP₁ y GSP₂) (Tabla 3 y Fig. 19), para ser empleados en la reacción de RACE hacia ambos extremos (5' y 3').

Como se observa en las Figuras 18A y 18C, se obtuvo un fragmento de aproximadamente 250 pb en la reacción hacia el extremo 5', y de 670-680 pb en la reacción hacia el extremo 3'. Los fragmentos fueron clonados y secuenciados de la misma forma que el fragmento interno del gen (Figs. 18B y 18D).

Por solapamiento de ambas secuencias se obtuvo la secuencia completa del cDNA (Fig. 19) de la metalotioneína de *P. argus* (MTPA), la cual se confirmó por RT-PCR empleando cebadores diseñados a partir de las secuencias UTR 5' y 3' (Tabla 3) (resultados no mostrados). La secuencia completa del cDNA de MTPA ha sido enviada a la Base de Datos de Secuencias Nucleotídicas de la EMBL y está disponible con el número de acceso **AJ414050**. Como se observa en la Figura 19, de los 731 pb que presenta en total la secuencia, 67 pb conforman la región 5' no traducible y 451 pb la región 3' no traducible.

Una vez determinado el marco de lectura correcto y los sitios de iniciación y parada de la traducción, la secuencia nucleotídica fue traducida a aminoácidos.

La secuencia aminoacídica obtenida de 59 residuos (teniendo en cuenta la Met del N-terminal) se comparó con las secuencias aminoacídicas de todas las metalotioneínas de crustáceos disponibles en las bases de datos y con las metalotioneínas 1a, 2a y 3 de humano. El resultado de esta comparación se muestra en la tabla 4, donde se observa que MTPA presenta más homología (en función de la puntuación FASTA optimizada, que tiene en cuenta no sólo los aminoácidos idénticos, sino también las sustituciones conservativas) con la metalotioneína de *H. americanus*, a pesar de que la mayor coincidencia de aminoácidos idénticos la tiene con la isoforma 1 de *C. sapidus* (71.2%).

Por otro lado, en la Figura 20 se presenta el análisis de alineamiento múltiple de MTPA con todas las metalotioneínas de crustáceos conocidas hasta la fecha, obtenido mediante el programa *ClustalW*, donde se observa que existe una gran coincidencia en la posición de las Lys y las Cys.

El peso molecular y el punto isoeléctrico teóricos de MTPA, calculados mediante la herramienta "ProtParam", dio como resultado 6162.3 D y 8.06, respectivamente.

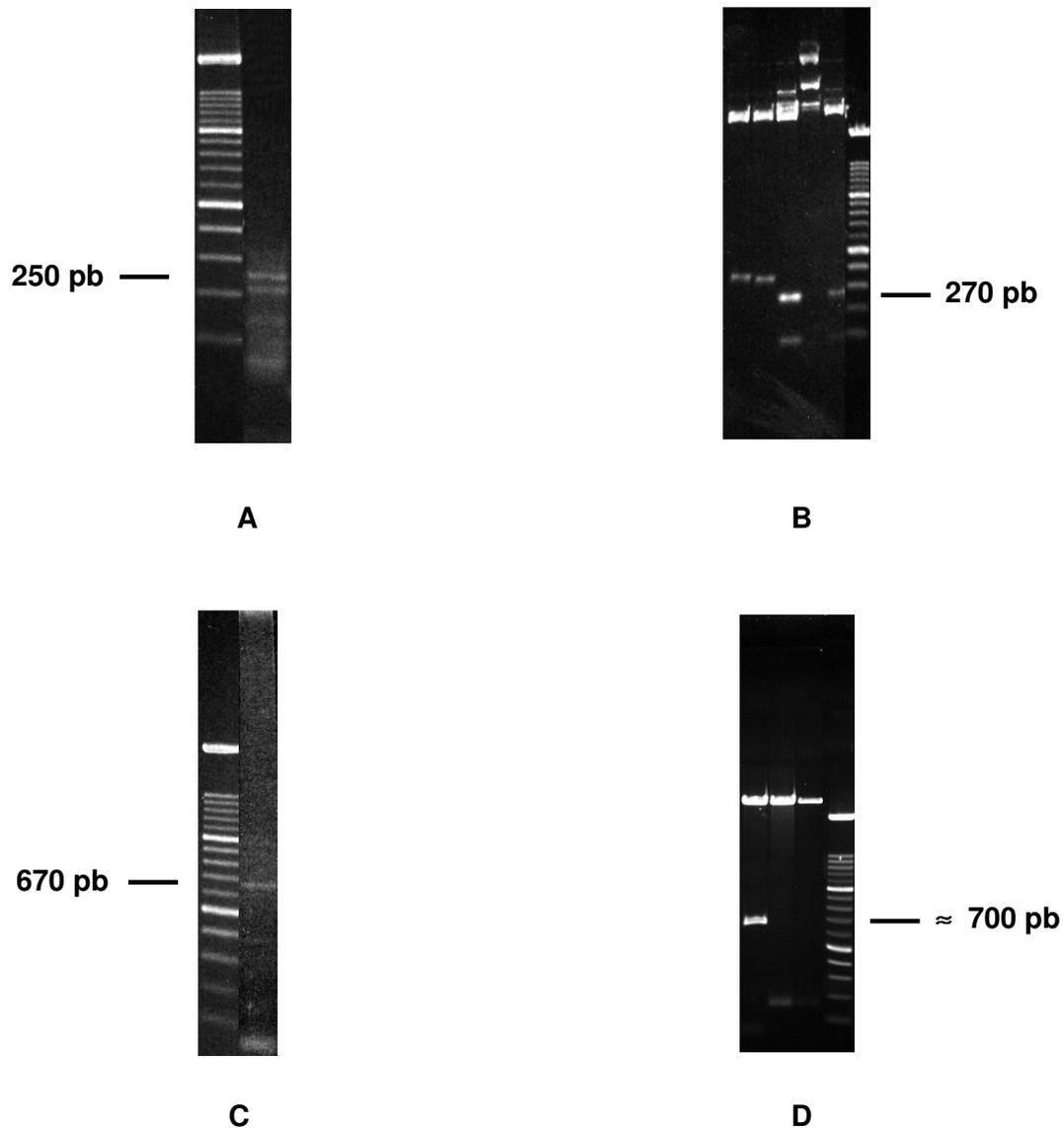


Figura 18. Productos de la reacción de RACE en la dirección 5' y 3'. Clonaje de los mismos. A. Reacción de RACE en la dirección 5'. **B.** Digestión de los plásmidos recombinantes del producto de la reacción de RACE en la dirección 5', con la enzima de restricción *EcoRI*. **C.** Reacción de RACE en la dirección 3'. **D.** Digestión de los plásmidos recombinantes del producto de la reacción de RACE en la dirección 3', con la enzima de restricción *EcoRI*. Marcador de peso molecular empleado en cada gel: escalera de 100 pb.

-67
ACGAGTGTNTTTCCTGTCTCTGAAGAAACGCAGTTATCGAGTACTAAGTGA

-15
CATCACACTTTCACC ATG CCT GGT CCC TGC TGC ATC GAT AAG TGT GAG
Met Pro Gly Pro Cys Cys Ile Asp Lys Cys Glu

34
TGT GCC GAG GGC AAA TGC AAA TCA GGA TGT CAG TGC AAG TCC TGC
Cys Ala Glu Gly Lys Cys Lys Ser Gly Cys Gln Cys Lys Ser Cys

79
ACG TGC AGC ACT CCC TGC GAC AAG TGT ACA ACT GCA TGC TGT TGC
Thr Cys Ser Thr Pro Cys Asp Lys Cys Thr Thr Ala Cys Cys Cys

124
TCG ACG AAG GAA GAA TGC GCT AGC AAG TGT ACC AAG CCT TGC AAA
Ser Thr Lys Glu Glu Cys Ala Ser Lys Cys Thr Lys Pro Cys Lys

169
TGC TGC CCT TAG GCCTTCAGCATGAAGGCTGTAATGATGAAAGGATCGTCA
Cys Cys Pro Stop

219
AAGTACGAGGGAAATGTAAGCGATGACTACAGCAAGGCGCCAACACACAT

269
CACCAGCCTTA ACTAAGCAGAGGTTGGGCCCTGCATCAATAATGGGGTCAT

320
TGGGCGCGGAGCTATTAGCCCGATATAAATTTTGTGGTTTACCTTTACACCC

372
TTATGTTGATTGTGTGCTTGTGCAACACTTTTACACTCACCTTGTGTGATCTT

425
TAATAAATTTCAATGCAAGTTTTTGTGTTGCAATTGCGCTATATTTGTATCTT

477
CTGCTGCACTATATACGAAAAATTTATGTTCTTACAAATGAAAACATTTTC

530
AGATTTGGTCTACAAATTGAAAGCATTATCAAGATTTGATCTATTGTTCTTTT

578
TTCCATGAGTTTCGGTTAGCACCTTATTTGA AATAAA AATGCTCATTCAAAA

630 658
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

Figura 19. Secuencia nucleotídica del cDNA de la metalotioneína de *P. argus* obtenida mediante solapamiento de las secuencias de los productos del RACE en ambas direcciones. La zona que se traduce aparece sombreada, señalándose debajo de cada triplete el aminoácido correspondiente. La señal de poliadenilación aparece dentro de un rectángulo. Además aparecen subrayadas en colores, las zonas correspondientes a los oligonucleótidos sintéticos empleados en las reacciones de RACE (GSP₁ en azul y GSP₂ en rojo) y en el análisis de la expresión del gen mediante RT-PCR (MetA₂ en naranja y MetB₂ en verde).

Tabla 4. Análisis FASTA de MTPA con el resto de las metalotioneínas de crustáceos y las MTs 1a, 2a y 3 de humano.

Organismo	Isoforma	Puntuación FASTA optimizada	% Identidad	Número de residuos	Referencia
<i>H. americanus</i>	MTH	388	69.5	58	Valls y col., 2001
<i>C. sapidus</i>	1	381	71.2	59	Brouwer y col., 1995
<i>C. sapidus</i>	2	380	66.1	58	Brouwer y col., 1995
<i>P. leniusculus</i>		378	67.8	58	AF199482, sin publicar
<i>C. maenas</i>		378	67.8	58	Pedersen y col., 1994
<i>A. astacus</i>		376	69.5	58	Pedersen y col., 1996
<i>P. pelagicus</i>		367	62.7	58	AY057395, sin publicar
<i>E. sinensis</i>		359	61.0	58	AY057396, sin publicar
<i>P. potamios</i>		356	66.1	58	Pedersen y col., 1996
<i>S. serrata</i>	1	352	63.8	58	Lerch y col., 1882
<i>S. serrata</i>	2	343	56.9	57	Lerch y col., 1882
<i>C. sapidus</i>	MT-Cu	178	38.1	64	Brouwer y col., 2002
<i>H. sapiens</i>	1a	158	38.6	61	Heguy y col., 1986
<i>H. sapiens</i>	2a	158	38.6	61	Kissling y Kagi, 1977
<i>H. sapiens</i>	3	-----	35.1	68	Uchida y col., 1991

IV.3 Análisis de la expresión del mRNA de MTPA en diferentes tejidos mediante RT-PCR.

La expresión del mRNA de la metalotioneína en diferentes tejidos se analizó mediante el método de RT-PCR semicuantitativa, amplificando un fragmento del cDNA del rRNA 18S (Tabla 3) de *P. argus*, como control interno de la cantidad de cDNA de partida. Como cebadores de la PCR se emplearon oligonucleótidos diseñados a partir del inicio y el final de la región nucleotídica codificante para la metalotioneína del cDNA obtenido (MtA₂ y MtB₂) (Tabla 3 y Fig. 19).

Como muestra la Figura 21, la expresión del mRNA tiene lugar en todos los tejidos analizados: hepatopáncreas, intestino, sistema nervioso y músculo; siendo el hepatopáncreas el tejido de mayor expresión.

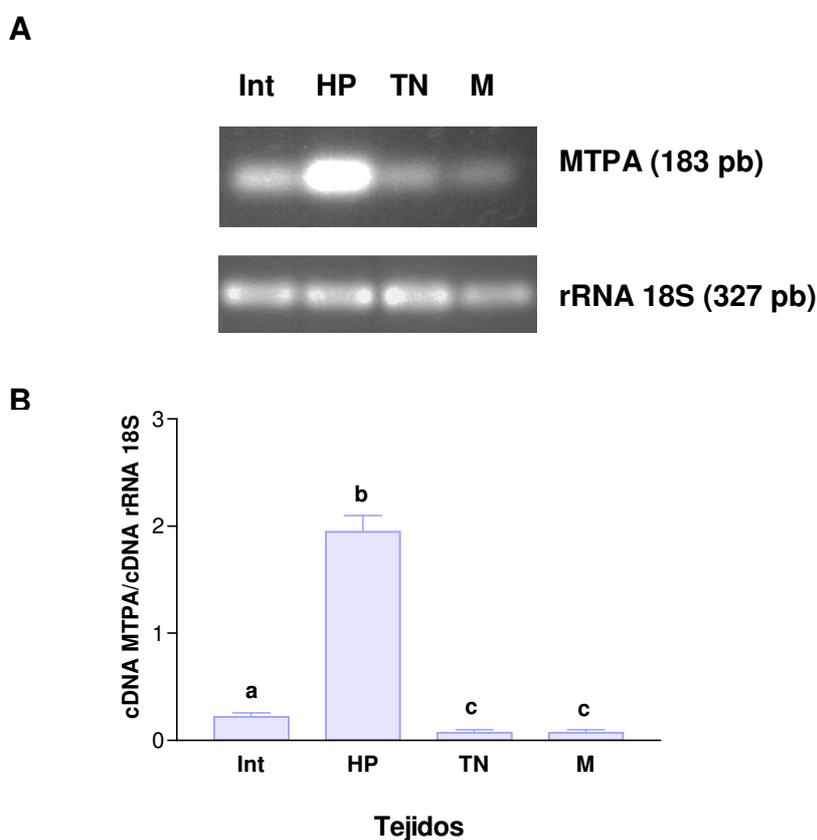


Figura 21. Análisis de la expresión del mRNA de MTPA en diferentes tejidos de *P. argus*. **A.** Amplificación por RT-PCR de un fragmento de 183 pb, correspondiente al cDNA de MTPA. La amplificación de un fragmento de 327 pb del cDNA del rRNA 18S se muestra como control interno de la cantidad de cDNA de partida. Int.: intestino, HP: hepatopáncreas, TN: tejido nervioso, M: músculo. **B.** Análisis cuantitativo. Los productos fueron cuantificados a través de la relación cDNA MTPA/cDNA rRNA 18S. Los resultados mostrados representan el valor medio \pm SD de 3 determinaciones independientes por tejido. Las letras diferentes sobre las barras indican diferencias estadísticamente significativas entre los tejidos ($p < 0.01$; ANOVA seguido del test de Tukey).

Para analizar si se trataba de una misma isoforma ubicua de metalotioneína o de distintas isoformas, los fragmentos amplificados a partir de los diferentes tejidos fueron clonados y secuenciados. La secuencia obtenida en todos los casos fue la misma que la del hepatopáncreas, por lo que no cabe dudas de que es la misma isoforma que se expresa en todos estos tejidos.

IV.4 Análisis de la expresión del mRNA de MTPA inducida por Cd en explantes de tejidos de *P. argus*.

Los niveles de expresión basal del mRNA de MTPA en explantes control de cada tejido fueron comparados con los niveles de expresión en explantes expuestos a Cd. La exposición a Cd indujo la expresión del mRNA de MTPA en todos los explantes de tejidos, excepto en músculo (Fig. 22). La mayor inducción fue observada en tejido nervioso, seguido por intestino y hepatopáncreas. Sin embargo, la expresión del mRNA de MTPA en hepatopáncreas fue más alta que en los otros explantes de tejido, tanto en el estado basal, como en el expuesto a Cd.

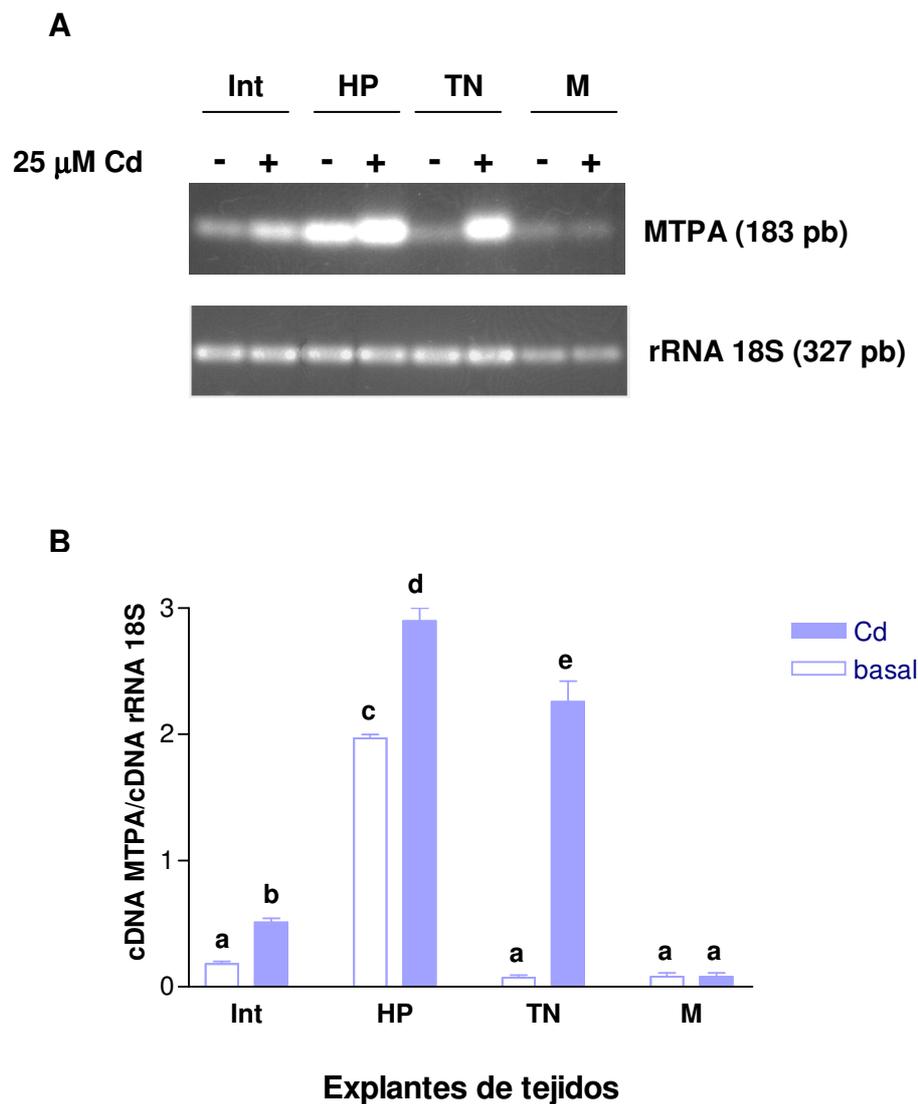


Figura 22. Análisis de la expresión de MTPA en respuesta a cadmio en explantes de tejidos de *P. argus*. **A.** Amplificación por RT-PCR de un fragmento de 183 pb, correspondiente al cDNA de MTPA, a partir de explantes de tejidos expuestos (+) o no (-) a 25 μ M CdCl₂. La amplificación de un fragmento de 327 pb del cDNA del rRNA 18S se muestra como control interno de la cantidad de cDNA de partida. Int: intestino, HP: hepatopáncreas, TN: tejido nervioso, M: músculo. **B.** Análisis cuantitativo. Los productos fueron cuantificados a través de la relación cDNA MTPA/cDNA rRNA 18S, tanto en el caso de los explantes no tratados con Cd (barras blancas), como en el caso de los explantes tratados (barras azules). Los resultados mostrados representan el valor medio \pm SD de 3 determinaciones independientes por explante de tejido. Las letras diferentes sobre las barras indican diferencias estadísticamente significativas entre los explantes ($p < 0.001$; ANOVA seguido del test de Tukey).

IV.5 Obtención por vía recombinante de la metalotioneína de *P. argus* (MTPA).

IV.5.1 Clonaje de la región codificante del cDNA de MTPA .

La región codificante del cDNA de MTPA fue amplificada por PCR, empleando cebadores que introdujeron un sitio de restricción *Bam*HI inmediatamente antes del codón contiguo al sitio de iniciación ATG, en la dirección 3' de éste, y un sitio de restricción *Sal*I inmediatamente después del codón de parada de la traducción. La región así amplificada se clonó en el plásmido pSTBlue-1 (Fig. 14), quedando flanqueada por dos dianas para el enzima de restricción *Eco*RI. Después de obtener los plásmidos recombinantes, éstos fueron digeridos con *Eco*RI y separados en geles de agarosa, para comprobar la presencia de los insertos. Como se observa en la Figura 23, de ocho clones analizados, siete presentaron el inserto de interés, y uno (el clon del carril 1) el inserto duplicado.

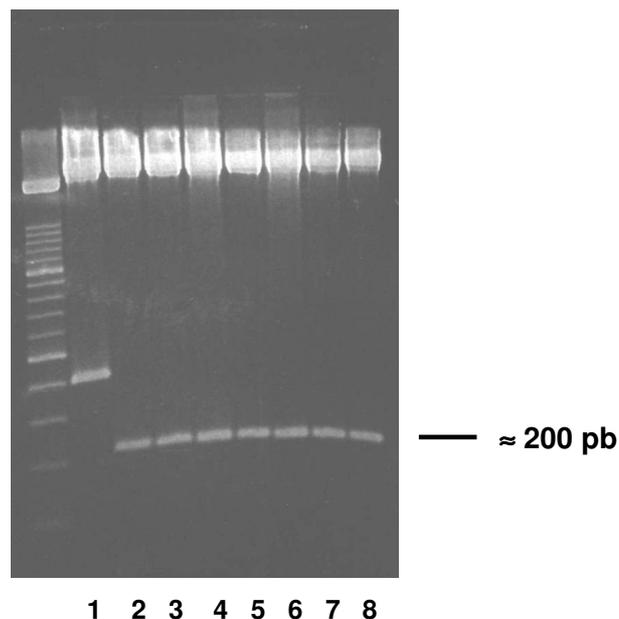


Figura 23. Digestión con la enzima de restricción *Eco*RI de los plásmidos recombinantes pSTBlue-1 con la región codificante de MTPA. Marcador de peso molecular empleado: escalera de 100 pb.

IV.5.2 Subclonaje de la región codificante del cDNA de MTPA en un plásmido de expresión.

La región codificante del cDNA de MTPA, ya clonada en el plásmido pSTBlue-1, se subclonó entonces en el plásmido de expresión pGEX-4T-1 (Fig. 15) que está diseñado para la sobreexpresión inducible por IPTG de fragmentos de genes como proteínas de fusión a la enzima glutatión-S-transferasa (GST) de *S. japonicum*. Tanto el plásmido de expresión pGEX-4T-1, como el plásmido recombinante pSTBlue-1, se digirieron con las enzimas de restricción *SalI* y *BamHI* y se aplicaron a electroforesis en agarosa 1.2 y 0.8%, respectivamente. Luego de purificar las bandas de interés (fragmento codificante de MTPA y pGEX-4T-1 linearizado), la región codificante de MTPA con extremos cohesivos *SalI/BamHI* se puso a ligar con pGEX-4T1 con extremos cohesivos complementarios *SalI/BamHI*, y se transformaron bacterias *E. coli* XL-Blue-1 con el producto resultante de la ligazón. Los clones positivos se sometieron a un análisis de restricción con *SalI/BamHI* y los productos de digestión fueron separados en geles de agarosa al 2 %. Como se observa en la Figura 24, de ocho clones analizados, cuatro (clones 3, 6, 7 y 8) presentaron el inserto de interés y cuatro (clones 1, 2, 4 y 5) una mezcla de éste inserto junto con insertos que presentaban 16 pb extras correspondientes al pSTBlue-1 (*BamHI* cortó en el sitio de policlonaje en lugar de en el extremo del inserto). Los clones 6 y 8 se mandaron a secuenciar y al comprobar que tenían el marco de lectura correcto, se guardó y se utilizó el clon 6 en los trabajos posteriores.

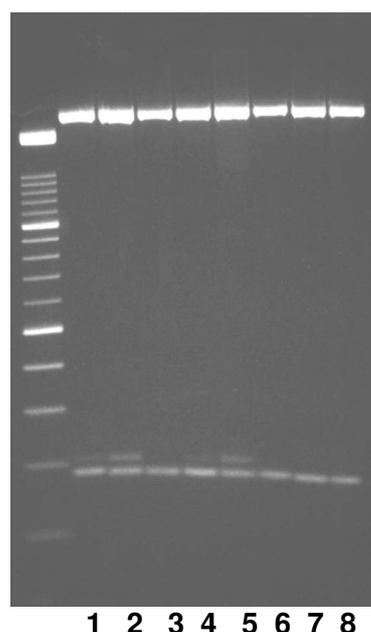


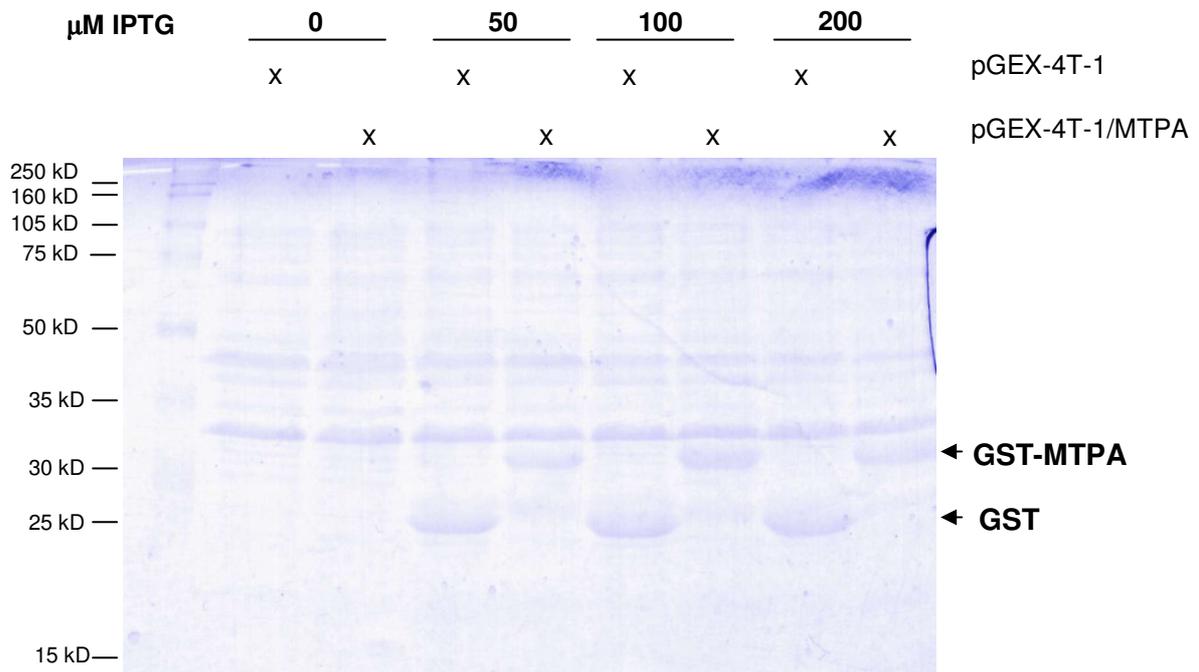
Figura 24. Digestión con las enzimas de restricción *SalI* y *BamHI* de los plásmidos recombinantes pGEX-4T-1 con la región codificante de MTPA. Marcador de peso molecular empleado: escalera de 100 pb.

IV.5.3 Expresión de MTPA con fines analíticos.

IV.5.3.1 Optimización de la concentración de IPTG para la inducción de la expresión.

Para determinar la concentración óptima de IPTG necesaria para obtener la máxima expresión de la proteína de fusión GST-MTPA, se indujo la expresión añadiendo IPTG a una concentración final de 0, 50, 100 y 200 μM , a cultivos de bacterias que habían crecido en presencia de ZnCl_2 0.3 mM hasta una absorbancia a 600 nm entre 0.6 y 0.7. Al cabo de las 3 horas de crecimiento en presencia de este inductor, una alícuota de cada cultivo se centrifugó, y el lisado de bacterias se analizó en una electroforesis en SDS-PAGE al 15%. El resultado de la electroforesis se muestra en la Figura 25A. En los carriles correspondientes a los lisados de bacterias transformadas con pGEX-4T-1 se observan bandas de 25 kD, que corresponden al peso molecular de la GST de *S. japonicum*. En los carriles donde se aplicaron los lisados de bacterias transformadas con pGEX-4T-1/MTPA aparece una banda de alrededor de 31 kD, que es el peso molecular de la GST más el de MTPA. Estas bandas se cuantificaron por densitometría, encontrándose que la

A



B

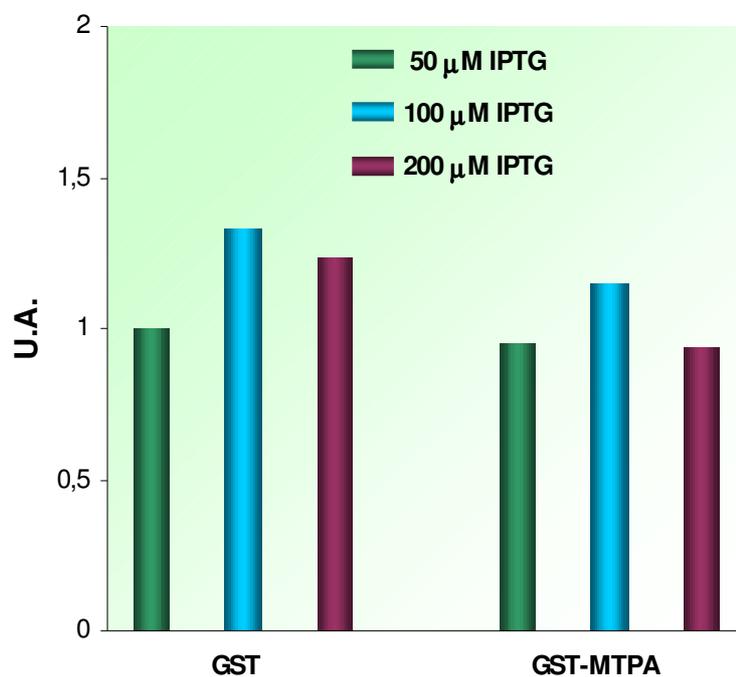


Figura 25. Optimización de la inducción de la expresión de la proteína de fusión GST-MTPA por IPTG. **A.** Análisis por SDS-PAGE en Tris-Gly de lisados crudos de bacterias transformadas con pGEX-4T-1 o con pGEX-4T-1/MTPA (con una x se señala según el caso). Patrones de peso molecular empleados: marcadores preteñidos *Rainbow* (Amersham). **B.** Cuantificación densitométrica de las bandas.

máxima expresión tuvo lugar a la concentración final de 100 μ M de IPTG (Fig. 25B), tanto para las bacterias transformadas con pGEX-4T-1, como para las bacterias transformadas con pGEX-4T-1/MTPA.

IV.5.3.2 Cuantificación de la proteína de fusión GST-MTPA soluble.

Una vez determinada la concentración óptima de IPTG para obtener la mayor expresión de proteína de fusión GST-MTPA, se indujo la expresión tanto de la GST como de la proteína de fusión GST-MTPA, con IPTG a esta concentración final (100 μ M). A los lisados crudos de bacterias obtenidos por sonicación se les determinó la actividad GST. En la Tabla 5 se compara la cantidad de proteína calculada por actividad de la GST, con la determinada por el método de Bradford, tanto para la proteína de fusión GST-MTPA como para la GST expresada sin MTPA unida (bacterias transformadas sólo con pGEX-4T-1). Se observa que la actividad de la GST se ve alterada al expresarse en forma unida con MTPA, lo cual explicaría en parte el bajo rendimiento del proceso de purificación.

Tabla 5. Comparación entre la concentración de proteína determinada por el método de Bradford y la determinada por actividad de la GST, en lisados crudos de bacterias. Se presenta el valor medio \pm SD de 3 experimentos independientes (** $p < 0.01$ vs. la concentración de proteína calculada por actividad de la GST expresada sin MTPA unida).

Método	Conc. de proteína (mg/ml)	
	GST-MTPA	GST
Bradford	11.4 \pm 0.2	10.9 \pm 0.2
Actividad GST	3.2 \pm 0.2**	4.8 \pm 0.5

IV.5.4 Purificación de MTPA (TPA-Zn) con fines preparativos.

IV.5.4.1 Cromatografía de afinidad en Glutación-Sepharosa 4B.

Luego de crecer las bacterias transformantes a escala preparativa en presencia de 0.3 mM ZnCl₂ y lissarlas, se procedió a purificar la proteína de fusión obtenida mediante una cromatografía de afinidad en Glutación-Sepharosa 4B. A la matriz quedó fijada la proteína de fusión GST-MTPA. Luego de incubar con trombina, MTPA se separó de la GST (que aún quedó fijada a la columna), eluyendo junto con la trombina en la fracción identificada como Fijado (F). La GST unida aún a la matriz se separó eluyendo con GSH. La tabla 6 resume los valores determinados para cada fracción en un proceso de purificación típico. Como se observa, según las cantidades determinadas mediante la actividad GST, el 15.7% de la proteína de fusión no se fijó a la matriz.

Tabla 6. Cuadro resumen de un proceso de purificación representativo. Se presenta el valor medio \pm SD de 3 experimentos independientes. Lis – lisado bacteriano, NF – fracción no fijada, F – fracción fijada, L – lavados, E1-4 – fracción eluída (GST).

Fracción	V (ml)	mg totales (Bradford)	mg totales (actividad GST)
Lis	18.8	128 \pm 17	61.1 \pm 1.3
NF	18.8	118 \pm 21	9.6 \pm 0.4
F	0.75	0.7 \pm 0.2	-----
L	2.1	0.30 \pm 0.08	-----
E1	1.10	6.1 \pm 0.5	-----
E2	0.91	3.7 \pm 0.3	-----
E3	0.92	2.1 \pm 0.1	-----
E4	0.96	0.65 \pm 0.05	-----

IV.5.4.2 Cromatografía de exclusión molecular en Sephadex G-50.

La fracción fijada (F) de la etapa de purificación anterior se sometió a una cromatografía de exclusión molecular en Sephadex G-50, con el objetivo de separar MTPA de la trombina. La figura 26 muestra un cromatograma típico de este paso de purificación. Como se observa, MTPA eluyó alrededor de la fracción 7, en un pico que abarcó de las fracciones 5 a la 9.

El rendimiento final del proceso fue de 0.33 ± 0.02 mg de MTPA por litro de cultivo. La proteína recombinante obtenida en éstas condiciones, carece de Met en el N-terminal y en su lugar presenta Gly-Ser provenientes de las 6 bases posteriores al sitio de corte de la trombina (Fig. 15).

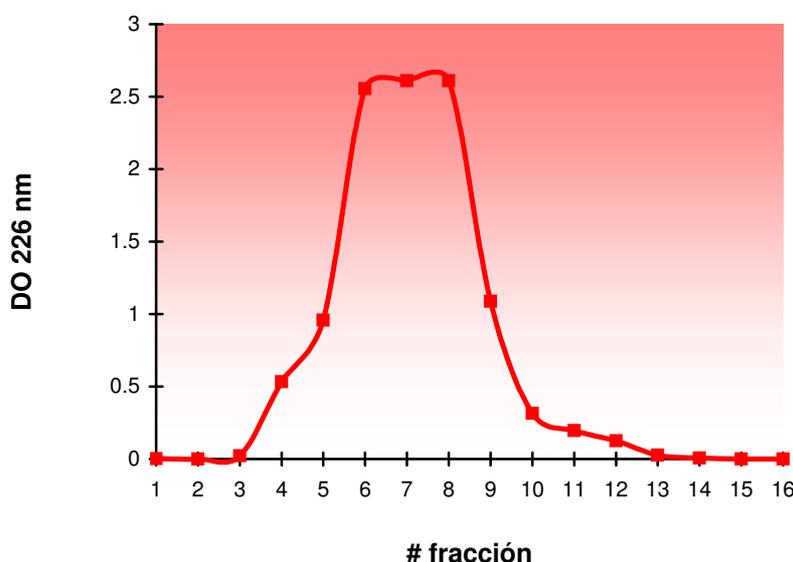


Figura 26. Cromatograma representativo (más de 30 ensayos) de la purificación de MTPA en Sephadex G-50, equilibrado en tampón Tris-HCl 10 mM pH 8.6.

IV.5.4.3 Análisis de las distintas fracciones del proceso de purificación mediante SDS-PAGE.

Tanto la proteína pura obtenida, como cada una de las fracciones del proceso de purificación, se visualizaron en SDS-PAGE Tris-Gly y Tris-Tricina. La Figura 27 muestra un análisis en SDS-PAGE Tris-Gly al 12.5% de cada una de las fracciones del proceso de purificación. Como se observa en los carriles 2 y 3 (fracciones Lis y NF, respectivamente), alrededor del peso molecular correspondiente a la proteína de

fusión GST-MTPA (31 kD), la intensidad de la banda en la fracción NF es menor que en la Lis, lo cual evidencia que la mayoría de la proteína de fusión se fijó a la matriz de afinidad en Glutación-Sepharosa 4B. En los carriles 4 y 6 (fracción F y pico de MTPA) se observa una banda de alrededor de 12 kD, lo cual debe corresponder a un dímero de MTPA. En el carril 5, que corresponde a la primera fracción de elución con GSH (E1), se observa una banda de gran intensidad alrededor de 26 kD, correspondiente al peso molecular de GST de *S. japonicum*. También con menos intensidad se observa una banda a la misma altura de la banda que desaparece en la fracción NF, correspondiente a la proteína de fusión GST-MTPA, lo cual evidencia que la digestión con trombina no fue completa.

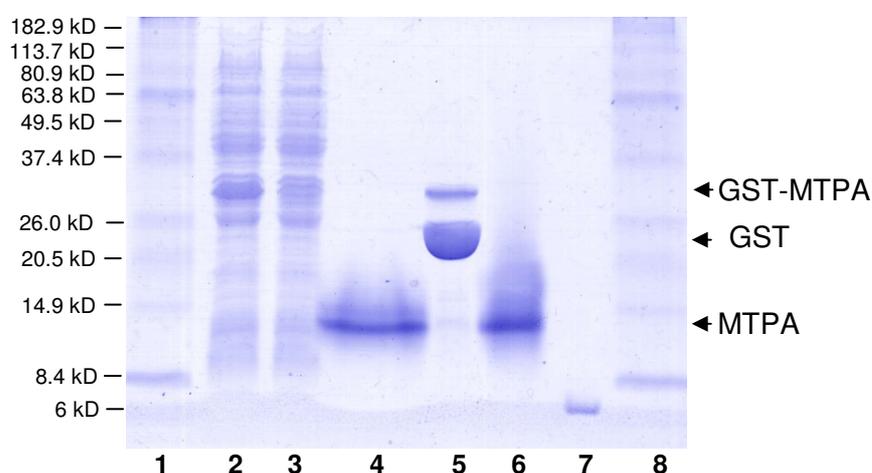


Figura 27. Análisis por SDS-PAGE en Tris-Gly de las distintas fracciones del proceso de purificación. Carriles 1 y 8: marcadores de peso molecular preteñidos (*BenchMark*, Invitrogen). Carriles 2, 3 y 5: fracciones Lis, NF y E1 (25 µg). Carriles 4 y 6: fracciones F y MTPA (6 µg). Carril 7: insulina en tampón de Laemmli sin β-ME (4 µg).

Las distintas fracciones del proceso de purificación se analizaron además por SDS-PAGE en Tris-Tricina, que es una técnica que proporciona mayor resolución para proteínas menores de 15 kD. Como se observa en la Figura 28, en los carriles 2 y 3 (fracciones Lis y NF, respectivamente), al igual que sucedió en SDS-PAGE en Tri-Gly, la intensidad de la banda correspondiente a la proteína de fusión GST-MTPA disminuye en la fracción NF en comparación con la Lis. Asimismo, en el carril 5 (fracción E1) se visualizan una banda correspondiente a la GST de *S. japonicum* y otra menos intensa correspondiente a la proteína de fusión GST-MTPA. Sin embargo, en los carriles de las fracciones F y MTPA (carriles 4 y 6, respectivamente), en lugar de

observarse una banda alrededor de 12 kD, como ocurría en el caso de la SDS-PAGE en Tris-Gly, se observa una banda de alrededor 45 kD que debe corresponder a un oligómero de MTPA. Por tanto, con este tipo de SDS-PAGE, en lugar de obtener una mejor resolución de MTPA, se favoreció una mayor oligomerización de esta proteína debido al largo tiempo de corrida de esta electroforesis.

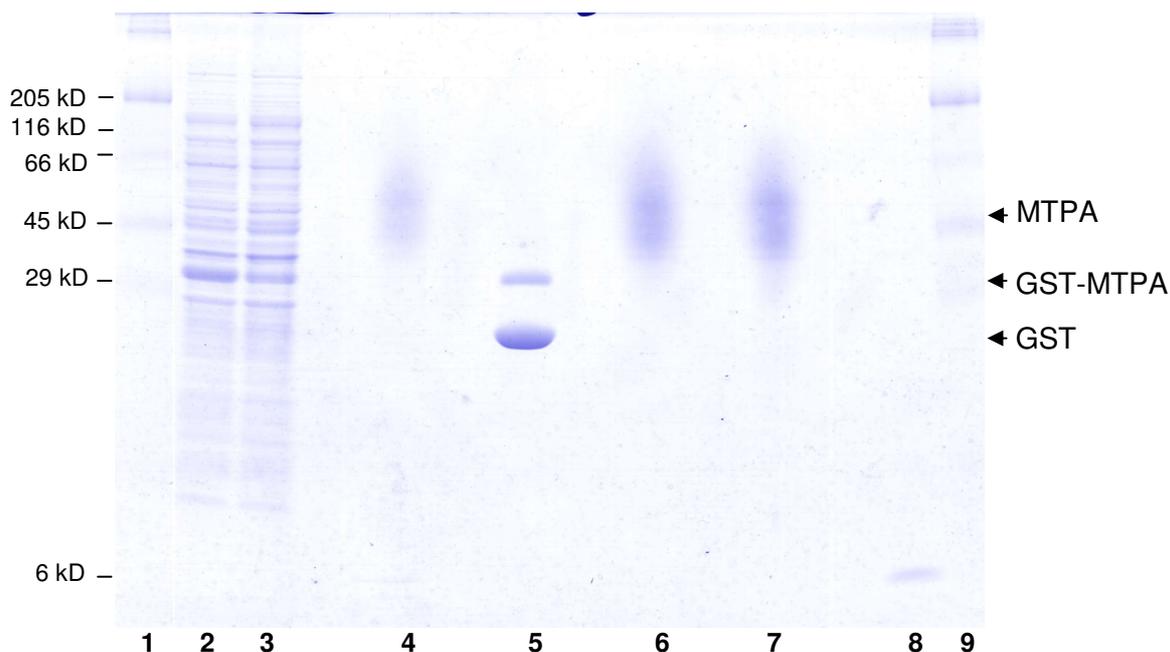


Figura 28. Análisis por SDS-PAGE en Tris-Tricina de las distintas fracciones del proceso de purificación. Carriles 1 y 9: marcadores de peso molecular preteñidos (Sigma). Carriles 2, 3 y 5: fracciones Lis, NF y E1 (50 μ g). Carril 4: fracción F (6 μ g). Carriles 6 y 7: MTPA (10 y 12 μ g respectivamente. Carril 8: insulina en tampón de Laemmli sin β -ME (4 μ g).

IV.6 Análisis de aminoácidos de MTPA.

Con el fin de comprobar la composición aminoacídica de MTPA, y determinar la concentración exacta de proteína para obtener su coeficiente de extinción molar (para así poder conocer la cantidad exacta de proteína empleada en los estudios posteriores con mitocondrias), se procedió a hidrolizar una muestra de MTPA y a determinarle la cantidad de cada aminoácido. Esta muestra de MTPA se había liofilizado en NH_4Ac 20 mM pH 8.6, para que al volatilizarse éste, quedara la proteína libre de sales. El cambio de tampón de Tris-HCl 10 mM pH 8.6 a NH_4Ac 20 mM pH 8.6 se realizó

mediante una cromatografía en Sephadex G-25. La Figura 29 muestra un perfil de esta cromatografía, donde se observa que MTPA eluyó en un pico que abarcó las fracciones 2 y 3.

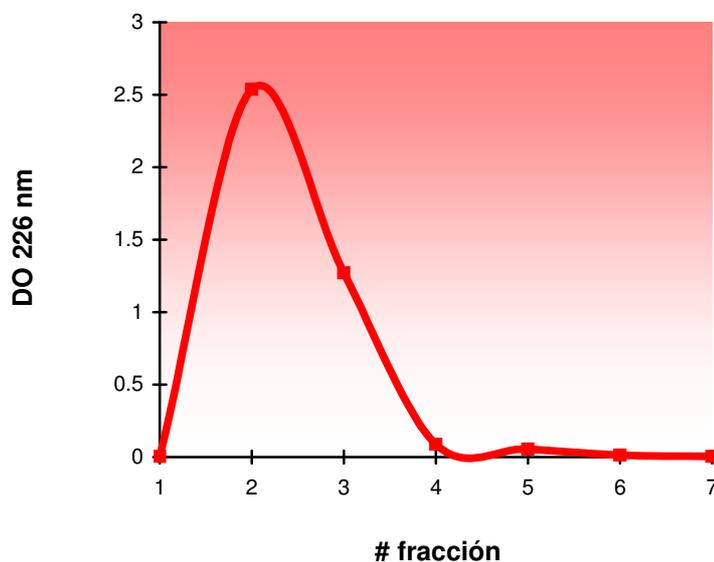


Figura 29. Cromatograma representativo (2 purificaciones) de MTPA en Sephadex G-25, equilibrado en tampón NH_4Ac 20 mM pH 8.6.

El pico de MTPA en NH_4Ac 20 mM pH 8.6, luego de ser liofilizado e hidrolizado, se inyectó en un analizador de aminoácidos. La Tabla 7 muestra la cantidad determinada de cada aminoácido en dos análisis diferentes correspondientes a diferentes lotes de MTPA. Como se observa, la composición aminoacídica coincidió con la esperada. Las cisteínas se degradaron parcialmente y por eso no se tuvieron en cuenta para la realización de los cálculos, al igual que todos aquellos aminoácidos con un margen de error superior al 10% con respecto a la relación molar teórica esperada.

Tabla 7. Análisis aminoacídico de MTPA. Asx y Glx representan Asp/Asn y Glu/Gln respectivamente, y se representan juntas porque eluyen en un único pico en cada caso. Los valores utilizados para el cálculo de la cantidad de proteína en cada análisis, se señalan con un asterisco.

A.A	nmol		Relación molar encontrada		Relación molar teórica
	Análisis 1	Análisis 2	Análisis 1	Análisis 2	
Asx	0.981*	1.928	1.97	2.58	2
Thr	1.711	4.102*	3.44	5.49	6
Ser	2.848*	4.598*	5.73	6.15	6
Glx	2.351*	4.192*	4.73	5.61	5
Pro	2.482*	7.366	5.00	9.86	5
Gly	2.160*	4.160	4.35	5.57	4
Ala	1.599*	2.813	3.22	3.76	3
Ile	0.302	0.807*	0.61	1.08	1
Lys	3.581	6.475*	7.21	8.67	9
Cys	-----	7.297	-----	9.77	19

IV.7 Determinación del coeficiente de extinción molar.

La determinación del coeficiente de extinción molar de la forma apo (libre de metal) a 220 nm se realizó con el objetivo de poder cuantificar la proteína usando su absorción a esta longitud de onda. Una pequeña alícuota de MTPA se diluyó en HCl 0.1 M. Al liberarse el metal de la proteína en estas condiciones ácidas, la contribución del enlace Zn-S a la absorbancia desaparece, sin que la absorción del metal libre sea significativa. De esta forma, se independiza la absorción de la proteína de las posibles pérdidas de metal en el proceso de purificación. La cuantificación de la cantidad exacta de proteína para esta determinación se realizó por análisis de aminoácidos. El coeficiente de extinción molar calculado resultó: $\epsilon_{220} = 51\,000 \pm 4\,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

IV.8 Obtención de la forma apo (TPA) de MTPA.

La TPA utilizada en los estudios con mitocondrias se obtuvo mediante una cromatografía en Sephadex G-25 equilibrado en HCl 10 mM, logrando así separar el metal de la proteína al romperse los enlaces Zn-S en medio ácido. La apoproteína se detectó a 220 nm, obteniéndose un perfil como el que se muestra en la Figura 30. Como se observa, la forma apo eluyó en un pico que abarcó las fracciones 2, 3 y 4.

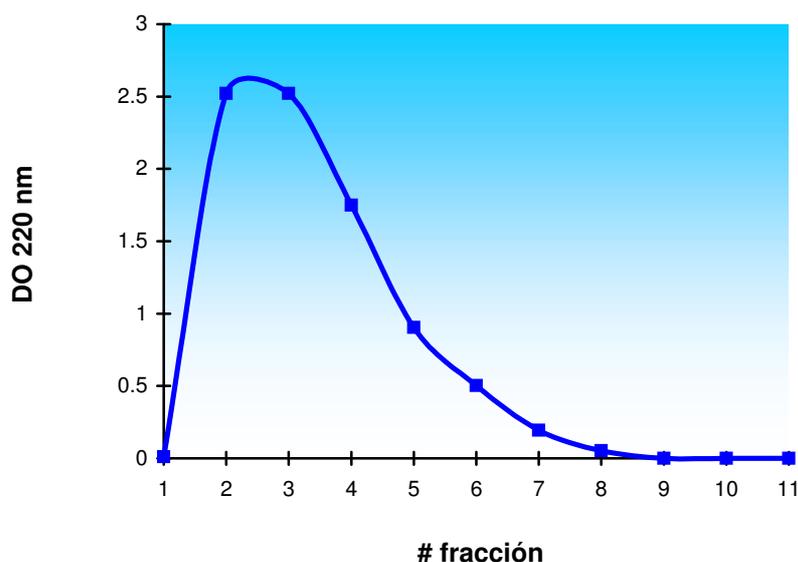


Figura 30. Cromatograma representativo (12 ensayos) de la purificación de TPA (forma apo) en Sephadex G-25, equilibrado en HCl 10 mM.

IV.9 Determinación de la estequiometría de Zn unido a MTPA.

Hasta el momento se conoce que tanto en las metalotioneínas de crustáceos como en las de mamíferos, los dominios con 9 cisteínas pueden unir 3 iones Zn^{2+} , mientras que el dominio de 11 cisteínas de mamíferos puede unir 4 iones Zn^{2+} . Sin embargo, no se conoce cuantos iones Zn^{2+} podría unir un dominio con 10 cisteínas. Teniendo en cuenta esto, nos propusimos determinar la estequiometría de unión a Zn^{2+} de MTPA mediante diferentes técnicas de análisis, con el fin de poder establecer si la décima cisteína en el dominio C-terminal de esta proteína podría aumentar la capacidad de unión de este metal.

IV.9.1 HPLC-RP-ESI-MS

La Espectrometría de Masas (MS) se basa en la ionización de los componentes de la muestra y en la posterior separación de los iones obtenidos en función de su relación masa-carga. Una de las formas de calcular la estequiometría de unión MTPA/Zn fue mediante la determinación de la diferencia de pesos moleculares entre las formas apo y holo de la proteína, determinados por Espectrometría de Masas de ionización por Electro spray (ESI-MS) con HPLC-RP acoplado. La forma apo se inyectó a una columna Zorbax C18 300A y la proteína se detectó por su absorbancia a 220 nm, observándose un pico mayoritario a 22.480 min con un “hombro” (o pico minoritario) a 22.375 min (Figs. 31 y 32), cuyos espectros UV (Figs. 33 y 34) fueron similares y característicos de apometalotioneína (You y col., 1999; Dallinger y col., 2001). A 2.082 min se observó además un pico en el cromatograma de masas (Fig. 31A) que corresponde al Tris.

El espectro de masas del pico minoritario de la forma apo mostró 6 estados de ionización (8+, 7+, 6+, 5+, 4+ y 3+), siendo 4+ el más intenso con una relación m/z igual a 1543.8 (Fig. 35). La deconvolución de este espectro de masas (Fig. 36) rindió una masa molecular de 6171 ± 2 D.

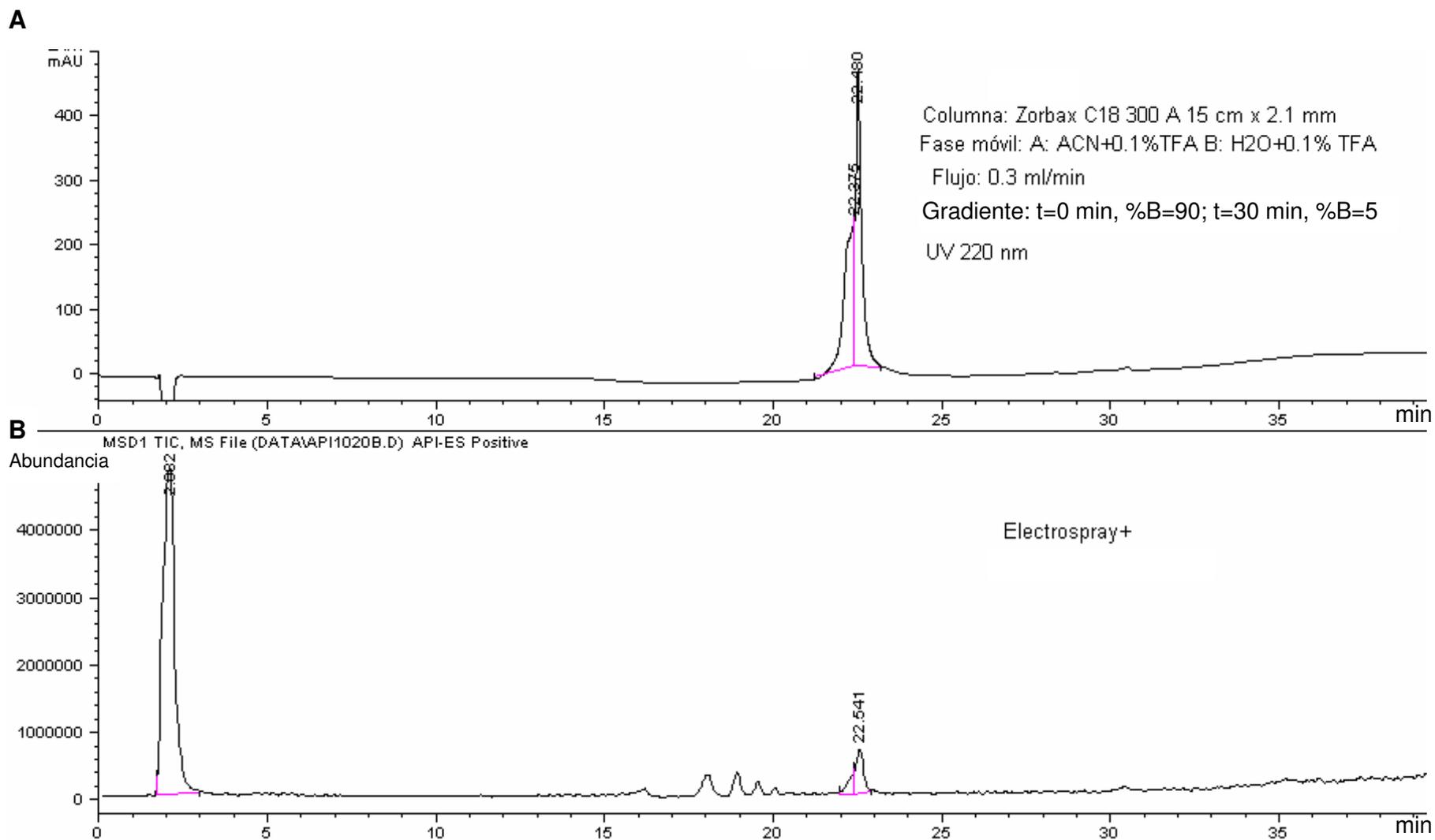


Figura 31. Cromatogramas de TPA en HPLC-RP-ESI-MS. A. Cromatograma de HPLC-RP. B. Cromatograma de masas.

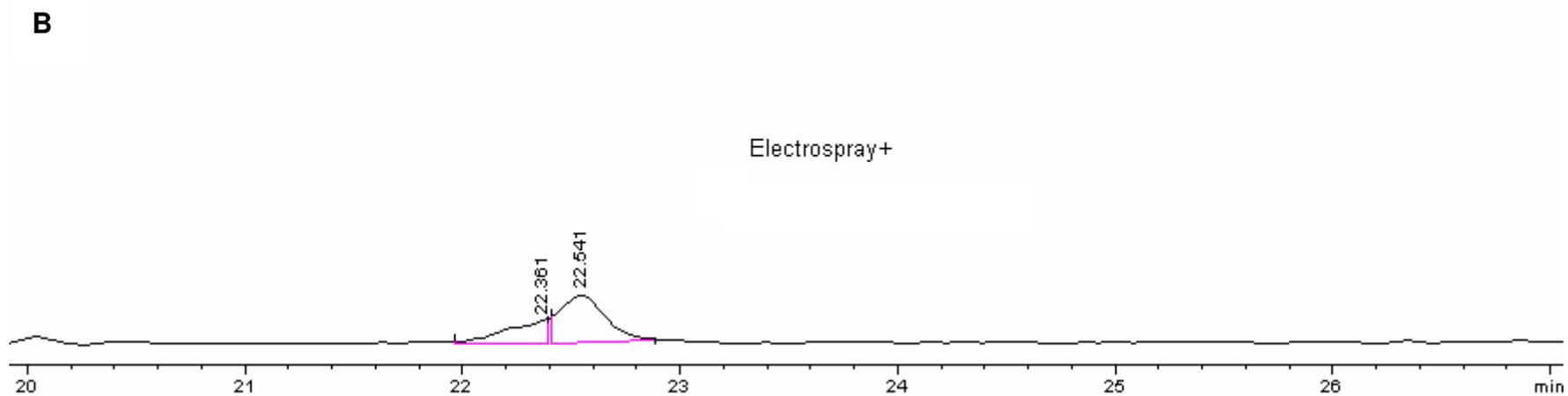
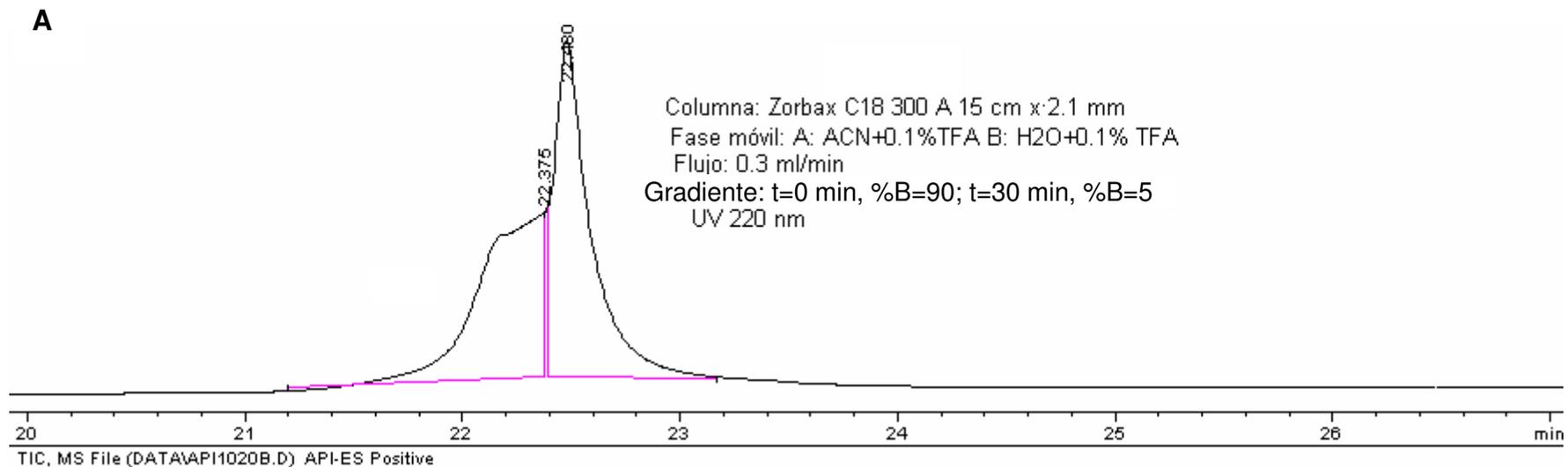


Figura 32. Ampliación de los cromatogramas de TPA en HPLC-RP-ESI-MS. A. Cromatograma de HPLC-RP. B. Cromatograma de masas.

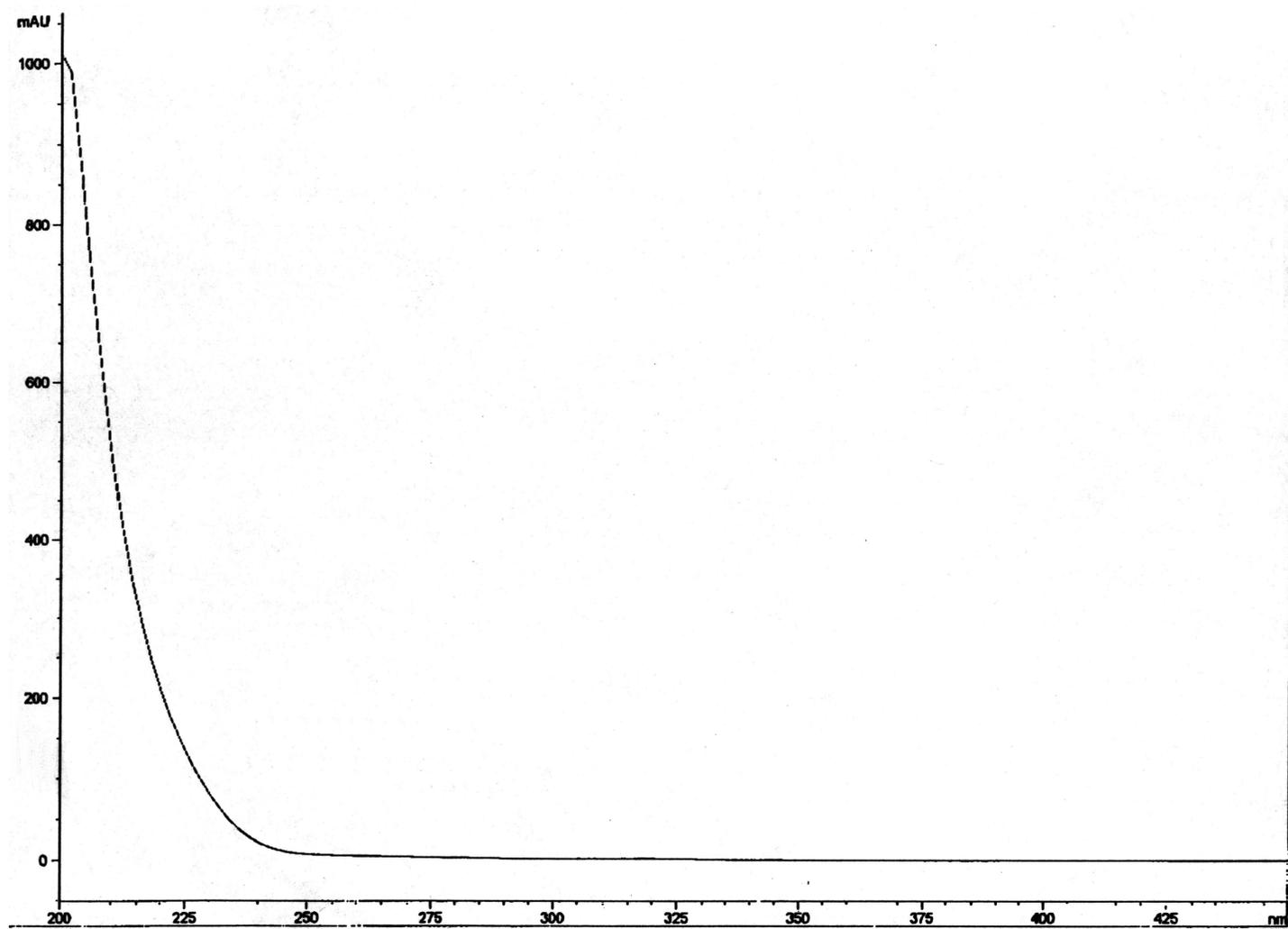


Figura 33. Espectro UV del pico minoritario de la forma apo en HPLC-RP-ESI-MS.

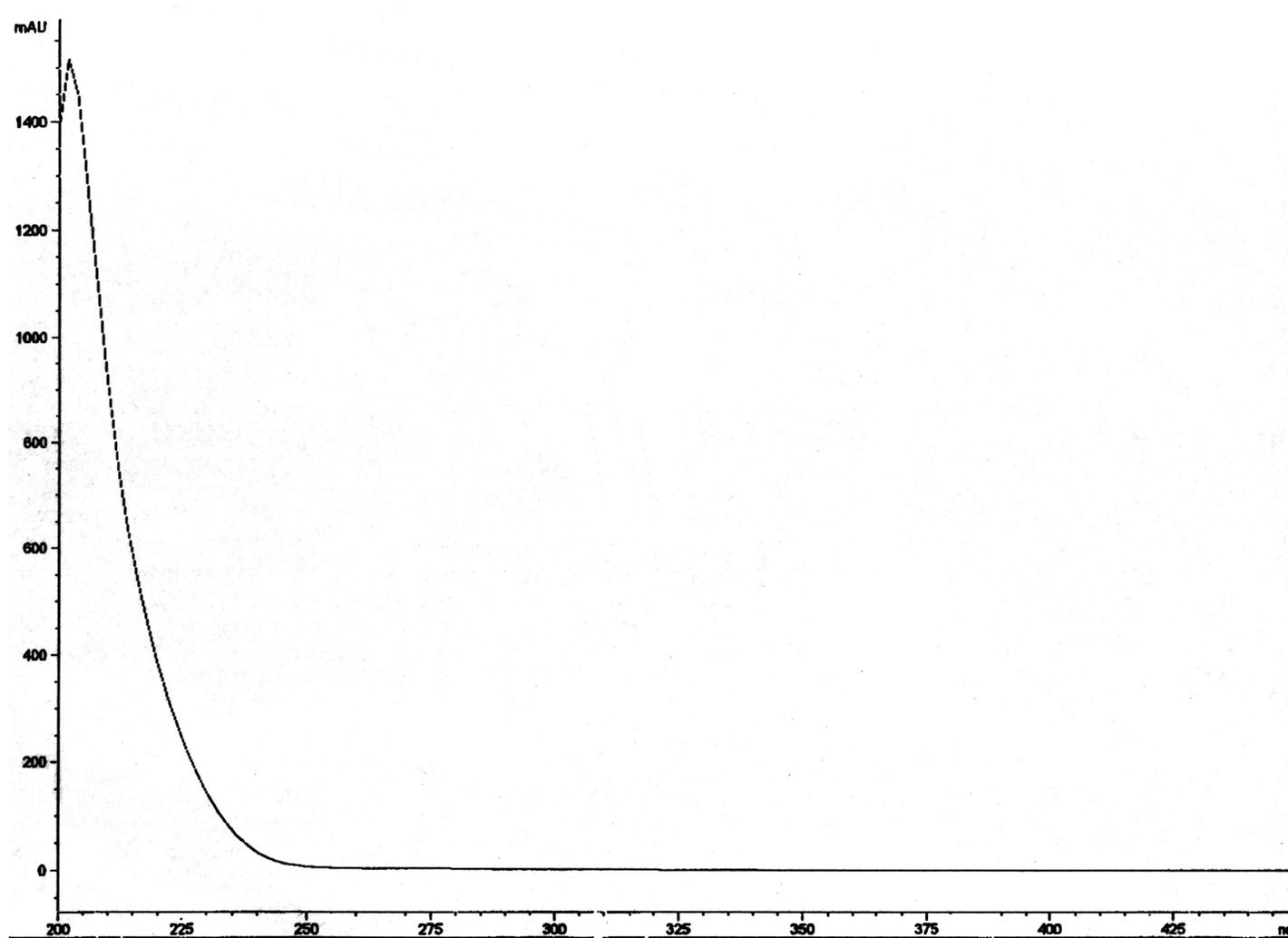


Figura 34. Espectro UV del pico mayoritario de la forma apo en HPLC-RP-ESI-MS.

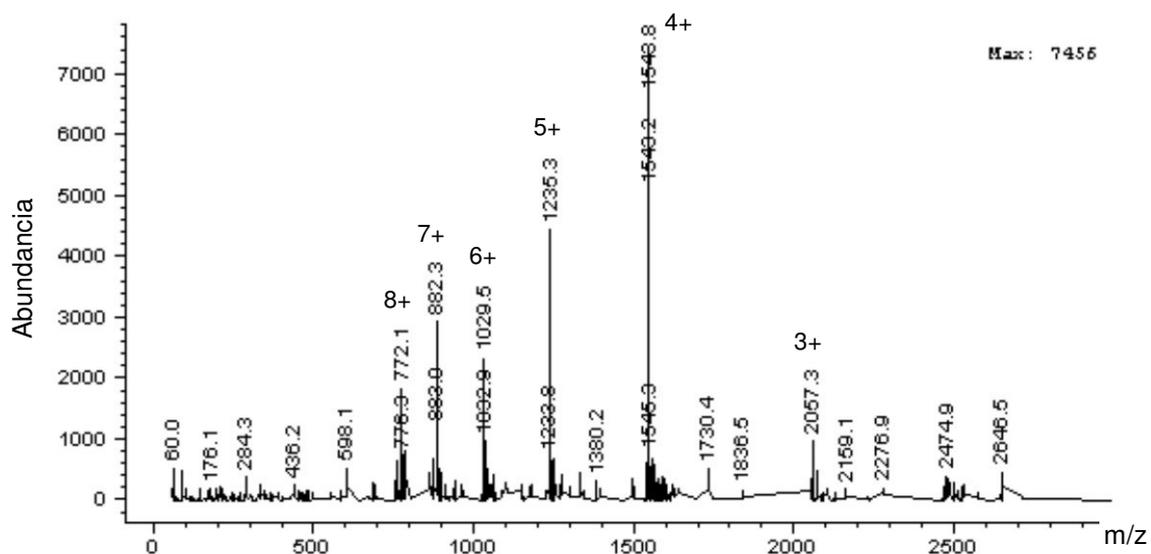


Figura 35. Espectro de masas del pico minoritario de la forma apo en HPLC-RP-ESI-MS.

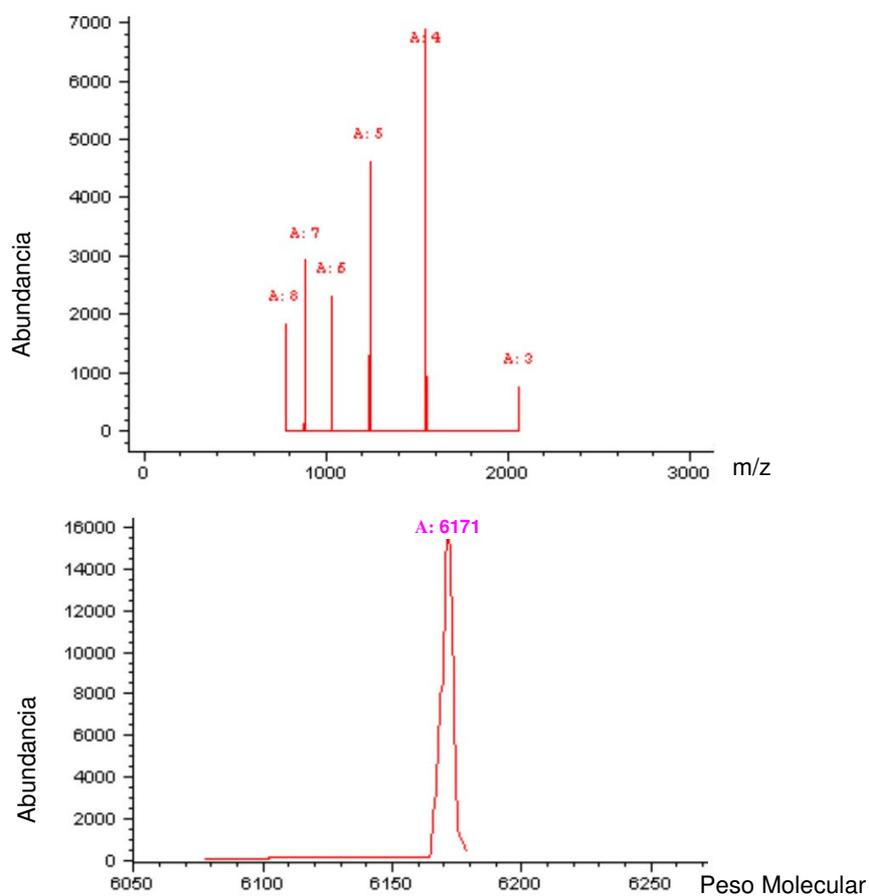


Figura 36. Deconvolución del espectro de masas del pico minoritario de la forma apo en HPLC-RP-ESI-MS.

El espectro de masas del pico mayoritario de la forma apo mostró 8 estados de ionización (10+, 9+, 8+, 7+ 6+, 5+, 4+ y 3+), siendo 7+ y 4+ los más intensos con relaciones m/z de 883.1 y 1544.4, respectivamente (Fig. 37). La deconvolución de este espectro de masas (Fig. 38) rindió una masa molecular de 6174 ± 3 D.

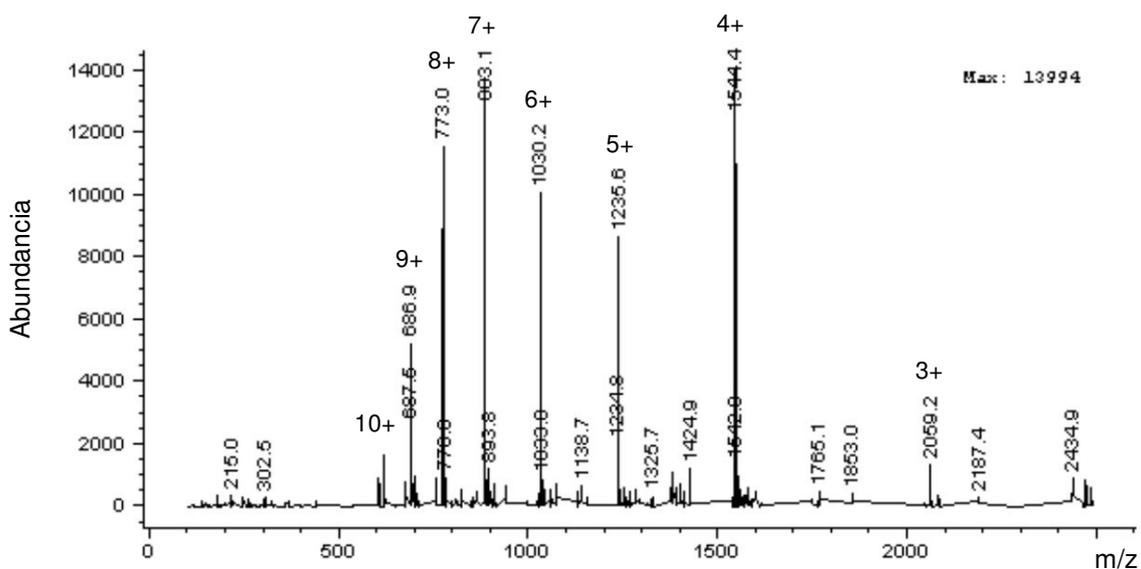


Figura 37. Espectro de masas del pico mayoritario de la forma apo en HPLC-RP-ESI-MS.

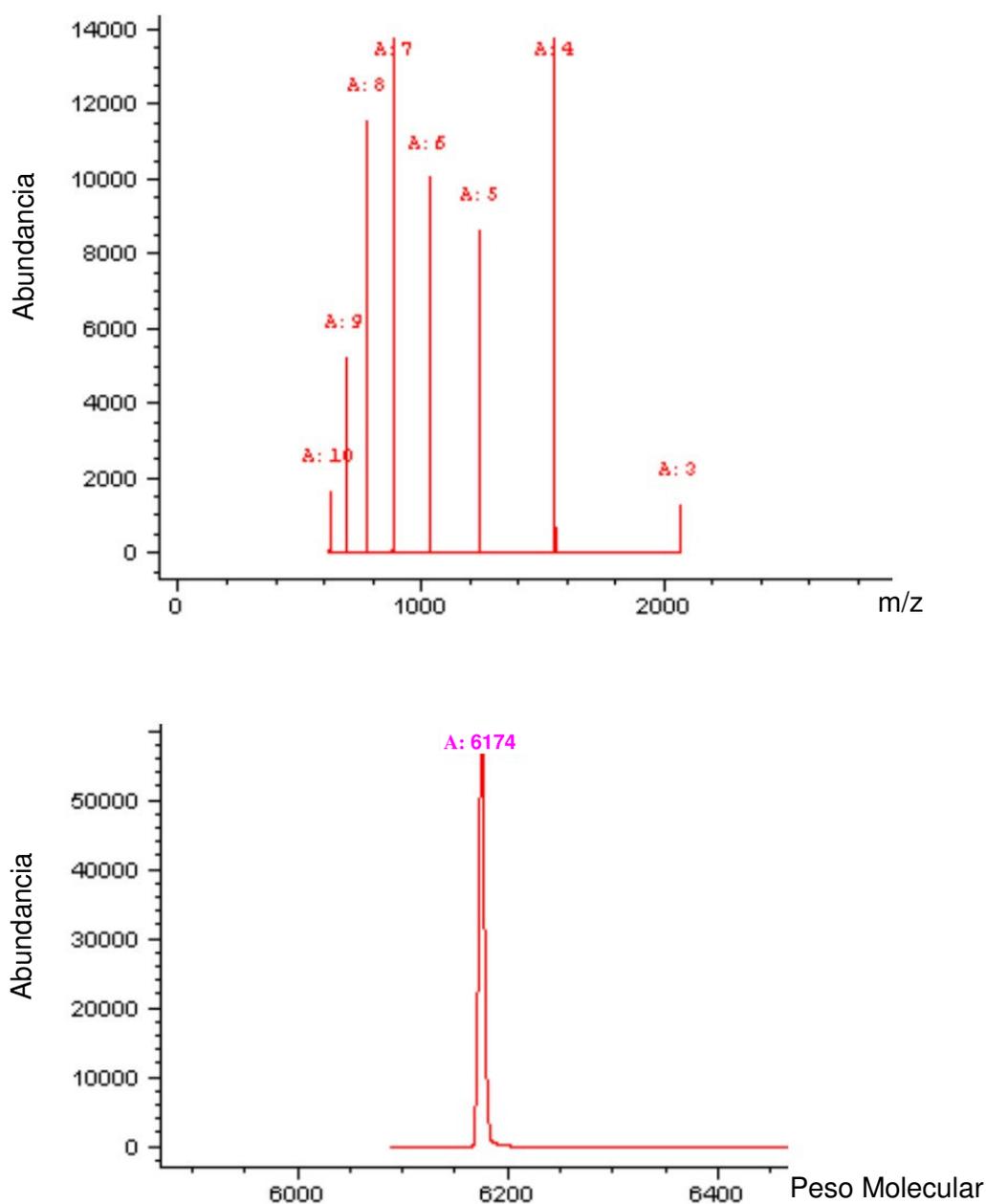


Figura 38. Deconvolución del espectro de masas del pico mayoritario de la forma apo en HPLC-RP-ESI-MS.

La forma holo se inyectó a una columna Vydac C4, y al igual que la forma apo, la proteína se detectó por su absorbancia a 220 nm. Se obtuvo un pico mayoritario a 13.072 min y un pico minoritario a 13.641 min (Figs. 39 y 40). Además, en el cromatograma de masas a los 6.239 min se observó un pico que corresponde al Tris (Fig. 39 A).

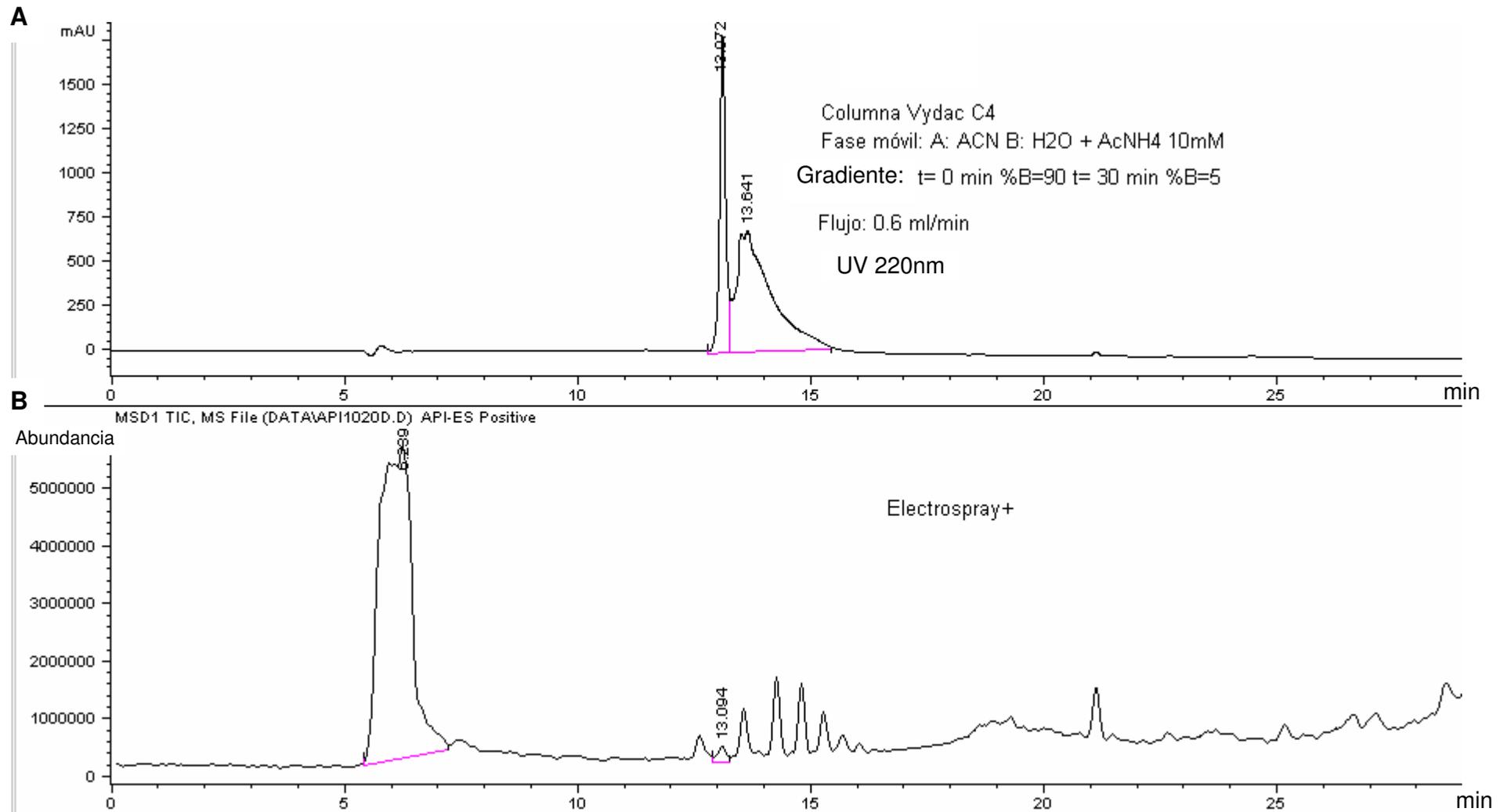


Figura 39. Cromatogramas de MTPA en HPLC-RP-ESI-MS. A. Cromatograma de HPLC-RP. B. Cromatograma de masas.

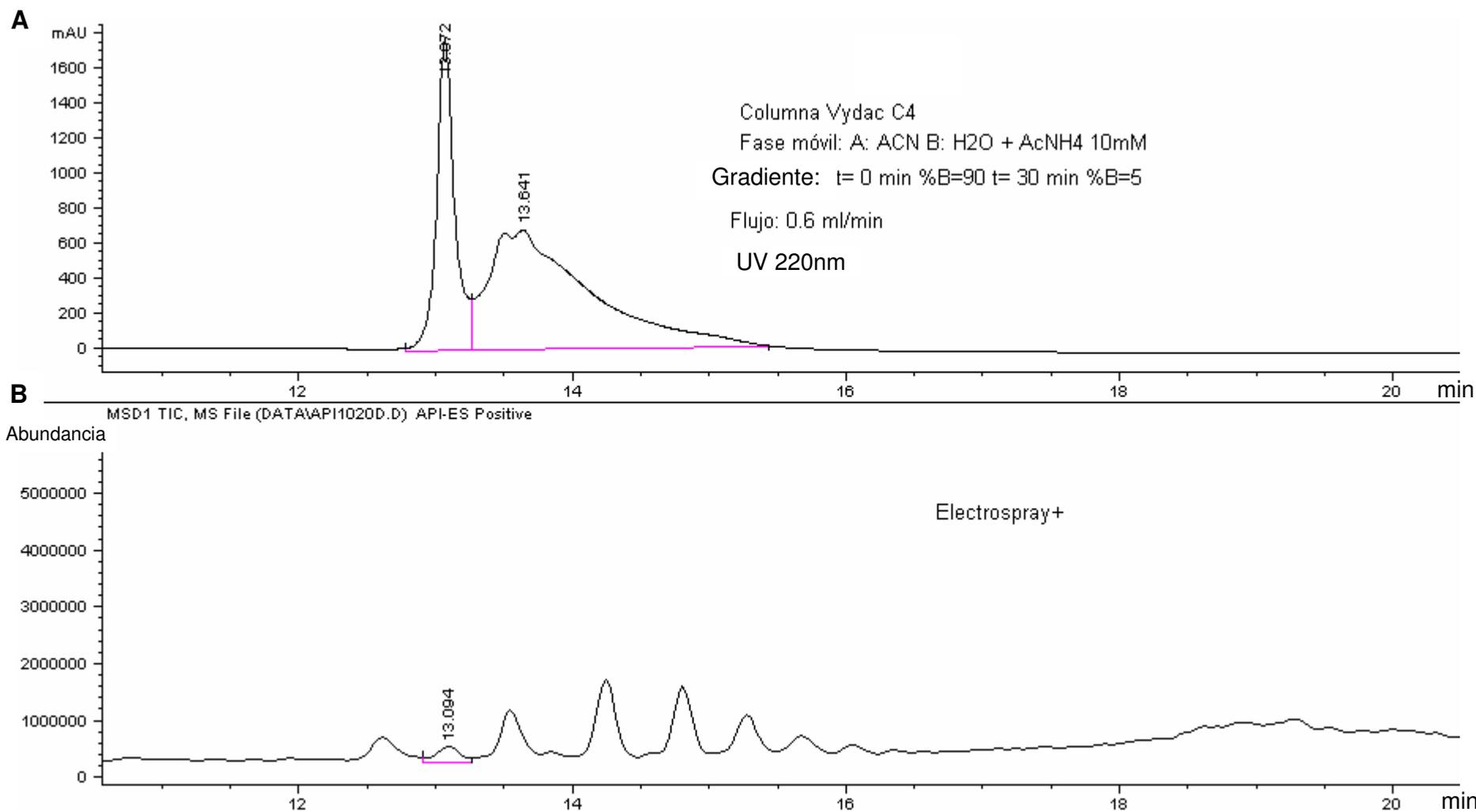


Figura 40. Ampliación de los cromatogramas de MTPA en HPLC-RP-ESI-MS. A. Cromatograma de HPLC-RP. **B.** Cromatograma de masas.

El espectro de masas del pico mayoritario de la forma holo, mostró 7 estados de ionización (9+, 8+, 7+ 6+, 5+, 4+ y 3+), siendo 5+ el más intenso con una relación m/z igual a 1311.8 (Fig. 41). La deconvolución de este espectro de masas (Fig. 42) rindió una masa molecular de 6551 ± 2 D.

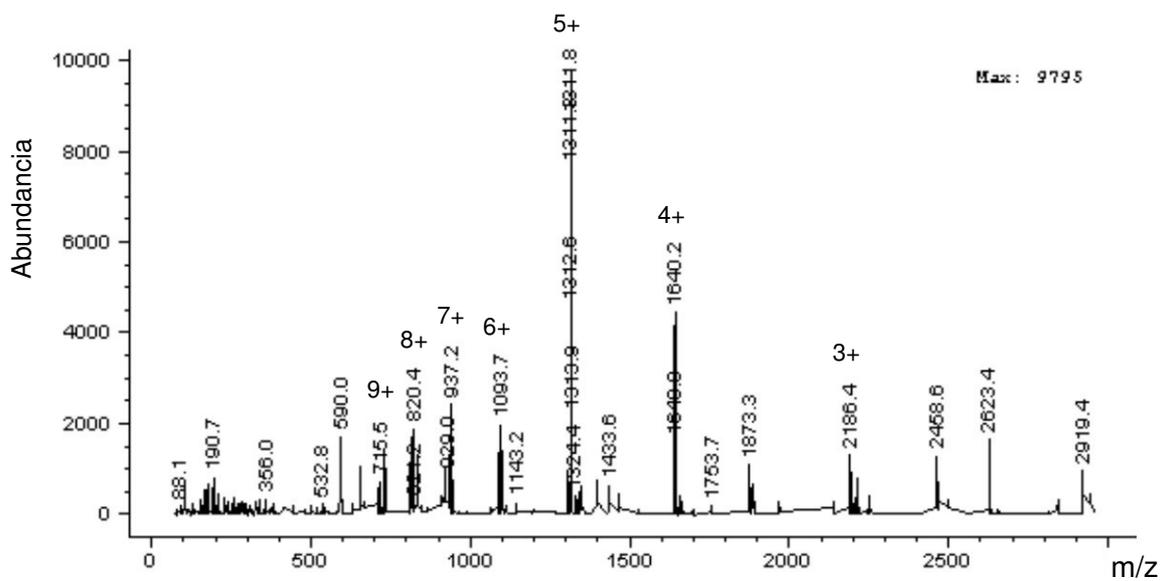


Figura 41. Espectro de masas del pico mayoritario de la forma holo en HPLC-RP-ESI-MS.

El espectro de masas del pico minoritario de la forma holo mostró 7 estados de ionización (9+, 8+, 7+ 6+, 5+, 4+ y 3+), siendo 5+ y 4+ los más intensos. La deconvolución de este espectro de masas (Fig. 43) rindió una masa molecular de 6557 ± 2 D.

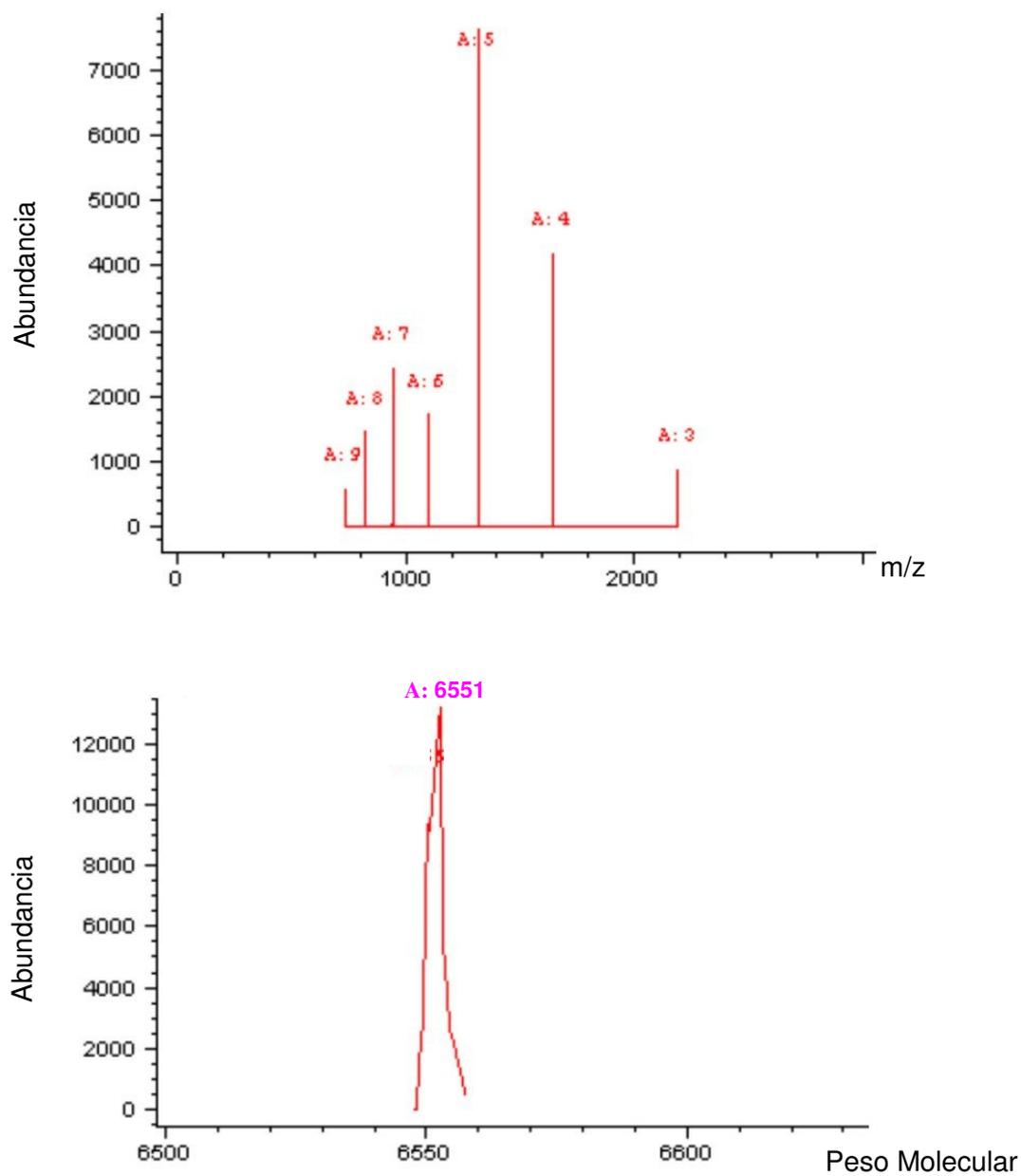


Figura 42. Deconvolución del espectro de masas del pico mayoritario de la forma holo en HPLC-RP-ESI-MS.

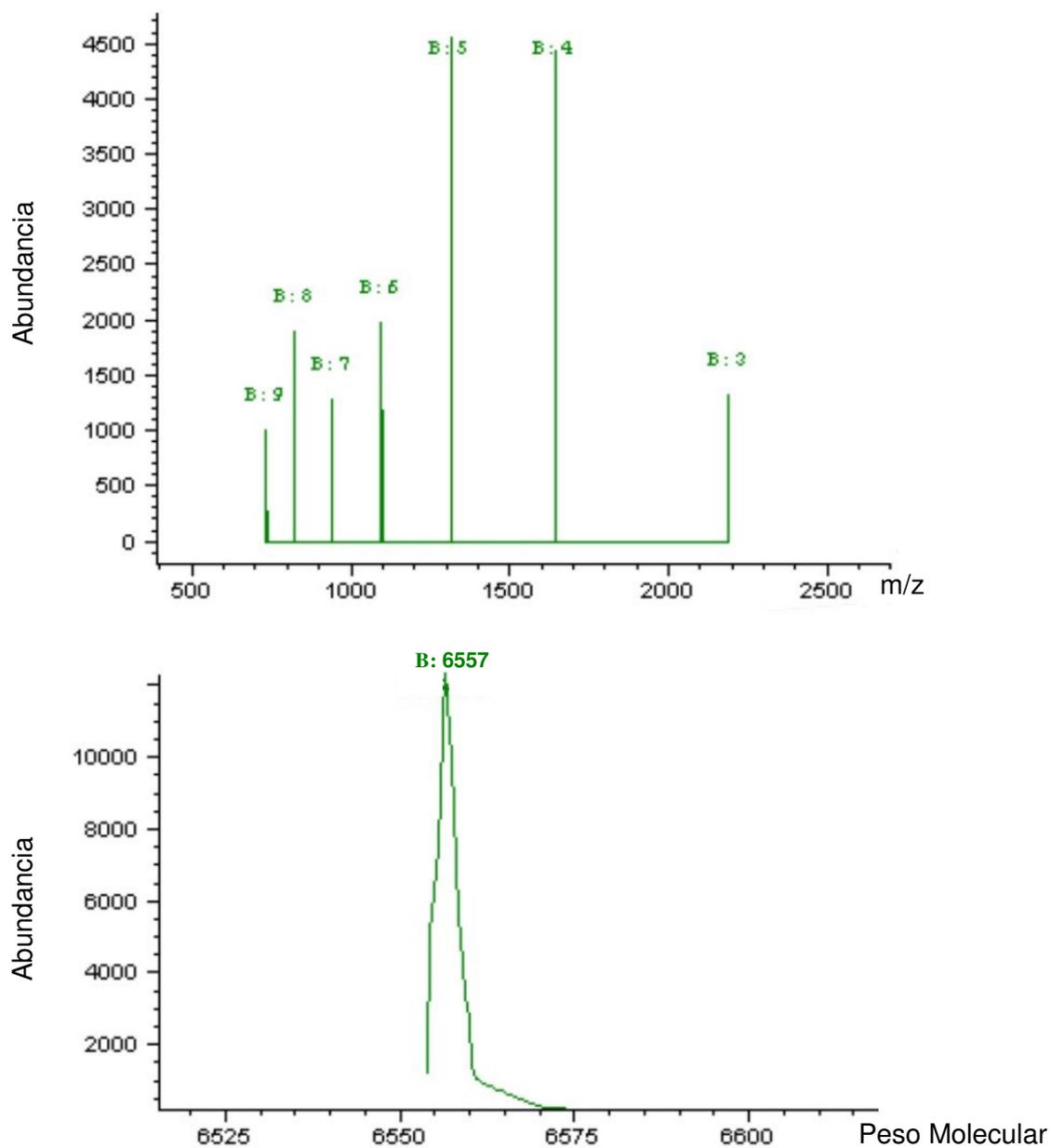


Figura 43. Deconvolución del espectro de masas del pico minoritario de la forma holo en HPLC-RP-ESI-MS.

IV.9.2 ESI-MS

La diferencia de pesos moleculares entre las formas apo y holo de la proteína, también se determinó por Espectrometría de Masas de Ionización por Electrospray (ESI-MS) en modo directo, es decir ambas formas se inyectaron directamente en el espectrómetro de masas sin purificarlas previamente por HPLC-RP acoplado. El espectro de masas correspondiente a la forma apo mostró 3 estados de ionización (6+, 5+, y 4+), siendo 6+ el más intenso con una relación m/z igual a 1029.8 (Fig. 44). El cálculo de la masa molecular resultó de 6177 ± 2 D.

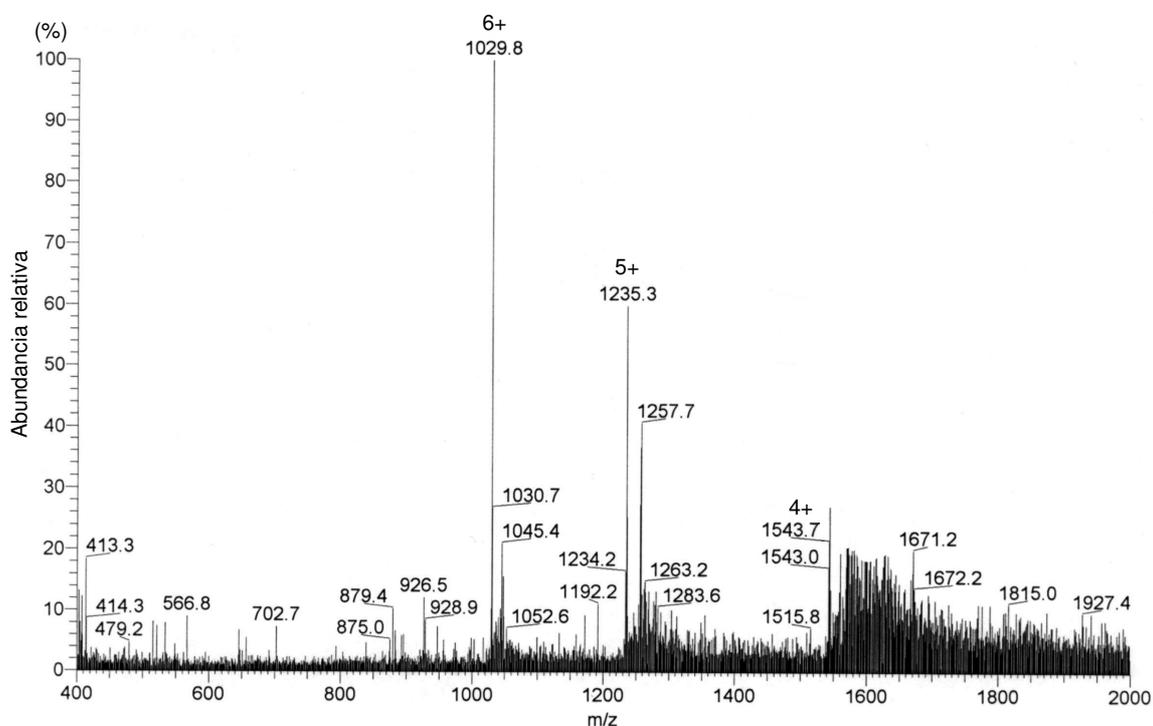


Figura 44. Espectro de masas representativo (2-3 análisis independientes) de la forma apo en ESI-MS en modo directo.

Por otro lado, el espectro de masas de la forma holo mostró 2 estados de ionización (6+ y 4+), siendo 4+ el más intenso con una relación m/z igual a 1638.1 (Fig. 45). La forma 5+ no se observó, aunque podría estar alrededor del pico de relación m/z 1314.9. El cálculo de la masa molecular resultó igual a 6564 ± 16 D.

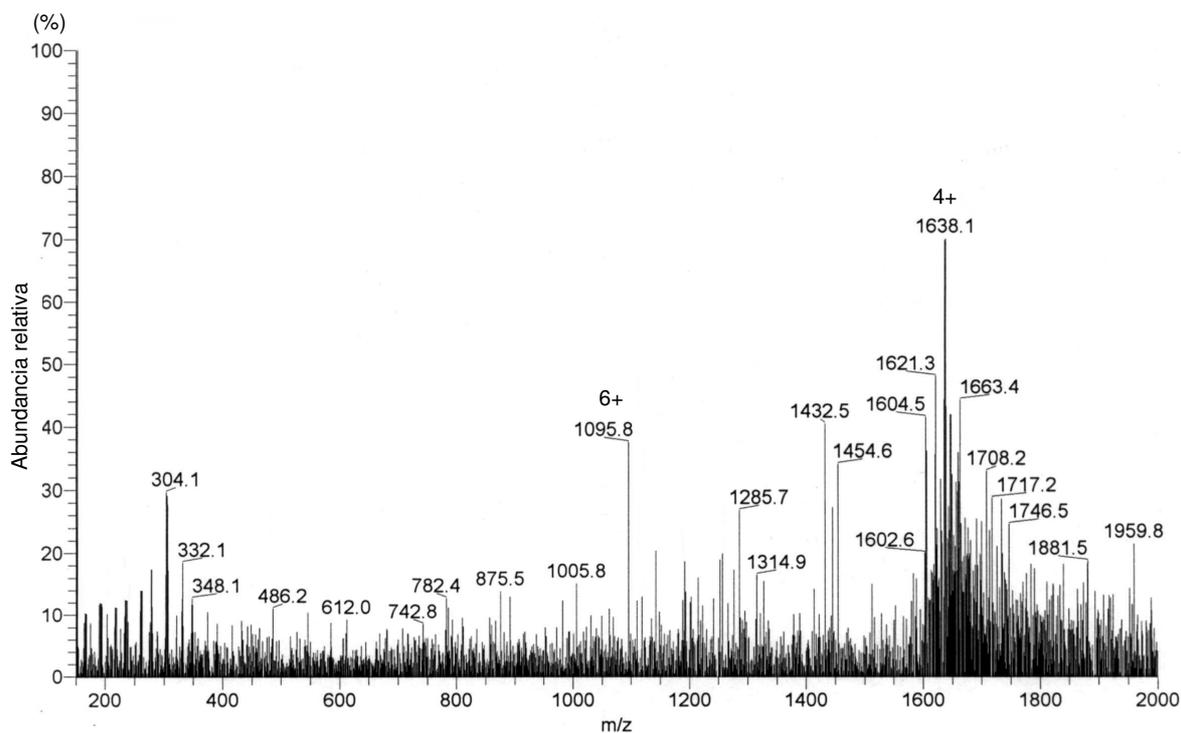


Figura 45. Espectro de masas representativo (2-3 análisis independientes) de la forma holo en ESI-MS en modo directo.

El cálculo del número de Zn^{2+} por molécula de MTPA, determinado tanto por ESI-MS como por HPLC-RP-ESI-MS, se muestra en la Tabla 8, donde además se resumen las masas moleculares de ambas formas de la proteína.

Tabla 8. Masas moleculares de MTPA (forma holo) y TPA (forma apo), y números de iones Zn^{2+} por molécula de MTPA, determinados por ESI-MS y HPLC-RP-ESI-MS. Se presenta la media \pm SD de 2-3 valores, en el caso de ESI-MS, y la media entre el pico mayoritario y el pico minoritario \pm SD, en el caso de HPLC-RP-ESI-MS. ^aDeterminado según la fórmula de Yu y col. (1993) (apartado III.16.1), considerando 6 Zn^{2+} por molécula de MTPA y el valor teórico de la masa molecular de la forma apo (determinada utilizando la herramienta "ProtParam").

Forma	Método	Masa molecular (D)	Iones Zn^{2+} por molécula de MTPA
Apo	ESI-MS	6177 ± 2	-----
	HPLC-RP-ESI-MS	6172 ± 4	-----
	teórico	6175.2	-----
Holo	ESI-MS	6564 ± 16	6.1 ± 0.3
	HPLC-RP-ESI-MS	6554 ± 3	6.03 ± 0.08
	teórico	6555.5^a	-----

IV.9.3 Técnica de Fluorescencia de Rayos X por Reflexión Total (TXRF).

La TXRF es una espectroscopía basada en el fenómeno de fluorescencia de rayos X, que utiliza la emisión secundaria o fluorescente de rayos X generada al excitar una muestra con una fuente de rayos X. La muestra irradiada emite fotones de rayos X secundarios, característicos de cada uno de los elementos químicos presentes en ella, generándose un espectro de dispersión de energía en el que aparecen simultáneamente todas las transiciones asociadas a los elementos químicos presentes. Analizando la posición de los máximos de intensidad, se identifican los elementos presentes (análisis cualitativo), mientras que deconvolucionando e integrando cada uno de los perfiles elementales se obtienen las proporciones másicas de los elementos presentes (análisis semicuantitativo). Si se añade un elemento patrón de concentración conocida, se obtiene la cuantificación absoluta de dichos elementos (análisis cuantitativo).

En nuestro caso no fue necesario realizar un análisis cuantitativo, porque lo que queríamos determinar era la proporción másica Zn:S, para así calcular la estequiometría Zn:MTPA, teniendo en cuenta que cada molécula de MTPA contiene 19 átomos de S.

El análisis cualitativo de las muestras de MTPA, reveló la presencia de los elementos: S, Zn, K, Ca, Fe, Cu, Ni y Pb, según el espectro de dispersión de energía que se muestra en la Figura 46. El análisis semicuantitativo de los elementos detectados se observa en la tabla 9.

Tabla 9. Análisis semicuantitativo de los elementos presentes en MTPA, mediante TXRF. u.m.r. – unidades de masa relativa al S. Para cada elemento se presenta la media \pm SD de 3 análisis independientes.

Elemento	Cantidad (u.m.r)
S	100 \pm 10
Zn	34.7 \pm 8.3
K	1.1 \pm 0.1
Ca	1.0 \pm 0.1
Fe	0.59 \pm 0.01
Cu	0.58 \pm 0.01
Ni	0.085 \pm 0.007
Pb	0.04 \pm 0.01

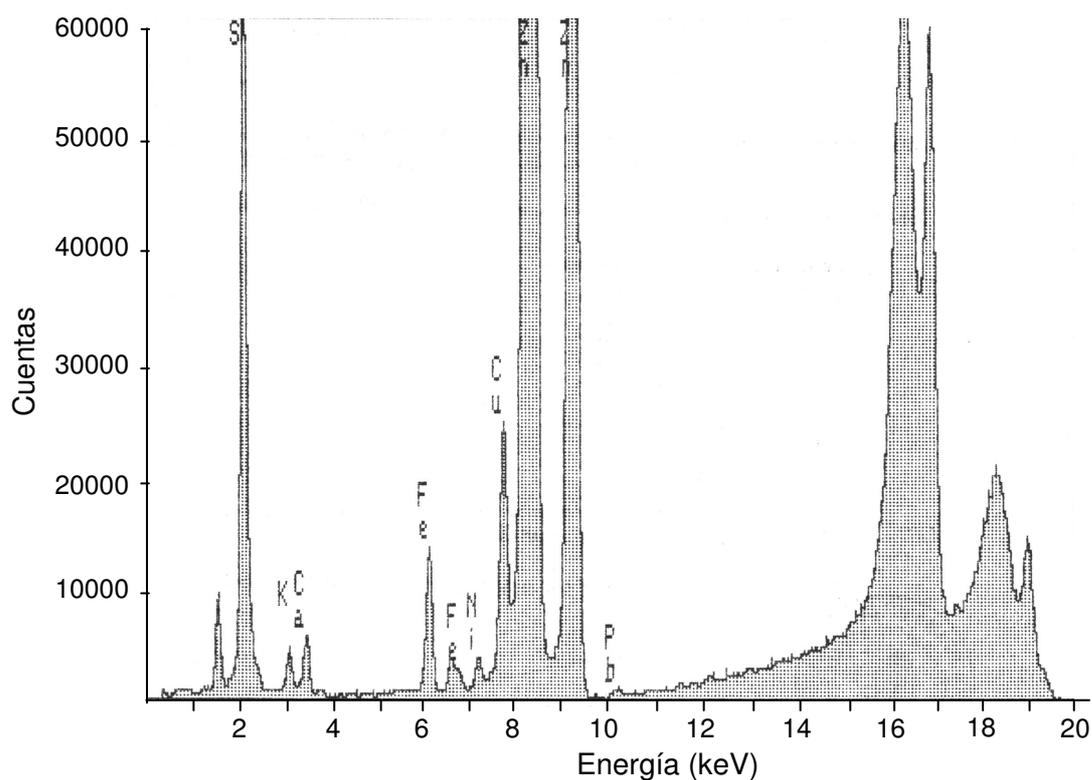


Figura 46. Espectro de dispersión de energía por TXRF de MTPA, representativo de 3 análisis independientes, utilizando un tiempo de conteo de 500 s.

A partir de las u.m.r del Zn con respecto al S, se calculó por regla de tres la cantidad de Zn por molécula de MTPA. El resultado se presenta en la Tabla 10, en comparación con las estequiometrías determinadas por ESI-MS.

Tabla 10. Comparación de las estequiometrías Zn:MTPA determinadas por HPLC-RP-ESI-MS, ESI-MS y TXRF. Se presenta la media \pm SD de 2-3 valores.

Técnica	Iones Zn ²⁺ por molécula de MTPA
HPLC-RP-ESI-MS	6.03 \pm 0.08
ESI-MS	6.1 \pm 0.3
TXRF	6.6 \pm 1.6

IV.10 Construcción de un modelo preliminar de la estructura tridimensional del dominio C-terminal de MTPA.

Con vistas a contrastar los resultados obtenidos en las diferentes técnicas de análisis, con la predicción del número posible de iones Zn^{2+} enlazados por el dominio C-terminal de MTPA, de acuerdo a la distribución de las cisteínas en la estructura, elaboramos un modelo preliminar de la estructura tridimensional de este dominio. La construcción del modelo se realizó por homología con las estructuras de los dominios C-terminal de MT-1 de *C. sapidus* (**1dmc**) y de la MT de *H. americanus* (**1j5l**).

La Figura 47 muestra diferentes formas del modelo de estructura obtenido, en las cuales se observa que una de las cisteínas del dominio se encuentra orientada hacia el exterior, mientras que el resto (9) se encuentran orientadas hacia el interior de la estructura. Por otro lado en la Figura 48, se observa cómo variaría en este modelo la distancia entre el S de la cisteína intermedia del triplete de cisteínas y los S de las cisteínas contiguas si se produjera una rotación la cadena lateral de la cisteína intermedia del triplete, alrededor del enlace $C\beta-C\gamma$.

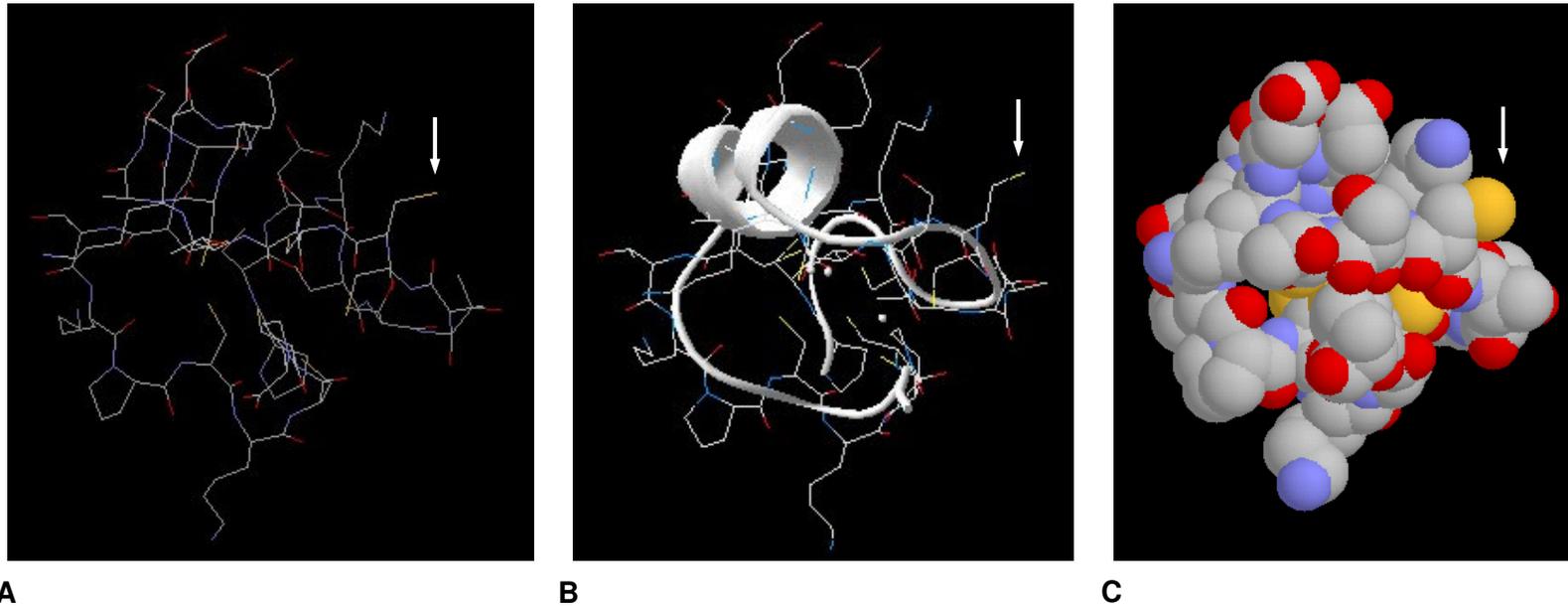
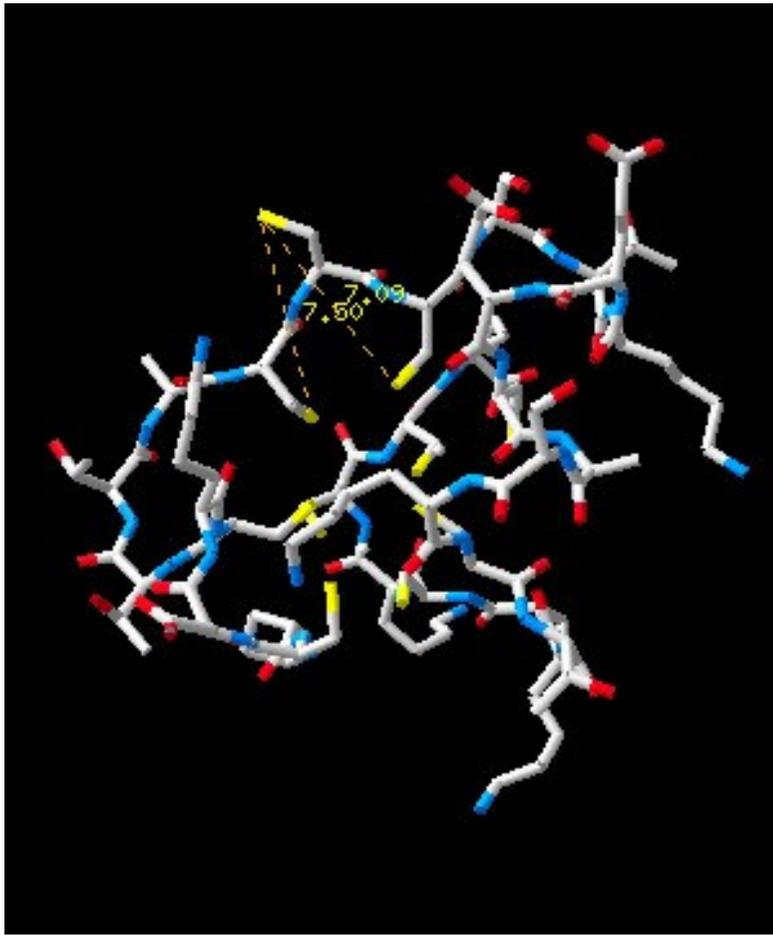
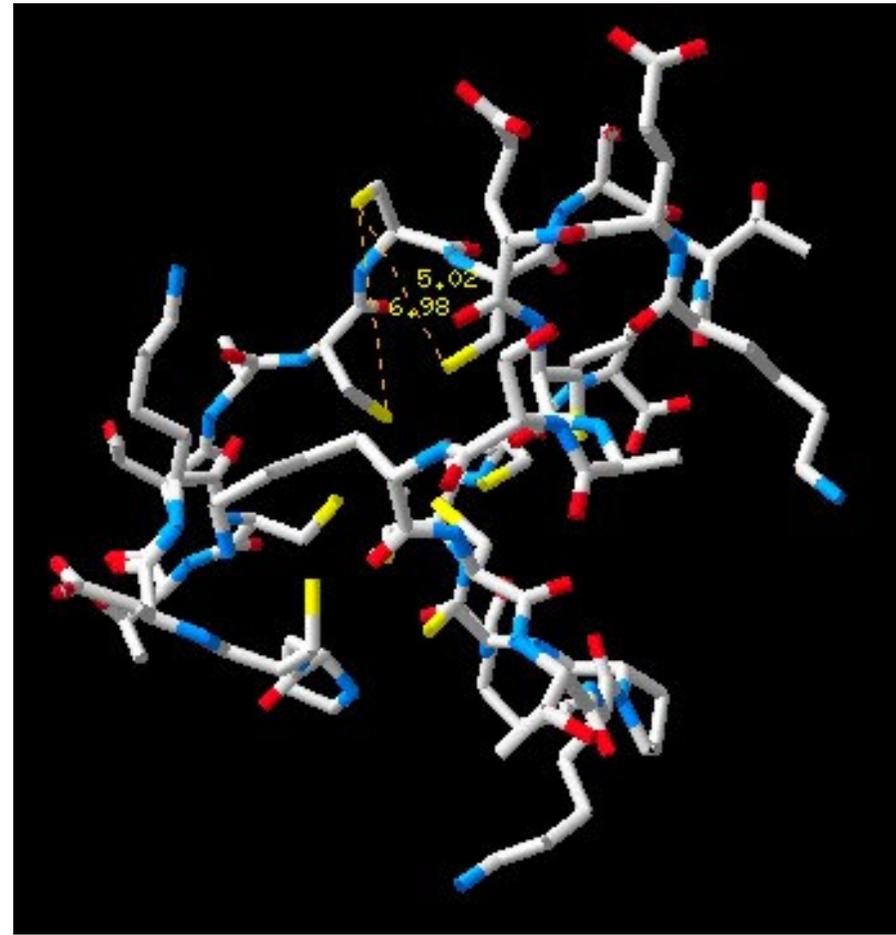


Figura 47. Modelo preliminar de la estructura tridimensional del dominio C-terminal de MTPA, construido por homología con las estructuras de los dominios C-terminal de MT-1 de *C. sapidus* y de la MT de *H. americanus*. **A.** Modelo esquelético que muestra las posiciones de los átomos. **B.** Modelo de cinta del armazón en el que se observa una hélice α y el resto de las regiones irregulares o de “loops” del dominio. **C.** Modelo de relleno espacial, en el que se muestran los radios de van der Waals de todos los átomos. En los 3 modelos la cisteína orientada hacia el exterior se señala con una flecha. Los colores representan: gris, C; azul, N; rojo, O; amarillo, S.



A



B

Figura 48. Modelo preliminar de la estructura del dominio C-terminal de MTPA donde se muestra la distancia entre el S de la cisteína intermedia del triplete de cisteínas y los S de las cisteínas contiguas. A. Modelo obtenido directamente. B. Modelo obtenido al rotar la cadena lateral de la cisteína intermedia del triplete, alrededor del enlace C β -C γ . Los colores representan: gris, C; azul, N; rojo, O; amarillo, S.

IV.11 Determinación del efecto de MTPA (TPA-Zn) y de su forma apo (TPA) sobre el consumo de oxígeno de mitocondrias de hígado de ratón.

Teniendo en cuenta que el Zn^{2+} puede inhibir la respiración mitocondrial a concentraciones micromolares (Skulachev y col., 1967), y que recientemente se ha propuesto que las metalotioneínas podrían ser importadas a las mitocondrias hepáticas, nos propusimos evaluar el efecto de MTPA-Zn₆ y su forma apo libre de metal (TPA), sobre el consumo mitocondrial de oxígeno. En primer lugar realizamos el ensayo en mitocondrias hepáticas de ratones de 2 meses, para luego ensayar con mitocondrias de hepatopáncreas de bogavante.

Una vez obtenidas las mitocondrias hepáticas con un rendimiento de alrededor de 7.5 mg por gramo de tejido, se determinó la velocidad del consumo de oxígeno de éstas, en presencia o ausencia de MTPA (TPA-Zn) y TPA (ambas a 10 μ M), utilizando un electrodo de oxígeno polarográfico tipo Clark. La Figura 49 muestra un esquema de las curvas obtenidas en cada caso, añadiendo la MTPA o la TPA en diferentes momentos con respecto a la adición del succinato y del ADP.

Como se observa en la Figura 50, MTPA produjo una disminución significativa del consumo de oxígeno iniciado por succinato (estado 4 de la respiración), al ser añadida después de este sustrato, mientras que la forma apo TPA produjo el efecto contrario, al ser añadida en el mismo orden con respecto al succinato. Por otro lado, sobre el consumo de oxígeno iniciado por ADP (estado 3 de la respiración) (Fig. 51), sólo MTPA produjo una disminución significativa del consumo al ser añadida después del succinato, tanto antes de añadir ADP como después de haber añadido éste. El aumento provocado por la TPA, independientemente del orden de adición, no fue significativo en ningún caso.

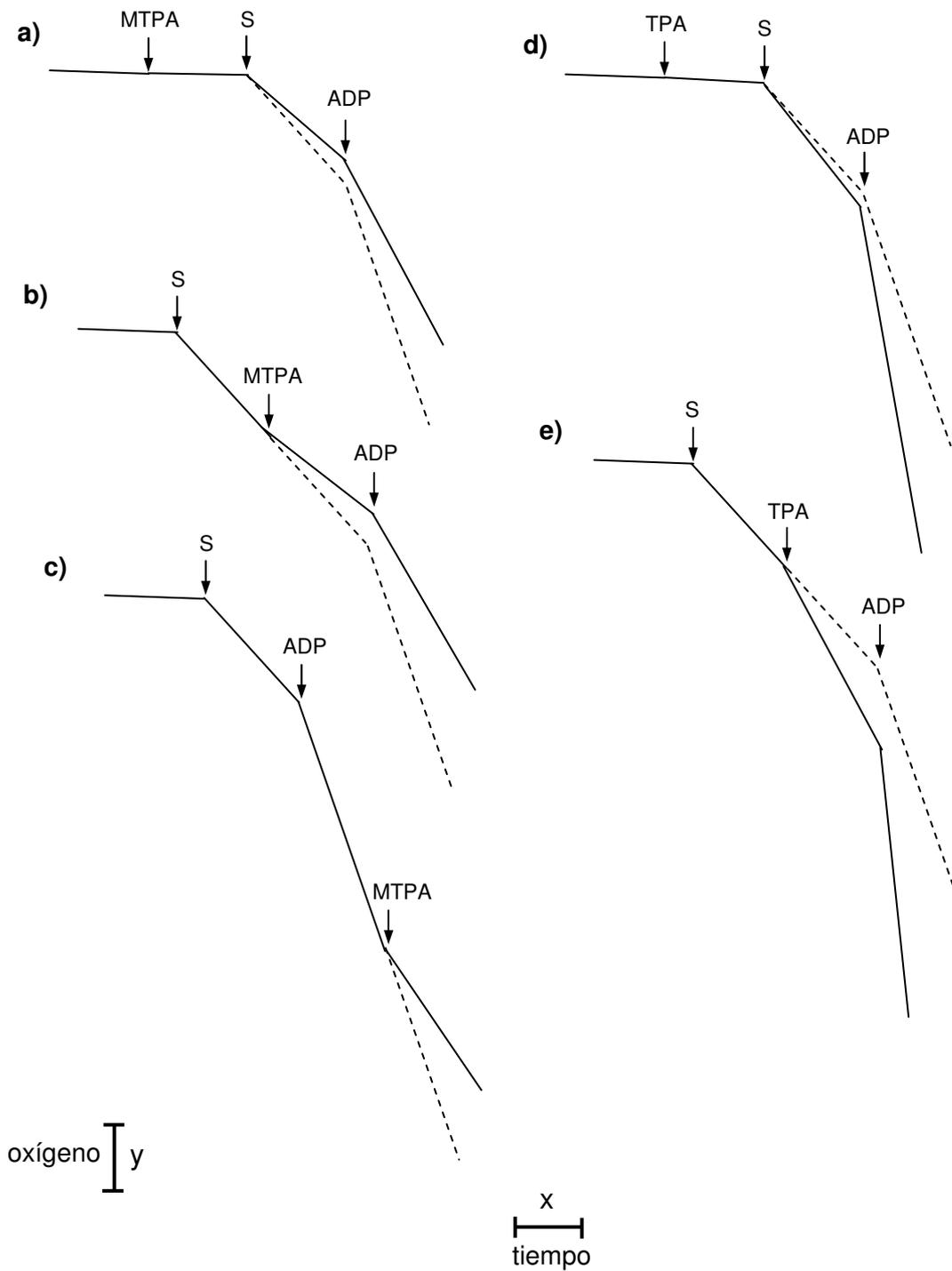


Figura 49. Esquema representativo del efecto de MTPA y TPA sobre la velocidad del consumo de oxígeno de mitocondrias de ratón. ---- = no MTPA o TPA. — = MTPA 3 μ M: a), b) y c), o TPA 3 μ M: d) y e). S = Succinato. Barras: x = 3 min, y = 23.4 nmol de átomos de oxígeno. El momento de cada adición se representa con una flecha.

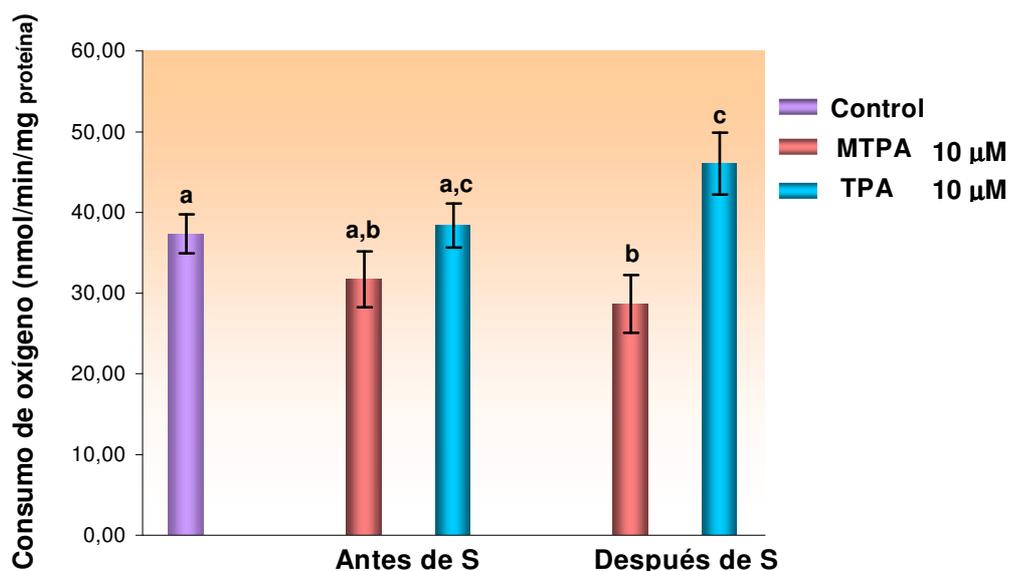


Figura 50. Efecto de MTPA y TPA sobre la velocidad del consumo de oxígeno iniciado por succinato -S- (estado 4), de mitocondrias de ratón. Los resultados mostrados representan el valor medio \pm SD de 3 experimentos. Las letras diferentes sobre las barras indican diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos ($p < 0.05$; ANOVA seguido del test de Tukey).

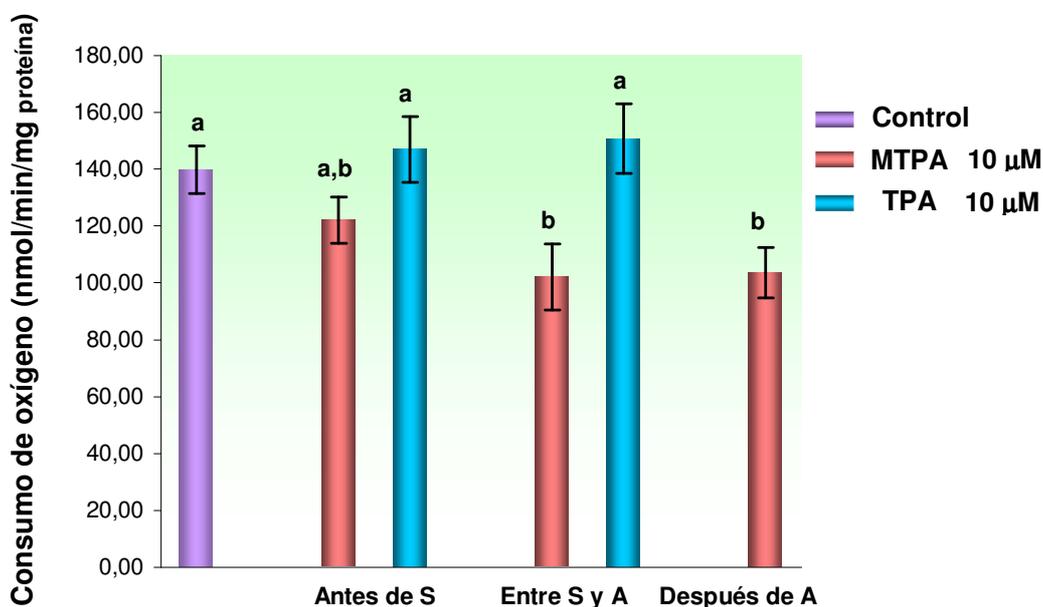


Figura 51. Efecto de MTPA y TPA sobre la velocidad del consumo de oxígeno iniciado por ADP -A- (estado 3), de mitocondrias de ratón. Los resultados mostrados representan el valor medio \pm SD de 3 experimentos. Las letras diferentes sobre las barras indican diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos ($p < 0.05$; ANOVA seguido del test de Tukey).

IV.12 Determinación del efecto de MTPA (TPA-Zn) y de TPA sobre el consumo de oxígeno de mitocondrias de hepatopáncreas de *H. americanus*.

Luego de comprobar que tanto MTPA (TPA-Zn) como TPA tenían efecto sobre el consumo de oxígeno de mitocondrias hepáticas de ratón, nos propusimos evaluar el efecto de estas proteínas sobre mitocondrias de hepatopáncreas de una especie cercana a la langosta *P. argus*, como es el bogavante o langosta americana *H. americanus*. En este caso, las mitocondrias se obtuvieron empleando medios hipertónicos con respecto a los utilizados para las mitocondrias hepáticas, que desarrollaron Tsokos y col. (1983) teniendo en cuenta que la hemolinfa de la langosta es casi isotónica con el agua de mar. El rendimiento obtenido fue de 1 a 1.5 mg/g de tejido.

La Figura 52 muestra la variación que produjeron MTPA y TPA (ambas a 10 μ M) sobre el consumo de oxígeno iniciado por succinato en las mitocondrias de hepatopáncreas. Como se observa en la Figura 52, MTPA inhibió considerablemente el consumo de oxígeno iniciado por succinato, independientemente del orden de adición de MTPA con respecto a este sustrato. Contrariamente, TPA estimuló el consumo de oxígeno en estas condiciones, de forma independientemente también al orden de adición de la apoproteína, aunque de forma no significativa.

El efecto de MTPA y TPA sobre el consumo de oxígeno iniciado por ADP (Fig. 53), tuvo un comportamiento similar al obtenido para el caso del succinato, siendo el efecto inhibitorio de MTPA más acentuado. En comparación con el efecto obtenido utilizando mitocondrias hepáticas, tanto el efecto de MTPA como el de TPA sobre mitocondrias de hepatopáncreas, fue mayor en ambos estados respiratorios.

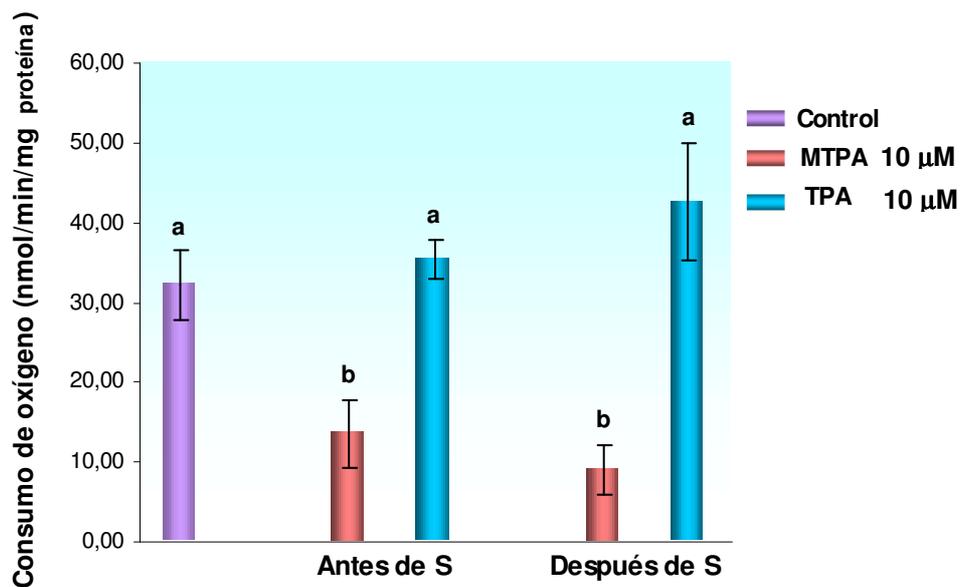


Figura 52. Efecto de MTPA y TPA sobre la velocidad del consumo de oxígeno iniciado por succinato -S- (estado 4), de mitocondrias de *H. americanus*. Los resultados mostrados representan el valor medio \pm SD de 3 experimentos. Las letras diferentes sobre las barras indican diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos ($p < 0.01$; ANOVA seguido del test de Tukey).

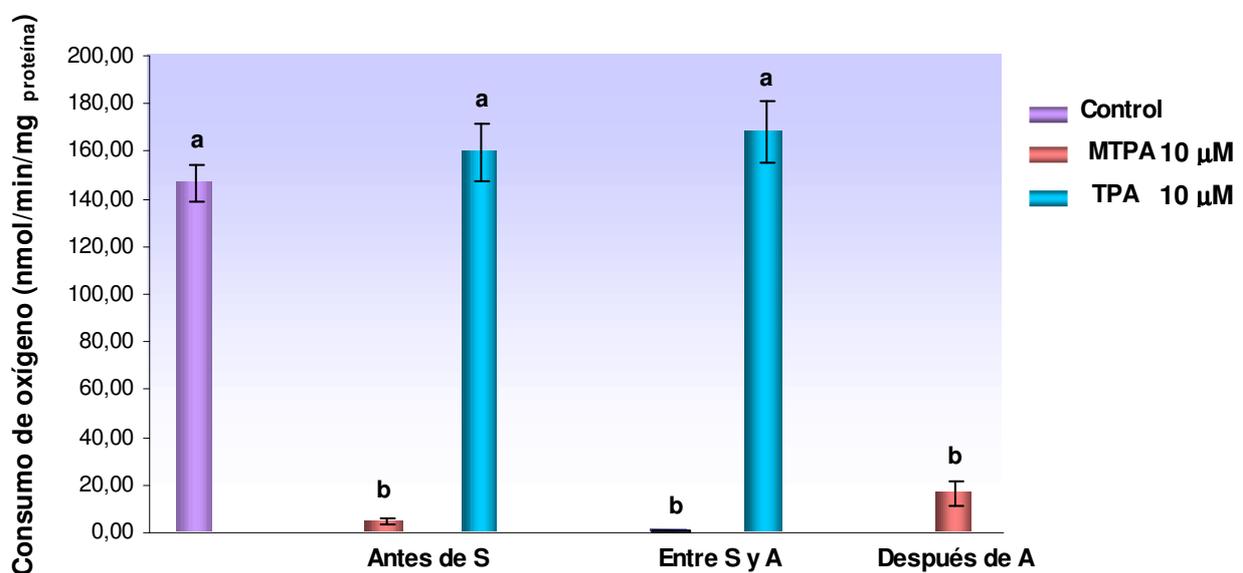


Figura 53. Efecto de MTPA y TPA sobre la velocidad del consumo de oxígeno iniciado por ADP -A- (estado 3), de mitocondrias de *H. americanus*. Los resultados mostrados representan el valor medio \pm SD de 3 experimentos. Las letras diferentes sobre las barras indican diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos ($p < 0.001$; ANOVA seguido del test de Tukey).

IV.13 Determinación del efecto de MTPA (TPA-Zn) y de TPA sobre la producción de ROS (H_2O_2) de mitocondrias aisladas a partir del hepatopáncreas de *H. americanus*.

Luego de ver que tanto MTPA (TPA-Zn) como TPA, a la concentración de $10 \mu M$, pueden modular el consumo de oxígeno de mitocondrias hepáticas de ratón y de mitocondrias aisladas a partir del hepatopáncreas del bogavante *H. americanus*, nos propusimos evaluar si a esta concentración podrían además modular la producción mitocondrial de ROS. Para ello determinamos el H_2O_2 producido por mitocondrias del hepatopáncreas de *H. americanus*, luego de ser estimuladas con succinato, en presencia o ausencia de MTPA, TPA o Zn^{2+} . El H_2O_2 intramitocondrial fue medido espectrofluorométricamente, usando la sonda diclorodihidrofluoresceína diacetato (H_2DCFDA), que al perder los grupos acetatos y ser oxidada por el H_2O_2 , se convierte en el producto fluorescente diclorodihidrofluoresceína (DCF).

Como se observa en la Figura 54, MTPA produjo un incremento de la velocidad de producción de DCF de un 35%, mientras que TPA produjo una disminución no significativa, en comparación con mitocondrias controles estimuladas con succinato. El efecto producido por el Zn^{2+} en su forma libre fue significativamente mayor que el producido por MTPA, llegando a aumentar la velocidad de producción de DCF en casi un 100%.

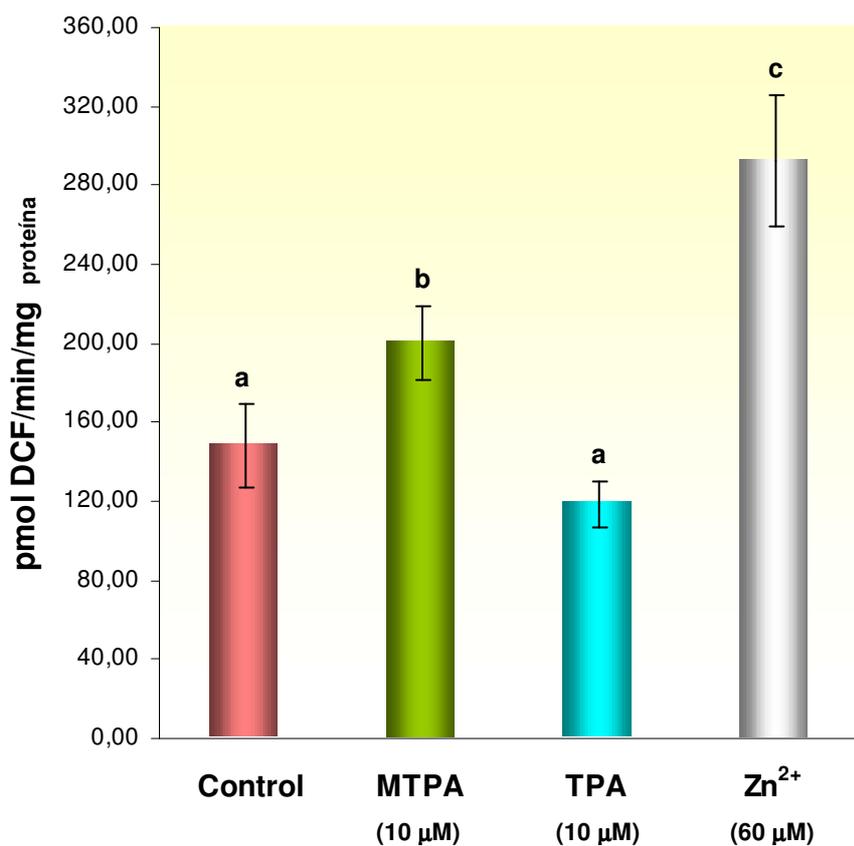


Figura 54. Efecto de MTPA, TPA y Zn²⁺ sobre la formación de H₂O₂, determinado mediante la aparición de diclorodihidrofluoresceína (DCF), en mitocondrias de *H. americanus*. Los resultados mostrados representan el valor medio \pm SD de 3-5 experimentos. Las letras diferentes sobre las barras indican diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos ($p < 0.05$; ANOVA seguido del test de Tukey).

V. DISCUSIÓN

V DISCUSIÓN.

Aunque las metalotioneínas se estudian desde hace ya casi 50 años, aún no se conocen con exactitud las funciones fisiológicas de esta gran familia de proteínas. Como se comentaba en el capítulo de Introducción, entre las múltiples funciones que se le han atribuido en mamíferos, además de su implicación en la detoxificación de cadmio, está su relación con el metabolismo energético y con la protección frente al estrés oxidativo. Sin embargo, en invertebrados existen sólo evidencias indirectas que relacionan a las metalotioneínas con la protección frente al estrés oxidativo (Viarengo y col., 1999) y al estrés por frío (English y Storey, 2003). Por esta razón, en el presente trabajo se clonó y caracterizó estructuralmente una nueva metalotioneína procedente de una especie de alto valor comercial, como es la langosta *Panulirus argus*, y se evaluó el efecto de esta proteína sobre la respiración y la producción de ROS mitocondrial, utilizando mitocondrias aisladas como modelo experimental. Además, se analizó la inducción del mRNA de esta proteína por cadmio en diferentes tejidos de la langosta, como evidencia indirecta de su papel en la detoxificación de este metal.

V.1 Caracterización del cDNA de la metalotioneína de *P. argus*.

El cDNA de la metalotioneína de *P. argus* se obtuvo mediante la combinación de las técnicas de RT-PCR y RACE. Al analizar la secuencia de este cDNA (Fig. 19) se observó que la composición nucleotídica de la región contigua al codón de iniciación ATG: CACC**ATGC**, cumple en ambas direcciones (5' y 3') con las reglas de Kozak (Kozak, 1989,1997) que describen las secuencias consensos del sitio de unión del ribosoma; lo cual nos indicó que realmente este es el codón de iniciación, y no otros codones ATG presentes en la secuencia. Esta secuencia además, coincide exactamente con la descrita en *H. americanus* (Valls y col., 2001).

La señal de poliadenilación (AATAAA) sigue los patrones consensos de eucariontes y se encuentra a 11 pb del sitio de poliadenilación al igual que en *H. americanus* (Valls y col., 2001). Resulta curioso que en *C. elegans* (Freedman y col., 1993), adyacente a la señal de poliadenilación, se encontró la secuencia ATTTA: una señal para la degradación rápida de algunos mRNA de mamíferos (Shaw y Kamen, 1986). Esta señal no ha sido encontrada en *P. argus* ni en el resto de las secuencias nucleotídicas de metalotioneínas descritas hasta el momento en los invertebrados y en los mamíferos.

V.2 Análisis de la secuencia aminoacídica de la metalotioneína de *P. argus*.

La secuencia aminoacídica deducida de MTPA (Fig. 19) presenta 59 aminoácidos, de los cuales 18 (aparecen como gris oscuro en la Figura 20) se conservan en todas las secuencias conocidas de las metalotioneínas de crustáceos, y si no se tiene en cuenta la MT-Cu de *C. sapidus*, el número de residuos conservados sería 26 (gris oscuro y gris claro) (Fig. 20). Tanto la histidina como los aminoácidos aromáticos están ausentes en la secuencia, lo que junto a la presencia de un alto número de cisteínas, es una característica de todas las metalotioneínas estudiadas hasta la fecha (Binz y Kägi, 1999). En el N-terminal de la secuencia de MTPA se observa además el patrón característico de las metalotioneínas de crustáceos: P-[G]-P-C-C-x(3)-C-x-C, al cual se hizo referencia en el apartado I.2.

A pesar de que la secuencia aminoacídica deducida a partir del cDNA resulte de 59 aminoácidos, el número real de residuos de MTPA podría variar, porque es muy probable que la metionina del N-terminal se pierda en el proceso post-traduccional, como ha sido demostrado en *H. americanus* (Brouwer y col., 1989). Por otra parte en las especies de cangrejos *A. astacus* (Pedersen y col., 1996), *C. maenas* (Pedersen y col., 1994) y *C. sapidus* (Brouwer y col., 1995) se han encontrado isoformas que se diferencian sólo en la metionina antes mencionada. En *C. maenas* se observó que al inducir la síntesis de metalotioneína con bajas concentraciones de cadmio (0.5 ppm), la única isoforma que se encuentra es la que carece de metionina en el N-terminal, lo cual podría indicar que altas concentraciones de cadmio inhiben el procesamiento enzimático del N-terminal o bien que la velocidad del procesamiento es insuficiente dado el incremento en la síntesis de metalotioneína producido por altas concentraciones del metal (Pedersen y col., 1994). De ser entonces 58, el número de residuos de MTPA coincidiría con el número que presentan la mayoría de las metalotioneínas de crustáceos no específicas de cobre.

La cisteína constituye el aminoácido más abundante de las metalotioneínas. En MTPA aparecen 19 residuos de cisteína, lo que representa el 32% del total de aminoácidos. Este número de cisteínas se corresponde con el hallado en las metalotioneínas de los siguientes crustáceos: *C. maenas* (Pedersen y col., 1994), *Eriocheir sinensis* (AY057396) y *Portunus pelagicus* (AY057395). El resto de las metalotioneínas de crustáceos presentan 18 residuos de cisteína, exceptuando la metalotioneína específica de cobre (MT-Cu) de *C. sapidus* (Syring y col., 2000) que tiene 21. El análisis de alineamiento múltiple de MTPA con todas las metalotioneínas de crustáceos conocidas hasta la fecha, mediante el programa *ClustalW* (Fig. 20) mostró que, de los 19 residuos de cisteína que aparecen en la MTPA, 14 se

conservan. Esta cifra asciende a 18 si no tenemos en cuenta la metalotioneína específica de cobre de *C. sapidus*. En *P. argus*, el residuo de cisteína que no comparte distribución con ninguna de las metalotioneínas alineadas se encuentra formando un triplete de cisteínas muy poco común, que en crustáceos sólo ha sido encontrado en la MT-Cu de *C. sapidus* (aparecen subrayados en la Figura 20); aunque como se comentará posteriormente en el apartado V.6.3, la existencia de éstos tripletes de cisteínas en las metalotioneínas no es un hecho exclusivo de los crustáceos.

La estructura tridimensional de las metalotioneínas de crustáceos con 18 cisteínas ha sido dilucidada en el cangrejo *C. sapidus* (metalotioneína-1) (Narula y col., 1995) y en el bogavante *H. americanus* (Zhu y col., 1994). La Figura 55 muestra un esquema de la disposición de los enlaces metal-tiolato propuesta por Zhu y col. (1994) para la metalotioneína de *H. americanus*, que es la misma disposición de enlaces del dominio β (N-terminal) de las metalotioneínas de mamíferos (Otvos y Armitage, 1980; Furey y col., 1986; Arseniev y col., 1988; Messerle y col., 1990; Robbins y col., 1991; Zangger y col. 1999). En estas estructuras 9 cisteínas enlazan 3 átomos de zinc mediante 6 enlaces tiolatos terminales y 3 puentes tiolatos. Hasta el momento, ésta ha sido la estructura establecida para todos los dominios de las metalotioneínas de crustáceos, suponiendo que todas estas proteínas estaban formadas por dominios β - β .

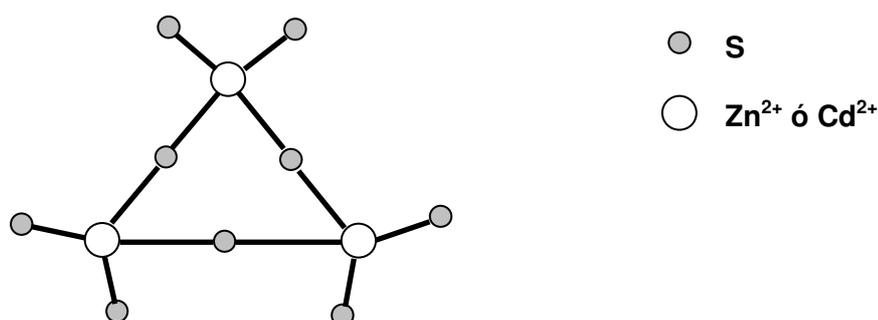


Figura 55. Esquema de la disposición de los enlaces metal-tiolato en los dominios β de las metalotioneínas de *H. americanus* y de mamíferos.

El hecho de que aparezca una décima cisteína en los dominios C-terminal de las metalotioneínas de *C. maenas* y de *P. argus* podría suponer la ruptura del patrón de estructura β - β establecido hasta el momento para estas proteínas en crustáceos, ya que cabe la posibilidad de que este nuevo dominio pueda unir un cuarto átomo de zinc

o cadmio mediante 4 enlaces tiolatos terminales y 6 puentes tiolatos. Es decir que podría pensarse, que las metalotioneínas de *C. maenas* y de *P. argus*, en total unieran 3 iones Zn^{2+} o Cd^{2+} en el dominio β del extremo N-terminal, y 4 iones Zn^{2+} o Cd^{2+} en el dominio del extremo C-terminal. Sin embargo, como se discutirá más adelante, hemos comprobado que la capacidad de unión de iones Zn^{2+} de MTPA es similar al resto de las metalotioneínas de crustáceos.

Analizando el alineamiento múltiple (Fig. 20), se observa además que 4 residuos de la secuencia de *P. argus* rompen el patrón de conservación de las metalotioneínas no específicas de cobre de crustáceos (residuos en negrita). Tres de estos residuos corresponden a treoninas, y de ellos, uno se encuentra formando un par Thr-Thr muy poco común en las metalotioneínas. En los crustáceos este par de residuos de Thr ha sido encontrado solamente en *C. maenas* (treoninas subrayadas). El cuarto residuo no conservado corresponde a la sustitución de una lisina por una serina en la posición 49. Asimismo, la región de conexión entre los dominios N-terminal y C-terminal presenta un aminoácido más con respecto al resto de las metalotioneínas de crustáceos, no-específicas de cobre (Fig. 20).

En la Figura 20 se observa que existe un número relativamente constante (6-10) de lisinas en las metalotioneínas de crustáceos encontradas hasta el momento, ubicadas en posiciones relativamente conservadas de la secuencia primaria (posiciones encerradas en recuadros). De esta forma, la sustitución de la lisina de la posición 49 se compensa con la sustitución de una treonina por una lisina en la posición 50. De igual forma se compensa la pérdida de la arginina de la posición 27 por la aparición de una lisina en la posición 24. Como se comentará más adelante en el apartado V.6.1, las lisinas presentes en las metalotioneínas parecen ser importantes en la internalización de estas proteínas a la mitocondria.

Como se observa en la Tabla 4, MTPA presenta una identidad de secuencia del 69.5% con la tioneína-Zn de *H. americanus*, mientras que con la tioneína-Cu de *C. sapidus* es solamente de un 38.1%, con lo cual es muy probable que MTPA sea una tioneína específica de Zn y Cd. Sin embargo, al no conocerse secuencias consenso, que dicten unión a Cu^+ , para poder confirmar que MTPA es una tioneína-Zn, habría que hacer ensayos de reemplazamiento de metales, o expresar la proteína en presencia de $CuSO_4$ en las mismas condiciones que en las que se expresó con $ZnCl_2$.

V.3 Análisis de la expresión del mRNA de MTPA en diferentes tejidos de *P. argus*.

La expresión específica de tejido de metalotioneínas con diferentes preferencias de unión a metal (Zn/Cd ó Cu) ha sido descrita en crustáceos y moluscos, y es un hecho estrechamente relacionado a las funciones fisiológicas que estas metalotioneínas desarrollan en cada tejido (Brouwer y col. 1995; Dallinger y col., 1997; Chabicoovsky y col., 2003). En *C. sapidus*, tanto la isoforma I como la II (isoformas específicas de Cd) (Brouwer y col., 1995) fueron encontradas en el hepatopáncreas, mientras que en las agallas solo se encontró la isoforma II. La expresión de ésta última sólo se induce por Zn y Cd a diferencia de la isoforma I que puede ser inducida además por Cu (Brouwer y col., 2002). En *Helix pomatia*, un molusco terrestre, la isoforma que se expresa en el hepatopáncreas una preferentemente Cd (Dallinger y col., 1993), mientras que la que se expresa en el manto una preferentemente Cu (Berger y col., 1997). A la primera se le atribuyó la función de detoxificación (Dallinger y col., 1997), mientras que a la segunda se le atribuyó la de homeostásis del Cu en conexión con la síntesis de hemocianina (Berger y col., 1997).

Sin embargo, a diferencia de como ocurre en mamíferos, en invertebrados no se ha descrito aún la presencia de una isoforma ubicua. Por esta razón, se analizó la cantidad relativa de mRNA de MTPA en diferentes tejidos de *P. argus* mediante el método de RT-PCR semicuantitativa.

Los resultados (Fig. 21) demostraron la expresión del mRNA de MTPA en todos los tejidos analizados de *P. argus*. Para comprobar que se trataba efectivamente de la misma isoforma y no de isoformas con tamaños similares y extremos N- y C-terminales semejantes (a los que pudieran unirse los cebadores), todos los fragmentos obtenidos fueron clonados y secuenciados. La secuencia obtenida en todos los casos fue la misma que la obtenida a partir del hepatopáncreas, por lo que no cabe dudas de que estamos en presencia de una misma isoforma que se expresa en todos estos tejidos. Por tanto, este es el primer caso de una metalotioneína ubicua descrito en invertebrados y es la primera vez que se comprueba la expresión de metalotioneína en músculo y tejido nervioso de crustáceos.

Como se observa en la Figura 21, la mayor expresión del mRNA de MTPA tiene lugar en el hepatopáncreas, lo cual concuerda con los estudios de Chavez-Crooker y col. (2003), a nivel de proteína, para la metalotioneína de *H. americanus*. Mediante ensayos inmunoenzimáticos estos autores demostraron que la concentración de metalotioneína del hepatopáncreas es de 5 a 10 veces mayor que en el resto de los

tejidos analizados (riñón, agallas, músculo y corazón); siendo el músculo y el corazón, los tejidos con menor concentración de metalotioneína.

V.4 Análisis de expresión del mRNA de MTPA en respuesta a cadmio en explantes de tejido de *P. argus*.

Una característica distintiva de la expresión de los genes de las metalotioneínas es que son inducibles por una amplia variedad de compuestos y condiciones de estrés, incluyendo citoquinas, hormonas glucocorticoides, especies reactivas de oxígeno e iones metálicos. Sin embargo, algunas isoformas son relativamente insensibles a estos inductores (Davis y Cousins, 2000; Vasak y Hassler, 2000). Teniendo en cuenta que los iones metálicos son los inductores más potentes, y que el cadmio es mejor inductor que otros iones metálicos (Swain y col., 2004), se decidió estudiar la regulación de la expresión de MTPA en explantes de diferentes tejidos de la langosta luego de una exposición a cadmio de 5 horas. En estas condiciones se produjo una inducción significativa en: hepatopáncreas, intestino y tejido nervioso. Estos resultados (Fig. 22) apoyan la idea de que en el hepatopáncreas, así como en los tejidos donde tuvo lugar la inducción de metalotioneína por cadmio, MTPA juega muy probablemente un papel importante en la detoxificación de cadmio y en general en la protección contra metales no esenciales. Esta función ha sido bien establecida en mamíferos usando ratones transgénicos que sobreexpresan el gen de la metalotioneína, así como en ratones con delecciones (*knock-outs*) de éste gen (Klaassen y col., 1999; Vasak y Hassler, 2000), y recientemente en el nematodo *C. elegans*, mediante experimentos de *knock-out* y/o silenciamiento del gen (*knock-down*) de la metalotioneína con iRNA (Swain y col., 2004).

Estudios previos han demostrado que la expresión de metalotioneína en diferentes tejidos de invertebrados es inducible por cadmio (Pedersen y col., 1998; Syring y col., 2000; Chabicoovsky y col., 2003). Sin embargo, la inducción de metalotioneína por cadmio en tejido nervioso de invertebrados no había sido descrita hasta el momento. Estos datos podrían servir como base para realizar estudios más detallados dirigidos a entender las múltiples funciones de estas proteínas y su evolución. De hecho, su carácter ubicuo y su alta inducibilidad por cadmio sugieren que MTPA podría llevar a cabo en el tejido nervioso de la langosta, funciones similares a las desempeñadas por MT-I/II en el cerebro de mamíferos.

En mamíferos, MT-1 y MT-2 son expresadas en la mayoría de los tejidos incluyendo el cerebro, mientras que MT-3 y MT-4 son expresadas fundamentalmente en el sistema nervioso central (CNS) y en el epitelio escamoso estratificado,

respectivamente (Vasak y Hasler, 2000; Davis y Cousins, 2000). Aunque a MT-1, MT-2 y MT-3 se le han atribuido papeles importantes en la regeneración y protección del CNS frente a diferentes daños, sus funciones precisas aún no se conocen (Palmiter, 1998; Hidalgo y col., 2001). Sin embargo, se supone que las funciones de MT-3 en el CNS difieren de las de sus contrapartes ubicuas, ya que la expresión de MT-1 y MT-2 es regulada por citoquinas, glucocorticoides y metales pesados, mientras que la de MT-3 es relativamente insensible a estos estímulos (Vasak y Hasler, 2000; Davis y Cousins, 2000; Palmiter, 1998; Hidalgo y col., 2001).

El análisis de los estímulos que podrían afectar la expresión de MTPA en el tejido nervioso de *P. argus*, podría ayudar a comprender el papel fisiológico de esta molécula en este tejido. Además sería interesante comprobar si existe una metalotioneína específica de tejido nervioso en este organismo, y si la expresión de las metalotioneínas de crustáceos descritas hasta el momento tiene lugar en otros tejidos, diferentes de aquellos a partir de los cuales han sido purificadas o clonadas.

La presencia de más de una isoforma en los cangrejos *Scylla serrata* (Lerch y col., 1982) y *C. sapidus* (Brouwer y col., 1995) hace suponer la existencia de más de una isoforma en las distintas especies de crustáceos. Es probable entonces que en cada especie puedan existir diferentes isoformas, con carácter específico o ubicuo en cuanto a su expresión, en relación con las distintas funciones a desarrollar en cada órgano o tejido.

V.5 Expresión por vía recombinante y purificación.

Generalmente la metalotioneína es expresada por vía recombinante en su forma unida a metal (forma holo). La desventaja fundamental de expresarla como forma apo, es que al ser la estructura más flexible, es un blanco fácil para las proteasas del hospedero y conllevaría una notable disminución del rendimiento de la proteína recombinante. Además, al ser más susceptible a la oxidación, se requieren condiciones fuertemente reductoras durante el proceso de purificación.

El sistema de expresión utilizado en la mayoría de los trabajos recogidos en la literatura, al igual que en el presente trabajo, es en forma de proteína de fusión con GST. Como ya se ha descrito en el capítulo de Materiales y Métodos, al emplear dicho sistema de expresión, la proteína recombinante se expresa con algunos aminoácidos de más en el extremo N-terminal. El número de aminoácidos adicionales depende de la enzima de restricción del extremo 5' empleada durante el clonaje. En nuestro caso, al emplear *BamHI* (Fig. 15), MTPA se expresó con dos aminoácidos adicionales en el

N-terminal (N-Gly-Ser). Esta modificación de la secuencia de MTPA podría suponer una alteración de la estructura y por tanto, de la función de la proteína. Sin embargo, ya ha sido demostrado que esta modificación no interfiere con las características de unión a metal de otras metalotioneínas (Xiong y Ru, 1997; Capdevila y col., 1997). Además, como se verá más adelante, en nuestro caso no se ha afectado la función, ya que la MTPA recombinante es capaz de entrar a la mitocondria y afectar la respiración y la producción de ROS mitocondrial.

El rendimiento final del proceso de obtención de MTPA recombinante fue de 0.33 ± 0.02 mg/L de cultivo de bacteria, lo cual se encuentra dentro del rango descrito para otras metalotioneínas de invertebrados, obtenidas mediante el mismo sistema de expresión. Al obtener MTN de *Drosophila* y MTH de *H. americanus*, en estas condiciones, Valls y col. (2000, 2001) obtuvieron rendimientos de 0.3 y 0.5 mg/L de cultivo de bacteria, respectivamente. No obstante, este rendimiento es mucho menor que el encontrado por Vergani y col. (2003) al expresar MT-A de *Oncorhynchus mykiss* (trucha arco iris) utilizando el plásmido de expresión pGEX-6P-1. La diferencia en rendimiento podría deberse al hecho de que la utilización del vector pGEX-6P-1 permite separar la proteína de interés de la GST, cortando con la proteasa PreScission. Esta proteasa, a diferencia de la trombina (proteasa utilizada en el caso de pGEX-4T-1), es activa a bajas temperaturas y requiere menos tiempo para digerir la proteína de fusión, con lo cual se protege la integridad de la proteína de interés. Sin embargo, la desventaja del sistema de expresión en pGEX-6P-1 es que resulta económicamente más caro.

Al finalizar el proceso de purificación se obtuvo una MTPA recombinante pura, como se comprobó mediante análisis de composición de aminoácidos (Tabla 7).

V.6 Caracterización estructural de MTPA

V.6.1 Determinación de la capacidad de unión de zinc de MTPA.

Con vistas a evaluar si la aparición de una décima cisteína en el dominio C-terminal de MTPA, efectivamente supone un aumento de capacidad de unión de metal como habíamos planteado en el apartado anterior, nos dispusimos a determinar la cantidad de Zn^{2+} unido por molécula de MTPA, obtenida por vía recombinante en presencia de $ZnCl_2$. La cantidad de Zn^{2+} presente en MTPA se determinó por ESI-MS (en modo directo o acoplado a HPLC-RP) y TXRF.

V.6.1.1 Análisis mediante ESI-MS.

El análisis mediante ESI-MS se realizó tanto en modo directo, como acoplado a HPLC-RP. Según se muestra en las Figs. 31, 32, 39 y 40, en HPLC-RP-ESI-MS el cromatograma tanto de la forma holo, como de la apo de MTPA, presenta un pico mayoritario con un “hombro” o pico minoritario. La diferencia de peso molecular entre estos picos fue de 6 y 3 D, en el caso de la forma holo y apo, respectivamente. Dicha diferencia es mucho menor que el peso de un átomo de zinc (65.38 D). Este hecho, unido al resultado del análisis aminoacídico, sugiere que los picos minoritarios no son contaminantes ni se diferencian en el número de iones Zn^{2+} enlazados, sino que son formas con diferente grado de protonación.

La estequiometría Zn:MTPA determinada por ESI-MS tanto en modo directo, como acoplada a HPLC-RP, sugiere que MTPA une 6 iones Zn^{2+} de forma específica (Tabla 8). Asimismo, de acuerdo a los espectros de masas obtenidos, no parecen existir otras formas de MTPA-Zn además de la forma MTPA- Zn_6 , al menos de forma abundante en solución. Estos resultados contrastan con los obtenidos por Valls y col. (2001), quienes detectaron por ESI-MS una mezcla de dos formas holo predominantes de MTH (la metalotioneína de *H. americanus*): una MTH- Zn_6 mayoritaria y una MTH- Zn_7 minoritaria, al obtenerla por vía recombinante a partir de un cultivo suplementado con $ZnCl_2$ 0.3 mM. Estos autores trataron la mezcla de holoformas con la resina Chelex-100, comprobando que el séptimo ión Zn^{2+} estaba débilmente enlazado al agregado MTH- Zn_6 .

Por otro lado, la masa molecular de MTPA determinada por espectrometría de masas, tanto en el modo directo (ESI-MS) como en HPLC-RP-ESI-MS, coincidió con la teóricamente calculada para una estequiometría de 6 iones Zn^{2+} por molécula de proteína, lo cual indica que durante el proceso de obtención y purificación de MTPA por vía recombinante, no se formaron puentes disulfuros en la molécula, a pesar de que en SDS-PAGE Tris-Gly se observó una masa molecular aparente de 12 kD. Este resultado indica que el peso molecular aparente observado en SDS-PAGE Tris-Gly es un artefacto de esta técnica y no del proceso de purificación.

Además de permitir el cálculo de la estequiometría de unión a Zn^{2+} , el análisis mediante ESI-MS permite evaluar la flexibilidad conformacional de ambas formas de MTPA: la forma holo y la forma apo.

Algunos estudios descritos en la literatura indican que la conformación de una proteína en solución influye sobre el estado de carga observado en los espectros de masas de electrospray (Loo y col., 1991; Yu y col., 1993). Se ha encontrado que la mayor abundancia de relaciones m/z altas (estados de carga bajos), se corresponde

con la proteína en su estado nativo, en forma globular; mientras que una mayor abundancia de estados de carga altos, es característico de una conformación más desnaturalizada y extendida, en la cual los grupos funcionales que aceptan protones están más accesibles.

En este sentido, nuestros resultados concuerdan con dichos estudios. Así, la forma holo en ambos tipos de espectrometrías de masas tiene cargas del estado de ionización menores (5+ en el pico mayoritario de HPLC-RP-ESI-MS y 4+ en ESI-MS) (Figs. 42 y 45) en comparación con las de la forma apo (7+ y 4+ en el pico mayoritario de HPLC-RP-ESI-MS y 6+ en ESI-MS) (Figs. 38 y 44), ya que ésta última, además de estar a pH ácido (que favorece la protonación), ha perdido la conformación nativa luego de perder el metal. Asimismo, el pico mayoritario de la forma holo en HPLC-RP-ESI-MS, presenta una carga del estado de ionización más abundante superior a la del pico de la forma holo en ESI-MS, ya que en HPLC-RP-ESI-MS, MTPA se inyectó en un gradiente de acetonitrilo, con lo cual la proteína estaba parcial o completamente desnaturalizada a pesar de no haber perdido los 6 iones Zn^{2+} .

En general, estos resultados corroboran la idea que existe acerca de que la apotioneína es una forma más desplegada en comparación con su forma unida a metal (Liu y col., 2003).

Por otro lado, una de las cuestiones estructurales que ha sido estudiada en las metalotioneínas es si todos los grupos tioles del "cluster" están desprotonados. En otras proteínas capaces de unir metales, la protonación de los grupos unidos a Zn^{2+} ha sido asociada con una disminución de su reactividad (Myers y col., 1995). Mediante estudios de espectrometría de masas se ha establecido que las formas MT-Cd y MT-Zn, reconstituidas a partir de la apoMT-2a de conejo, contienen dos grupos tiolatos desprotonados por cada ión bivalente unido (Yu y col., 1993; Fabris y col., 1996). La diferencia de sólo 1.48 D entre el valor de la masa molecular de MTPA determinada por HPLC-RP-ESI-MS (el promedio de la masa de los picos mayoritario y minoritario), con respecto a su valor teórico (determinada según la ecuación de Yu y col., 1993), concuerda con lo establecido por estos autores, indicando que en MTPA, al igual que en la MT-2a de conejo, existen dos grupos tioles desprotonados por cada ión Zn^{2+} enlazado, lo cual a su vez podría sugerir que ambas metalotioneínas poseen una reactividad similar.

V.6.1.2 Análisis mediante TXRF.

El análisis semicuantitativo de los elementos presentes en MTPA mediante TXRF, reveló la presencia de cantidades insignificantes de cobre (un ión por cada 9 moléculas de MTPA) (Tabla 9). Esto concuerda con los resultados obtenidos por Valls y col. (2001), quienes determinaron la ausencia de cobre en las holofomas de MTH, obtenidas a partir de cultivos suplementados con ZnCl_2 300 μM .

Por otro lado, al expresar MTH con CuSO_4 500 μM en el medio, la proteína presentó tanto cobre como zinc unidos a su estructura (Valls y col., 2001). De acuerdo a estos datos, y en conjunto con lo ya discutido en apartado V.2., la ausencia de cobre en MTPA podría ser otro indicio de que esta proteína sea una tioneína-Zn.

Como se observa en la Tabla 10, la estequiometría de Zn^{2+} unido a MTPA determinada por TXRF, resultó de 6.6 ± 1.6 iones Zn^{2+} por molécula de proteína, lo que contrasta con la estequiometría de 6 iones Zn^{2+} /MTPA determinada por ESI-MS tanto en modo directo, como acoplado a HPLC-RP. Sin embargo, como se observa en la Tabla 10, la incertidumbre en la determinación de la estequiometría por TXRF es muy alta en comparación con las de las ESI-MS.

Teniendo en cuenta todo lo anterior, concluimos que por cada molécula polipeptídica de MTPA se unen 6 iones Zn^{2+} , de forma similar a como ocurre en otras metalotioneínas de crustáceos. Sobre la base de estructuras terciarias ya dilucidadas en crustáceos, como son la metalotioneína-1 del cangrejo *C. sapidus* y de la metalotioneína de *H. americanus*, con las cuales MTPA presenta bastante homología (Tabla 4), sugerimos que los 6 iones Zn^{2+} están distribuidos en dos “clusters” de 3 Zn^{2+} cada uno: un “cluster” en el dominio C-terminal, y otro en el dominio N-terminal.

V.6.2 Análisis espectrofotométrico.

El espectro UV de la forma apo (Fig. 33) reveló que la contribución de la cadena polipeptídica a la absorción de la molécula es relativamente baja en comparación con la contribución que suponen los enlaces Zn-S de la forma holo. La ausencia de absorbancia alrededor de 250 nm para la forma apo concuerda con la ausencia de aminoácidos aromáticos en esta proteína.

El valor de absorción molar a 220 nm de la forma apo de MTPA ($\epsilon_{220} = 51\,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) resultó semejante a los valores determinados para la forma apo de cangrejo ($\epsilon_{220} = 50\,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (Overnell y col., 1988) y de mamíferos ($\epsilon_{220} = 48\,200 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (Buhler y Kagi, 1979).

V.6.3 Predicción de la estructura tridimensional del dominio C-terminal de MTPA.

A pesar de haber determinado la estequiometría 6:19 (Zn:S) por 3 técnicas diferentes, podría darse el caso de que un séptimo átomo de Zn^{2+} hubiera sido unido por MTPA a través de un enlace tetrahédrico formado por 3 S y un N u O (Overnell y col., 1988). Al ser este último un sitio de más baja afinidad en comparación con los tetrámeros compuestos por 4 S, el séptimo Zn^{2+} podría haberse perdido durante el proceso de filtración en gel, sin que hubiésemos podido cuantificarlo por ninguna de las técnicas de análisis empleadas.

Con el fin de predecir la distribución espacial de las cisteínas del dominio C-terminal de MTPA, para que nos permitiera esclarecer si efectivamente todas las cisteínas podrían formar enlaces tetrahédricos con el Zn^{2+} , o por el contrario una de ellas podría no formar parte del “cluster”, construimos un modelo preliminar de la estructura tridimensional del dominio C-terminal de MTPA, obtenido por homología con otras estructuras disponibles en las bases de datos.

Como se observa en la Figura 47, el modelo obtenido permitió definir que la cisteína intermedia del triplete de cisteínas se encuentra orientada hacia el exterior. Aunque no está ubicada en la zona de la hélice α , sino en una región irregular o de “loops” de mayor flexibilidad, es muy difícil desde el punto de vista energético que tres cadenas laterales de residuos contiguos se encuentren orientadas en la misma dirección (configuración *cis*), ya que la configuración del enlace peptídico que suele estar más favorecida es la forma *trans* (a excepción de cuando esta involucrada una prolina). De hecho en las estructuras **1dmc** (*C. sapidus*) y **1j5l** (*H. americanus*) esta posición está ocupada por una lisina, la cual también está orientada en configuración *trans*. Por tanto, asumiendo la estructura mostrada en la Figura 47, es muy probable que esta cisteína no esté involucrada en un tetrámero de coordinación de Zn^{2+} , ya que su S se encontraría a una distancia de 7.5 y 7.09 Å (Fig. 48A) de los S de las cisteínas más cercanas en la estructura (cisteínas contiguas), mientras que la distancia media entre los S de las cisteínas que podrían formar tetrámeros en este modelo es de 4.12 ± 0.35 Å. A pesar de que la cadena lateral de esta cisteína podría rotar alrededor del eje formado por el enlace C-C, acercándose hacia el interior de la molécula como se observa en la Figura 48B, no obstante, el S seguiría quedando hacia el exterior y muy lejos (6.98 y 5.02 Å respectivamente) del resto de las cisteínas, como para que pueda unir Zn en coordinación con alguna de las otras cisteínas.

Por tanto, este modelo preliminar de la estructura tridimensional de MTPA confirma los resultados obtenidos en cuanto a la estequiometría de unión Zn:MTPA. Es decir, que MTPA une 6 iones Zn por molécula.

La existencia de tripletes de Cys en las metalotioneínas no es exclusivo de crustáceos; tales repeticiones han sido encontradas en las especies de protistas *Tetrahymena pigmentosa* y *Tetrahymena pyriformis*, con un total de 4 motivos Cys-Cys-Cys en las isoformas inducidas por cadmio (Piccinni y col., 1994). Sin embargo en la isoforma inducida por cobre, encontrada posteriormente en *T. pigmentosa* (Santovito y col., 2001), no se encontraron dichos tripletes.

La MT-1b humana también presenta un triplete de cisteínas (Heguy y col., 1986). Esta isoforma de humanos presenta una cisteína extra (12 en lugar de 11) en el dominio α (C-terminal) de la proteína, ubicada en un triplete de cisteínas. Asimismo, en la lombriz de tierra *Eisenia foetida*, se ha encontrado una metalotioneína compuesta por un único dominio, que presenta al igual que el dominio α de la MT-1b humana, 12 cisteínas, de las cuales 3 forman un triplete (Gruber y col., 2000). Mediante espectrometría de masas se determinó que esta metalotioneína de *E. foetida*, inducida por cadmio, une 4 iones Cd^{2+} al igual que el dominio C-terminal de las metalotioneínas de mamíferos compuesto por 11 Cys. Con lo cual se dedujo, que la configuración espacial del “cluster” Cd-S de la metalotioneína de *E. foetida* debe ser similar al del dominio α (C-terminal) de las metalotioneínas de mamíferos y por tanto una de las 12 cisteínas no participa en la unión de cadmio. Gruber y col. (2000) sugirieron que la cisteína no implicada en la unión de cadmio podría ser la cisteína extra del triplete comentado, ya que en las metalotioneínas de otras lombrices de tierra, en esa posición de la secuencia aminoacídica, aparece una alanina en lugar de una cisteína. Por esta razón propusieron que la aparición de la cisteína adicional en la metalotioneína de *E. foetida* podría ser el resultado de un evento de mutación tardío.

La aparición de un residuo de cisteína extra en el dominio C-terminal de MTPA, que no parece tener un papel en el aumento de la capacidad de unión de zinc por dicho dominio, se asemeja en gran medida a los resultados encontrados por Gruber y col. (2000). Sólo queda como interrogante si efectivamente su aparición se debe a un evento de mutación tardío sin importancia o por el contrario podría tener alguna implicación para la función de éstas proteínas.

En la metalotioneína de levadura no todas las cisteínas intervienen en la formación del cluster. Esta metalotioneína tiene 53 aminoácidos, y de ellos 12 son cisteínas. De los 53 aminoácidos, sólo los 40 del extremo N-terminal forman parte del cluster, en el cual 10 cisteínas unen Cu. Sobre el resto de residuos del extremo C-terminal (13 aminoácidos, de los cuales 2 son cisteínas) se ha sugerido que podrían servir para iniciar interacciones proteína-proteína (Peterson y col., 1996). La cisteína extra de MTPA, podría estar involucrada en la unión intermolecular de monómeros de

la proteína, a través de puentes disulfuros o puentes S-Me²⁺-S. Cabe señalar que ésta cisteína está ubicada en el dominio C-terminal, que es el dominio implicado en la dimerización oxidativa de la metalotioneína de mamíferos, a través de puentes disulfuros intermoleculares entre las cisteínas de este dominio (Zangger y col., 2001b). Lamentablemente, la importancia funcional de este tipo de dimerizaciones de las metalotioneínas no se conoce.

Sin embargo, en el caso de MTPA, la cisteína “extra” no parece haber favorecido la formación de puentes S-S intermoleculares, y por tanto la oligomerización de la proteína, ya que en SDS-PAGE Tris-Gly se observó una banda de aproximadamente 12 kD, como suele observarse con las metalotioneínas de mamíferos (McCormick y Lin, 1991). Incluso la banda de MTPA resultó ser de menor peso molecular que la observada por Valls y col. (2001) para la metalotioneína de *H. americanus*, con lo cual la incógnita de la importancia (si es que la hay) de la aparición de la décima cisteína queda por ser aclarada.

V.7 Estudio de la función de MTPA en la mitocondria.

V.7.1 Determinación del efecto de MTPA (TPA-Zn) y de su forma apo (TPA) sobre el consumo de oxígeno de mitocondrias de hígado de ratón y del hepatopáncreas de la langosta *H. americanus*.

Como se comentó en el capítulo de Introducción, desde 1967 se conoce que el Zn²⁺ puede inhibir la respiración mitocondrial a concentraciones micromolares (Skulachev y col., 1967). Aunque este ión es capaz de inhibir los 4 complejos de la cadena respiratoria (Skulachev y col., 1967), parece ser que el Complejo III (complejo bc₁) es el sitio primario de su acción (Lorusso y col., 1991; Link y von Jagow, 1995).

Sin embargo, en condiciones fisiológicas el zinc libre en el citosol está disponible solamente en el orden nano - picomolar (Simons, 1991; Atar y col., 1995), por lo cual no se le ha dado mucha importancia al significado fisiológico de la capacidad del zinc de inhibir la respiración mitocondrial. En este sentido, nuestros resultados (Figs. 50-53) demuestran que MTPA-Zn₆ inhibe la respiración mitocondrial a concentraciones fisiológicas (Shaikh, 1991) en el orden micromolar. Esto, unido al hecho de que la MT se trasloca hasta el espacio intermembrana de mitocondrias hepáticas (Ye y col., 2001), y que *in vitro* es capaz de transferir el zinc a otras proteínas en función de las condiciones redox (Maret y Vallee, 1998), señala el posible mecanismo mediante el cual el zinc pueda ejercer sus ya mencionados efectos en la mitocondria. Es muy poco probable que el efecto inhibitorio de la metalotioneína sobre la respiración mitocondrial se deba a la liberación de los iones Zn²⁺ a la solución, ya

que de acuerdo a la constante aparente de afinidad de la MT-2 de conejo por el Zn^{2+} , la concentración de este ion que podría existir de forma libre en equilibrio con la metalotioneína sería aproximadamente 10^{-11} M (Romero-Isart y Vasak, 2002), y se ha visto que 10^{-8} M de $ZnCl_2$ no tiene efectos sobre la respiración (Simpkins y col., 1994).

Por otra parte, nuestros resultados sobre el efecto de la metalotioneína de *P. argus* (MTPA) sobre la respiración de mitocondrias hepatopancreáticas de un crustáceo tan cercano a esta especie, como es el caso del bogavante *H. americanus*, constituyen el primer estudio que se realiza sobre este tema en invertebrados y están en concordancia con lo descrito en la literatura para mamíferos (Simpkins y col., 1994; Simpkins y col., 1998; Ye y col., 2001). De esta forma, el efecto inhibitorio (89%) que provocó MTPA- Zn_6 sobre el consumo de oxígeno de mitocondrias de hepatopáncreas, al añadirla después del ADP, fue similar al encontrado por Ye y col. (2001) en mitocondrias de ratas, al añadir MT-2- Zn_7 de hígado de conejo a la misma concentración (10 μ M), luego del ADP (inhibición de un 80%). Ambos efectos fueron más acentuados que los ejercidos por la MT-1- Zn_7 de hígado de conejo, que a esa concentración inhibió la respiración solamente un 30% (Ye y col., 2001). En contraste, Simpkins y col. (1998) observaron una inhibición mucho menor de la respiración mitocondrial estimulada por ADP, en presencia de las mismas metalotioneínas empleadas por Ye y col. (2001). La diferencia entre ambos ensayos consistió en que Simpkins y col. (1998) usaron directamente la metalotioneína comercial obtenida de Sigma, la cual esta compuesta en su mayoría por MT- Cd_7 (Chassaingne y Lobinski, 1998), y como se ha visto *in vitro*, el Cd^{2+} inhibe al citocromo bc_1 alrededor de 100 veces menos que el Zn^{2+} (Link y von Jagow, 1995).

Sin embargo, la forma apo de MTPA tuvo un efecto contrario al de la forma holo, ya que como se observa en la Figura 53, estimuló el consumo de oxígeno alrededor de un 15%, al añadirla antes del ADP. Esta estimulación resultó menor que la encontrada por Ye y col. (2001), que al añadir apo-MT1 de conejo a concentraciones de 2 y 4 μ M (también antes del ADP), a mitocondrias de hígado de rata, obtuvieron un 20 y un 40% de estimulación, respectivamente.

Es importante destacar, que el Zn puede disminuir la velocidad de consumo de oxígeno de mitocondrias estimuladas con ADP, no sólo por su capacidad de inhibir la cadena de respiración, sino también porque puede causar hinchamiento mitocondrial (Cash y col., 1968), lo cual ha sido asociado con la apertura del poro de transición de la permeabilidad mitocondrial, la pérdida del potencial de membrana, y el desacoplamiento de la fosforilación oxidativa del transporte de electrones mitocondrial (Zoratti y Szabo, 1995). En este sentido, se ha demostrado que la presencia de Mg^{2+}

en el tampón de respiración mitocondrial, a concentraciones iguales o superiores a 1 mM, previene el hinchamiento mitocondrial inducido por zinc durante 20 minutos de incubación (Wudarczyk y col., 1999). Teniendo en cuenta esto, incluimos Mg^{2+} en dicho tampón a una concentración de 3.3 mM en el ensayo con mitocondrias hepatopancreáticas, y de 5 mM, en el ensayo con mitocondrias hepáticas. Además, la incubación más larga con MTPA (añadiéndola antes del succinato) no sobrepasó los 12 minutos. Por tanto, la disminución del consumo de oxígeno mitocondrial que provoca MTPA-Zn, parece deberse a un efecto inhibitorio sobre el transporte de electrones y no a cambios en la integridad de las mitocondrias, ya que de haber ocurrido desacoplamiento deberíamos haber visto un aumento del consumo de oxígeno en la respiración de mitocondrias estimuladas solamente con succinato.

El efecto observado de MTPA sobre la velocidad de la respiración, en conjunción con los trabajos ya mencionados de Simpkins y col. (1998), y Ye y col. (2001), sugiere una relación de las metalotioneínas con el metabolismo energético. Existen además otros trabajos que hacen pensar en dicha relación. Por ejemplo, los ratones MT $-/-$ presentan niveles más bajos de lactato en sangre e hígado, en comparación con ratones normales, luego de una inflamación inducida por endotoxina (Rofe y col., 1996), sugiriendo una alteración en el proceso de la glicólisis. Al mismo tiempo, la activación de la glicólisis por Zn en cultivos primarios de hepatocitos provenientes de estos ratones, es menor comparada con la activación que provoca el Zn sobre la glicólisis de cultivos de hepatocitos de ratones normales (Rofe y col., 2000). Además, como se comentó en el capítulo de Introducción, los ratones MT $-/-$ han mostrado una obesidad moderada y tienen altos niveles de leptina (el producto del gen obeso) en sangre (Beattie y col., 1998). En el tejido adiposo marrón (tejido productor de calor) de ratas se ha encontrado una considerable expresión inducida por frío de MT-1 (Beattie y col., 1996). En invertebrados también se ha visto que el frío es un factor que induce considerablemente la expresión de metalotioneína (English y Storey, 2003). Todos estos datos apuntan hacia la existencia de un vínculo, tanto en vertebrados como en invertebrados, entre las metalotioneínas y el metabolismo energético.

La cuestión que no queda clara es cómo la metalotioneína podría atravesar la membrana mitocondrial externa de preparaciones de hígado y de hepatopáncreas. En general la membrana mitocondrial externa de diferentes tejidos y organismos, tiene canales selectivos de aniones dependientes de voltaje (VDAC), a través de los cuales pueden pasar moléculas de hasta 6-8 kD, basado en la permeabilidad a PEG y dextranos (Xu y col., 1999; Zalman y col., 1980). Sin embargo, este límite podría estar

sobreestimado debido a la flexibilidad de estas moléculas. Además, no se conocen proteínas, sino sólo metabolitos como piruvato, succinato, citrato, NADH, fosfato, entre otros, que puedan atravesar la membrana mitocondrial externa a través de estos canales (Colombini, 2004).

Muy pocas proteínas mitocondriales (13 en humanos y 8 en *S. cerevisiae*) son codificadas y sintetizadas por la mitocondria (Gordon y col., 2000; Lithgow, 2000). La mayoría de las proteínas (cientos) que componen este organelo, son codificadas por el genoma nuclear y son sintetizadas en el citosol por los ribosomas, generalmente como precursores que contienen una presecuencia o secuencia señal en el N-terminal, que garantiza su importación a la mitocondria (Endo y Kohda, 2002). El transporte a través de la membrana mitocondrial externa y de la membrana mitocondrial interna es mediado por los complejos de las translocasas TOM y TIM, respectivamente. Sin embargo, alrededor de un 30% de las proteínas importadas a este organelo, carecen de la presecuencia en el N-terminal. En particular, todas las de la membrana mitocondrial externa y algunas de las proteínas del espacio intermembrana y de la membrana mitocondrial interna (Diekert y col., 1999). Estas otras proteínas poseen generalmente múltiples secuencias señales internas, que habitualmente coinciden con los segmentos transmembrana hidrofóbicos, que determinan la topología de estas proteínas en la membrana. No obstante, aún no se conoce en detalle cómo podrían entrar muchas de las proteínas del espacio intermembrana, que carecen de presecuencia N-terminal y aparentemente también de secuencias señales internas. Por ejemplo, el apocitocromo *c* (Diekert y col., 2001), la SOD1, la “chaperona” de cobre para la SOD o también conocida como CCS (Sturtz y col., 2001), y la proteína Cox17, implicada en el suministro de Cu a la citocromo *c* oxidasa durante el ensamblaje de esta última dentro de la mitocondria (Maxfield y col., 2004).

El apocitocromo *c*, al igual que otras proteínas periféricas de la cara externa de la membrana mitocondrial interna, como las citocromo *c* hemo liasas (Diekert y col., 1999), utiliza el complejo TOM para atravesar la membrana mitocondrial externa (Diekert y col., 2001). Sin embargo, a diferencia de éstas últimas, aún no se han determinado las secuencias señales internas del apocitocromo *c*. Lo que sí se conoce, es que los aminoácidos básicos (sobre todo las lisinas que son las más abundantes en la secuencia) son importantes en la interacción del apocitocromo con las cargas negativas de los fosfolípidos de la cara externa de la membrana mitocondrial externa, y que el proceso de translocación es irreversible por la transferencia del grupo hemo a la apoforma a partir de la citocromo *c* hemo liasa (CCHL) (Diekert y col., 2001).

En el caso de la CCHL de *Neurospora crassa*, la secuencia señal interna de importación al espacio intermembrana de la mitocondria es una parte de la secuencia (de los 60 aminoácidos que tiene en total) probablemente involucrada además en la unión del grupo hemo. Esta secuencia es altamente hidrofílica debido a que presenta aproximadamente un 30% de aminoácidos cargados tanto positiva como negativamente (Diekert y col., 1999).

En MTPA el 25% de sus residuos son aminoácidos cargados, teniendo el mismo número de Lys en posiciones conservadas que el resto de las metalotioneínas, incluidas las de mamíferos (Fig. 20 y Tabla 1). En este sentido, Ye y col. (2001) demostraron que la modificación química por carbamilación de los residuos de lisina conservados en la MT-1 de rata, disminuyó el efecto inhibitorio producido por esta proteína sobre la respiración mitocondrial. Dicha carbamilación no afecta la capacidad de unión de Zn^{2+} por la MT (Zeng, 1991), con lo cual lo que se debe afectar es el paso de la proteína a través de la membrana. De ahí que Ye y col. (2001) propusieron que la MT podría entrar a la mitocondria hepática a través de un mecanismo basado en una interacción crítica entre los residuos de Lys con los fosfolípidos de membrana mitocondrial externa, y la retención en el espacio intermembrana mitocondrial, podría deberse a la unión de ATP (Jiang y col., 1998; Ye y col., 2001). Por tanto, este mecanismo también podría cumplirse en el caso de MTPA.

Por otro lado, la CCHL puede atravesar la membrana mitocondrial externa, manteniendo su plegamiento (Steiner y col., 1995). En el caso de MTPA, el hecho de que el efecto de la forma apo sobre la velocidad de la respiración mitocondrial, sea totalmente opuesto al efecto que provoca la forma holo, indica que para entrar a la mitocondria, la forma holo no pierde los iones Zn^{2+} , y en consecuencia, atraviesa de alguna forma la membrana mitocondrial externa sin perder su conformación nativa. Si esto no fuera así, y la forma holo entrara como forma apo, la primera ejercería un efecto más retardado (luego de perder los iones Zn^{2+} de alguna forma) y similar al que ejerce la forma apo sobre la respiración, lo cual no concuerda con nuestros resultados.

Por tanto, nuestros resultados indican que MTPA entra a la mitocondria hepatopancreática en su forma unida a metal, y es altamente probable que, al igual que en mamíferos (Ye y col., 2001), los aminoácidos cargados de MTPA juegan un papel importante en este proceso. El mecanismo o transportador a través del cual se produce la traslocación y retención de MTPA en mitocondrias hepatopancreáticas queda aún por descubrir. Además, el hecho que MTPA sea capaz de inhibir la respiración de mitocondrias provenientes tanto de hígado de mamíferos, como de hepatopáncreas de crustáceos, indica que el mecanismo de importación a la

mitocondria hepática, y el de inhibición de la cadena de transporte de electrones, se han conservado durante la evolución.

Es curioso que el Zn^{2+} inhiba la respiración de mitocondrias obtenidas a partir de diferentes tejidos (hígado, corazón próstata, etc.), mientras que la metalotioneína se encuentra de forma constitutiva solamente en el espacio intermembrana de mitocondrias de hígado (Ye y col., 2001; Costello y col., 2004). Además, la adición de MT-2-Zn₇ de conejo inhibe la respiración de mitocondrias hepáticas pero no la de otros tejidos (Ye y col., 2001). La ausencia de metalotioneína en las mitocondrias de otros tejidos diferentes al hígado, indica que su presencia en la mitocondria hepática, no es un simple resultado del equilibrio con la metalotioneína citosólica (Ye y col., 2001), sino que se debe a la posible existencia de factores específicos en el hígado, y como hemos visto en este trabajo, en el hepatopáncreas, que condicionan esta localización subcelular de la metalotioneína. Si fuera sólo consecuencia de un equilibrio, entonces debería haberse detectado metalotioneína en mitocondrias de corazón de ratones transgénicos, donde la concentración de metalotioneína en este órgano, resultó más alta que la encontrada en el hígado (Zhou y Kang, 2000), y sin embargo no se detectó en dicho organelo. Los futuros estudios estructurales y bioquímicos sobre los distintos componentes del complejo TOM en mitocondrias de diferentes tejidos (actualmente los que mejor se conocen son los de *S. cerevisiae* y *N. crassa*) ayudarán a esclarecer si efectivamente la metalotioneína (y otras proteínas del espacio intermembrana que aparentemente carecen de secuencias señales) entra a través de este complejo, permitiendo establecer un posible mecanismo de su importación a la mitocondria.

Es relevante el hecho de haber observado por primera vez que la metalotioneína puede entrar a mitocondrias provenientes del hepatopáncreas de crustáceos e influir sobre la velocidad de la respiración, ya que existe muy poca información acerca del metabolismo mitocondrial de éstos animales, y el hepatopáncreas es un órgano muy importante involucrado en diversas funciones. El hepatopáncreas es el responsable de la síntesis y secreción de enzimas digestivas y la subsecuente captación de nutrientes, pero además está implicado en la excreción, el ciclo de la muda, el almacenamiento de reservas inorgánicas y el metabolismo de los lípidos y los carbohidratos (Gibson y Barker, 1979). Por tanto, nuestro trabajo puede servir de punto de referencia para futuros estudios que intenten relacionar los cambios metabólicos que sufren los crustáceos durante su desarrollo y reproducción, con elementos reguladores del metabolismo aerobio.

V.7.2 Determinación del efecto de MTPA y de TPA sobre la producción de ROS (H_2O_2) de mitocondrias aisladas a partir del hepatopáncreas de *H. americanus*.

Con el desarrollo de la fotosíntesis por los antecesores de las actuales cianobacterias, hace alrededor de 3.5 billones de años, apareció el oxígeno en la atmósfera y por tanto se hizo posible el surgimiento de la respiración aerobia (Popov, 2003). Sin embargo, como se comentó en el capítulo de Introducción, no todo el oxígeno consumido por los organismos aerobios es reducido a agua por el complejo citocromo oxidasa en la última reacción de la cadena de respiración mitocondrial. Mientras que para la reducción completa de una molécula de oxígeno a agua, se necesitan 4 electrones, la mayoría de los componentes de la cadena transportadora de electrones mitocondrial transfieren uno o dos electrones. Por tanto, alguno de los transportadores reaccionan directamente con el oxígeno molecular (del 1 al 2% del oxígeno total consumido; Boveris y Chance, 1973) formando el anión superóxido (O_2^-), que luego puede ser convertido a peróxido de hidrógeno (H_2O_2), y éste a su vez, ser reducido parcialmente a radical hidroxilo (OH^\cdot) (Turrens, 2003).

La contribución relativa de cada sitio de la cadena de transporte de electrones, a la producción global de O_2^- varía en dependencia de la velocidad de dicho transporte. Cuando la velocidad de la respiración mitocondrial es baja, los componentes de la cadena están altamente reducidos, y por tanto, las concentraciones de O_2^- del estado estacionario fisiológico se incrementan (Boveris y col., 1972). La formación de O_2^- podría además ser incrementada en presencia de inhibidores de la cadena respiratoria mitocondrial, como por ejemplo la rotenona, que inhibe al Complejo I, o la antimicina A, que inhibe al Complejo III. La inducción de la producción de ROS mitocondrial, por los inhibidores de la cadena de transporte de electrones, ha sido atribuido a la capacidad de éstos de aumentar el estado reducido de los intermediarios, antes del sitio de bloqueo, que constituyen los donantes primarios de electrones en la generación de O_2^- mitocondrial (ROS primario) (Turrens, 2003).

Los estudios antes mencionados han sido desarrollados sobre todo en vertebrados, y específicamente, en mamíferos. Sin embargo, en invertebrados, se conoce muy poco acerca de la formación de las ROS, y en invertebrados marinos, no se conoce prácticamente nada acerca de la generación de estos radicales libres por parte de las mitocondrias (Abele y col., 2002). Teniendo en cuenta esto, nos propusimos analizar la cantidad de H_2O_2 generada (a través de la cuantificación de DCF) por las mitocondrias hepatopancreáticas, incubadas en presencia o ausencia de

MTPA-Zn₆ y su forma apo, con vistas a contrastar el efecto inhibitorio que produjo MTPA-Zn₆ sobre el consumo de oxígeno mitocondrial, con el efecto que provocaría sobre la producción de ROS.

De acuerdo a nuestros resultados, la adición de MTPA-Zn₆ a las mitocondrias procedentes del hepatopáncreas de *H. americanus*, no sólo inhibe el consumo de oxígeno (Figs. 52 y 53), sino que también aumenta en un 25% la velocidad de producción de ROS del estado 4 de la respiración mitocondrial (Fig. 54). Este resultado corrobora lo discutido anteriormente de que MTPA actúa inhibiendo la velocidad de la cadena de transporte de electrones y no desacoplándola de la síntesis de ATP, ya que los desacopladores suprimen la formación de ROS del estado 4 de la respiración mitocondrial (Korshunov y col., 1997).

Como habíamos comentado en el capítulo de Introducción, está bien establecido que el Zn²⁺ puede estimular la producción mitocondrial de ROS (Sensi y col., 1999). La explicación convencional para este efecto, es que se debe al bloqueo que este ion produce en el transporte de electrones mitocondrial, a nivel del Complejo III, donde se han localizado dos sitios de unión para el Zn²⁺ en la estructura en cristal del citocromo *bc₁* (Berry y col., 2000).

El Complejo III cataliza la transferencia de electrones desde el ubiquinol al citocromo *c*, a través de un mecanismo conocido como ciclo Q, que permite bombear protones de la matriz al espacio intermembrana de la mitocondria (Fig. 56) (Mitchell, 1975; Trumpower, 1990; Hunte y col., 2003). El mecanismo consiste en dos sitios separados de unión de quinonas, uno para la oxidación de ubiquinol (sitio Q_o) y el otro para la reducción de ubiquinona (sitio Q_i), y un flujo de electrones bifurcado en el sitio Q_o. En este punto (Q_o), el primer electrón proveniente del ubiquinol es transferido secuencialmente a la ISP y luego al citocromo *c*₁, mientras que el segundo electrón es transferido a los grupos hemo *b_L* y *b_H*, consecutivamente, rindiendo un anión ubisemiquinona (en la primera “vuelta” del ciclo) o ubiquinol (en la segunda “vuelta” del ciclo) en el sitio Q_i. De esta forma, el resultado neto es que por cada dos moléculas de ubiquinol oxidadas en el sitio Q_o, se liberan cuatro H⁺ al espacio intermembrana (lado P o positivo), mientras que en el sitio Q_i se reduce una molécula de ubiquinona a ubiquinol y se consumen dos H⁺ de la matriz mitocondrial (lado N o negativo) (Trumpower, 1990).

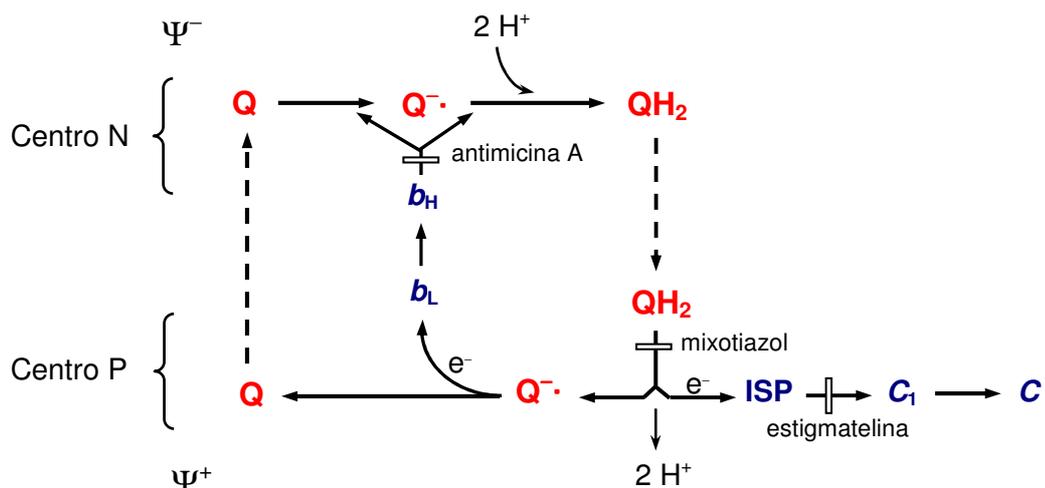


Figura 56. Mecanismo de transferencia de electrones en el ciclo Q del Complejo III. Las flechas discontinuas representan el movimiento del ubiquinol o la ubiquinona entre los sitios N (Q_i) y P (Q_o). Con barras blancas se señalan los sitios donde actúan los inhibidores antimicina A, mixotiazol y estigmatelina.

Específicamente, el Zn²⁺ bloquea el canal a través del cual el ubiquinol alcanza el sitio Q_o (Berry y col., 2000), lo cual provoca un aumento del estado de reducción del “pool” de ubisemiquinol (CoQH•) y la prolongación de su tiempo de vida media, favoreciendo la transferencia de electrones al O₂ (Skulachev, 1998). La autooxidación de CoQH• inicia reacciones en cadena, produciéndose aniones superóxido, que luego son convertidos a H₂O₂ por la acción de la SOD2 (Turrens, 2003).

En este sentido, la entrada de la metalotioneína al espacio intermembrana de la mitocondria podría facilitar el acceso del Zn²⁺ al canal del sitio Q_o, transfiriéndolo directamente mediante un mecanismo de oxido-reducción (Maret y Vallee, 1998). De esta forma, es lógico que la adición de MTPA-Zn₆ haya estimulado la velocidad de la producción de H₂O₂.

Por otro lado, la forma apo provocó una disminución de la velocidad de la producción de H₂O₂ de alrededor de un 20% (Fig. 53), que no fue estadísticamente significativa. Esto podría deberse a que el incremento (32.5%) (Fig. 52) que provocó la forma apo sobre el consumo de oxígeno de mitocondrias de hepatopáncreas en el estado 4, quizás no haya sido suficiente para generar cambios en la producción de ROS, en comparación con el efecto acentuado que provocó MTPA sobre la velocidad de la respiración (71.9% de inhibición) (Fig. 52).

Al añadir la misma cantidad de Zn^{2+} libre, equivalente a la unida por MTPA, el efecto sobre la velocidad de la producción de H_2O_2 fue aproximadamente 4 veces mayor que el provocado por MTPA- Zn_6 . Teniendo en cuenta este resultado, podría decirse que la metalotioneína tiene un efecto protector sobre la producción de ROS, ya que al unir Zn^{2+} evita que éste genere los niveles más altos de ROS, que podría provocar si estuviera en su forma libre.

La diferencia entre el efecto que provoca el Zn^{2+} en su forma libre con respecto a su forma enlazada a MTPA, podría deberse a la especificidad de su acción. Al ser transferido por la metalotioneína en el espacio intermembrana, su liberación es más específica, uniéndose fundamentalmente al Complejo III, y quizás también al citocromo c, quedando retenido la mayor parte del Zn^{2+} en este compartimento sin entrar a la matriz mitocondrial. Sin embargo, al ser suministrado de forma libre, además de unirse a las proteínas antes mencionadas, inhibiendo la velocidad del transporte de electrones, podría atravesar de alguna forma tanto la membrana externa como la interna, llegando hasta la matriz mitocondrial, donde podría inhibir enzimas claves en la defensa contra el estrés oxidativo, como la tiorredoxina reductasa mitocondrial (Rigobello y col., 1998), entre otras.

La tiorredoxina reductasa es una selenoproteína que como su nombre indica, reduce a la tiorredoxina, que a su vez es el donante de hidrógeno de un número importante de enzimas, entre las cuales se encuentran las tiorredoxinas peroxidases (peroxirredoxinas) (Arner y Holmgren, 2000). Esta última interviene en la reducción del peróxido de hidrógeno a agua en el interior de la mitocondria (Kowaltowski y col., 2001). Por tanto, la inhibición de la tiorredoxina reductasa podría incrementar en gran medida los niveles de H_2O_2 de la matriz mitocondrial (Fig. 57), los cuales a su vez podrían inactivar a la peroxirredoxina por oxidación irreversible, conduciendo a la apoptosis (Wood y col., 2003).

Por otro lado, el hecho de que MTPA- Zn_6 haya incrementado la producción de H_2O_2 en lugar de disminuirla, corrobora la idea de que esta proteína entra solamente hasta el espacio intermembrana, ya que de haber entrado hasta la matriz mitocondrial hubiera podido reaccionar directamente con el H_2O_2 de este compartimento (que es el único que detecta la sonda empleada), oxidándose hasta el estado de oxidación de disulfuro (Quesada y col., 1996).

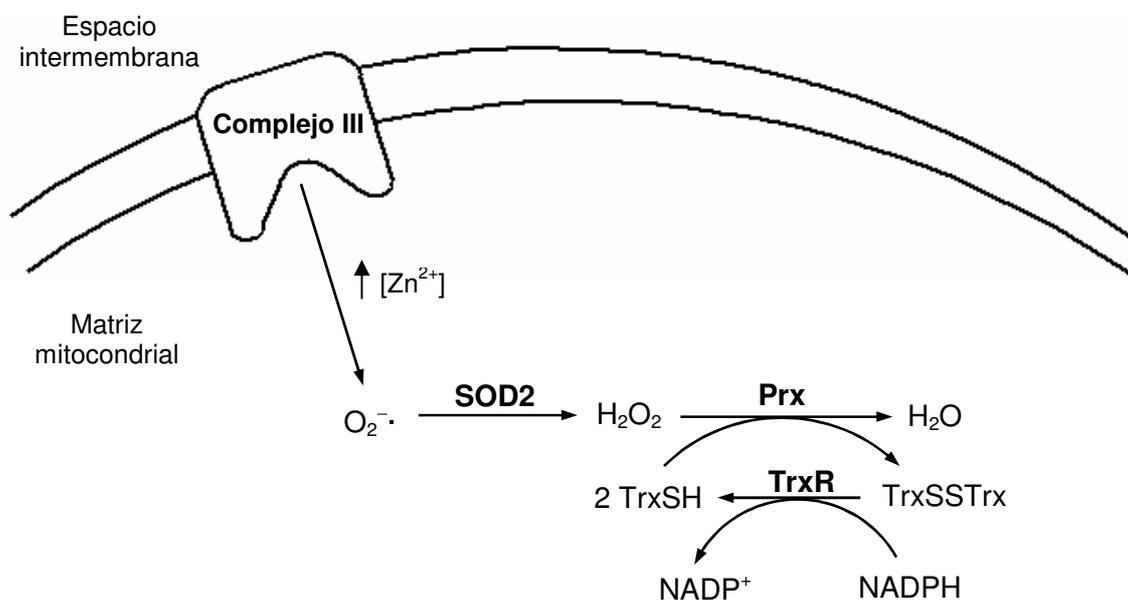


Figura 57. Eliminación del H_2O_2 mitocondrial a través del sistema de tiorredoxina. La inhibición del Complejo III por el Zn^{2+} , provoca un aumento en la cantidad de $\text{O}_2^{\cdot-}$ generado por este complejo. Estos radicales libres son eliminados por la superóxido dismutasa dependiente de Mn^{2+} (SOD2), convirtiéndolos en H_2O_2 . El H_2O_2 es reducido a agua por la peroxirredoxina (Prx). La tiorredoxina (TrxSH) oxidada por la Prx es regenerada por la tiorredoxina reductasa (TrxR), que usa NADPH como donante de electrones.

Los resultados obtenidos concuerdan con otros trabajos que hacen referencia al papel protector de la metalotioneína frente al estrés oxidativo, tanto en mamíferos como en invertebrados. Lazo y col. (1995) observaron que células troncales embrionarias carentes de los genes MT-1 y MT-2 son altamente sensibles a agentes generadores de radicales libres tales como: t-butilo hidroperóxido, t-butilo hidroquinona y paraquat. Sin embargo, la sobreexpresión de MT-1 en estas células, las hizo resistentes a los agentes mencionados (Pitt y col., 1997). Asimismo, la sobreexpresión de MT-2a humana en células de corazón de ratón disminuyó la citotoxicidad causada por especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno, y atenuó marcadamente la oxidación de moléculas reporteras como diclorofluoresceína y ácido cis-parinámico, mientras que por el contrario, en células derivadas de ratones deficientes de los genes MT-1 y MT-2, se observó un incremento de la oxidación intracelular (Lazo y col., 1998). Además, se ha demostrado que la metalotioneína tiene un efecto protector contra la

acción citotóxica del NO (Schwarz y col., 1995; Theocharis y col., 2003). Por ejemplo la incubación con MT-3, previene la neurotoxicidad provocada por NO en cultivos primarios de neuronas (Montoliu y col., 2000).

En invertebrados, el papel antioxidante de la metalotioneína ha sido demostrado extensamente en el mejillón *Mytilus galloprovincialis* (Viarengo y col., 1999), aunque existen otros trabajos que hacen referencia al posible papel protector de estas proteínas frente al estrés oxidativo, luego de una exposición a metales (Geret y col., 2002; Romero-Ruiz y col., 2003; Geracitano y col., 2004). La inducción de metalotioneína en *M. galloprovincialis*, como consecuencia de una pre-exposición a Cd^{2+} , abolió el incremento en la producción de ROS inducido por un tratamiento con Fe^{3+} en extractos de la glándula digestiva, y por un tratamiento con H_2O_2 en células aisladas de la misma glándula. Además, los animales pre-tratados con Cd^{2+} presentaron un porcentaje de supervivencia mayor frente a un estrés oxidativo generado por Fe^{3+} . La resistencia dependiente de Cd^{2+} frente al estrés oxidativo se asoció sólo al incremento de los niveles de metalotioneína, ya que otros sistemas de defensa anti-oxidantes (glutación reducido, catalasa, superóxido dismutasa y glutación peroxidasa) no sufrieron cambios (Viarengo y col., 1999).

En resumen, hemos aislado a partir del hepatopáncreas de *P. argus*, un nuevo cDNA de metalotioneína, que se expresa en diferentes tejidos de esta langosta y codifica para una proteína (MTPA) de 59 aminoácidos (teniendo en cuenta la Met del N-terminal). Al realizar el análisis de alineamiento múltiple de la secuencia aminoacídica deducida, se observa que MTPA presenta homología con todas las Cd/Zn metalotioneínas de crustáceos descritas hasta la fecha, y en menor grado con la isoforma específica de cobre de *C. sapidus*.

MTPA presenta 10 cisteínas en el dominio C-terminal, lo cual podría suponer un aumento de la capacidad de unión de metal con respecto al resto de las metalotioneínas de crustáceos que presentan 9 cisteínas en el dominio C-terminal. Sin embargo, al expresar y obtener MTPA por vía recombinante, hemos comprobado que la estequiometría de unión de Zn^{2+} de esta proteína es de 6 iones por molécula, al igual que la de otras metalotioneínas de crustáceos que presentan 18 cisteínas (9 en cada dominio). La predicción de la estructura tridimensional del dominio C-terminal de MTPA, indica que es muy probable que la cisteína extra no este implicada en la unión de Zn^{2+} a través de enlaces tetraédricos S- Zn^{2+} , lo cual corrobora la estequiometría determinada mediante las diferentes técnicas de análisis empleadas.

Por otro lado, hemos comprobado que tanto la forma holo, como la forma apo de MTPA, pueden afectar tanto la velocidad de la cadena de transporte de electrones como la producción de ROS, a través del control de los niveles intramitocondriales de Zn^{2+} . MTPA- Zn^{2+}_6 inhibe la velocidad de la cadena de transporte de electrones, aumentando como consecuencia los niveles intramitocondriales de ROS, debido, muy probablemente, a que entra hasta el espacio intermembrana y transfiere el zinc directamente a determinadas proteínas de la cadena de transporte electrónico mitocondrial. A pesar de esto, se puede decir que MTPA ejerce un efecto protector contra el estrés oxidativo, ya que la estimulación de la producción de ROS por esta proteína, es mucho menor en comparación con la provocada por cantidades equivalentes de Zn^{2+} libre. Posiblemente, esta función de MTPA podría deberse a que promueve la reclusión del Zn^{2+} en el espacio intermembrana, disminuyendo el flujo de este ión hacia la matriz mitocondrial, donde los efectos del Zn^{2+} pueden ser más tóxicos. El hecho de que MTPA afecta al consumo de oxígeno de mitocondrial constituye el primer estudio que se realiza sobre este tema en invertebrados y concuerda con otros resultados descritos en la literatura para mamíferos, que sugieren una relación de las metalotioneínas con el metabolismo energético. De hecho, la metalotioneína sólo puede entrar a mitocondrias de tejidos claves en el metabolismo energético, como son el hígado en mamíferos, y el hepatopáncreas en invertebrados. Sin embargo, existen interrogantes que aún quedan por resolver: si efectivamente existe dicha relación, ¿cómo es posible que los ratones *knock-out* de genes de las metalotioneínas 1 y 2 sean fenotípicamente normales? ¿Podría existir en mamíferos, un sistema paralelo de “emergencia” que compensa la carencia de metalotioneína? Estamos seguros que dentro de muy pocos años ya existirán respuestas para estas incógnitas. Por el momento, parafraseando las palabras de Isaac Newton a las cuales hacíamos referencia al principio de este manuscrito, nos conformamos con haber explorado y analizado unas pocas gotas de agua del inmenso océano que aún queda por descubrir.

VI. CONCLUSIONES

VI CONCLUSIONES

1. A partir del hepatopáncreas de *P. argus* hemos obtenido la secuencia completa de un cDNA que codifica para una proteína (MTPA) de 59 aminoácidos. MTPA presenta homología con todas las metalotioneínas de crustáceos, pero tiene 19 cisteínas (9 en el dominio N-terminal y 10 en el dominio C-terminal), a diferencia de la mayoría de las metalotioneínas de este grupo de animales que presentan 18 cisteínas (9 + 9).
2. El gen que codifica para MTPA se expresa de forma ubicua en todos los tejidos analizados de la langosta, observándose los mayores niveles de expresión en el hepatopáncreas. Por primera vez en crustáceos se observa la expresión de una metalotioneína no sólo en tejidos digestivos, sino también en músculo y tejido nervioso. El carácter ubicuo de MTPA, así como la elevada inducibilidad de su expresión por cadmio en el tejido nervioso, sugiere que esta proteína podría desempeñar en este tejido de la langosta funciones similares a las ejercidas por MT-I/II en el cerebro de mamíferos.
3. La estequiometría de Zn^{2+} unido a MTPA es de 6 iones por molécula, al igual que la del resto de metalotioneínas de crustáceos que presentan 18 cisteínas. La predicción de la estructura tridimensional del dominio C-terminal de MTPA, indica que es muy probable que la cisteína extra presente en este dominio, no esté implicada en la unión de Zn^{2+} .
4. MTPA (TPA-Zn) disminuye el consumo de oxígeno mitocondrial no sólo en el hígado, sino también en el hepatopáncreas, mientras que su forma apo (TPA) tiene un efecto contrario. Parece ser que MTPA entra con el zinc unido probablemente hasta el espacio intermembrana de la mitocondria y actúa como inhibidor de la cadena de transporte electrónico, y no como desacoplante mitocondrial.
5. En concordancia con la inhibición que produce sobre la velocidad de la cadena de transporte mitocondrial, MTPA (TPA-Zn) estimula la producción de ROS de mitocondrias hepatopancreáticas. Sin embargo, se puede decir que MTPA ejerce un efecto protector contra el estrés oxidativo porque la estimulación que produce es mucho menor en comparación con la provocada por cantidades equivalentes de Zn^{2+} libre. El efecto protector podría deberse a que MTPA promueve la reclusión

del Zn^{2+} en el espacio intermembrana, disminuyendo el flujo de este ión hacia la matriz mitocondrial, donde los efectos del Zn^{2+} pueden ser más tóxicos.

VII. BIBLIOGRAFÍA

VII BIBLIOGRAFÍA

- Abdel-Mageed A.B., Agrawal K.C. (1997). *Antisense down-regulation of metallothionein induces growth arrest and apoptosis in human breast carcinoma cells*. *Cancer Gene Ther.* 4:199-207.
- Abdel-Mageed A.B., Agrawal K.C. (1998). *Activation of nuclear factor κ B: potential role in metallothionein-mediated mitogenic response*. *Cancer Res.* 58:2335-2338.
- Abele D., Heise K., Portner H.O., Puntarulo S. (2002). *Temperature-dependence of mitochondrial function and production of reactive oxygen species in the intertidal mud clam *Mya arenaria**. *J. Exp. Biol.* 205:1831-41.
- Adlard P.A., West A.K., Vickers J.C. (1998). *Increased density of metallothionein I/II-immunopositive cortical glial cells in the early stages of Alzheimer's disease*. *Neurobiol. Dis.* 5:349-56.
- Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W., Lipman DJ. (1990). *Basic local alignment search tool*. *J. Mol. Biol.* 215:403-10.
- Ameisen J.C., Capron A. (1991). *Cell dysfunction and depletion in AIDS: the programmed cell death hypothesis*. *Immunol. Today.* 12:102-5.
- Andrews G.K. (2000). *Regulation of metallothionein gene expression by oxidative stress and metal ions*. *Biochem. Pharmacol.* 59:95-104.
- Appel R.D., Bairoch A., Hochstrasser D.F. (1994). *A new generation of information retrieval tools for biologists: the example of the ExPASy WWW server*. *Trends Biochem. Sci.* 19:258-60.
- Arai T., Ikemoto T., Hokura A., Terada Y., Kunito T., Tanabe S., Nakai I. (2004). *Chemical forms of mercury and cadmium accumulated in marine mammals and seabirds as determined by XAFS analysis*. *Environ. Sci. Technol.* 38:6468-74.
- Aravindakumar C.T., Ceulemans J., De Ley M. (1999). *Nitric oxide induces Zn²⁺ release from metallothionein by destroying zinc-sulphur clusters without concomitant formation of S-nitrosothiol*. *Biochem. J.* 344:253-8.
- Arner E.S., Holmgren A. (2000). *Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase*. *Eur. J. Biochem.* 267:6102-9.
- Arseniev A., Schultze P., Worgotter E., Braun W., Wagner G., Vasak M., Kagi J.H., Wuthrich K. (1988). *Three-dimensional structure of rabbit liver [Cd7]metallothionein-2a in aqueous solution determined by nuclear magnetic resonance*. *J. Mol. Biol.* 201:637-57.
- Atar D., Backx P.H., Appel M.M., Gao W.D., Marban E. (1995). *Excitation-transcription coupling mediated by zinc influx through voltage-dependent calcium channels*. *J. Biol. Chem.* 270:2473-7.
- Barja G. (1999). *Mitochondrial oxygen radical generation and leak: sites of production in states 4 and 3, organ specificity, and relation to aging and longevity*. *J. Bioenerg. Biomembr.* 31:347-66.

- Barja G., Herrero A. (1998). *Localization at complex I and mechanism of the higher free radical production of brain nonsynaptic mitochondria in the short-lived rat than in the longevous pigeon*. J. Bioenerg. Biomembr. 30:235-43.
- Beattie J.H., Black D.J., Wood A.M., Trayhurn P. (1996). *Cold-induced expression of the metallothionein-1 gene in brown adipose tissue of rats*. Am. J. Physiol. 270:R971-77.
- Beattie J.H., Wood A.M., Duncan G.J. (1999). *Rat metallothionein-2 contains N(alpha)-acetylated and unacetylated isoforms*. Electrophoresis. 20:1613-8.
- Beattie J.H., Wood A.M., Newman A.M., Bremner I., Choo K.H., Michalska A.E., Duncan J.S., Trayhurn P. (1998). *Obesity and hyperleptinemia in metallothionein (-I and -II) null mice*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:358-363.
- Berg J.M., Shi Y. (1996). *The galvanization of biology: a growing appreciation for the roles of zinc*. Science. 271:1081-1085.
- Berger B., Dallinger R., Gehrig P., Hunziker P.E. (1997). *Primary structure of a copper-binding metallothionein from mantle tissue of the terrestrial gastropod Helix pomatia L.* Biochem. J. 328:219-224.
- Berry E. A., Zhang Z., Bellamy H. D., Huang L. (2000). *Crystallographic location of two Zn(2+)-binding sites in the avian cytochrome bc(1) complex*. Biochim. Biophys. Acta. 1459:440-8.
- Binz P.A., Kägi J.H. (1999). *Metallothionein: molecular evolution and classification*. (In) Metallothionein IV, Klaassen C. (Ed.), pp7-13, Birkhauser Verlag, Basel.
- Blindauer C.A., Harrison M.D., Parkinson J.A., Robinson A.K., Cavet J.S., Robinson N.J., Sadler P.J. (2001). *A metallothionein containing a zinc finger within a four-metal cluster protects a bacterium from zinc toxicity*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 98:9593-8.
- Boldrin F., Santovito G., Negrisolo E., Piccinni E. (2003). *Cloning and sequencing of four new metallothionein genes from Tetrahymena thermophila and T. pigmentosa: evolutionary relationships in Tetrahymena MT family*. Protist. 154:431-42.
- Boveris A., Chance B. (1973). *The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen*. Biochem. J. 134:707-16.
- Boveris A., Oshino N., Chance B. (1972). *The cellular production of hydrogen peroxide*. Biochem J. 128:617-30.
- Bradford M.M. (1976). *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal. Biochem. 72:248-54.
- Bremner I., Mehra R.K. (1991). *Assay of extracellular metallothionein*. Methods Enzymol. 205:60-70.
- Brierley G.P., Settlemire C.T., Knight V.A. (1968). *Ion transport by heart mitochondria. XI. The spontaneous and induced permeability of heart mitochondria to cations*. Arch. Biochem. Biophys. 126:276-88.
- Briggs R.W., Armitage I.M. (1982). *Evidence for site-selective metal binding in calf liver metallothionein*. J. Biol. Chem. 257:1259-62.

- Brouwer M., Brouwer T.H. (1998). *Biochemical defense mechanisms against copper-induced oxidative damage in the blue crab, Callinectes sapidus*. Arch. Biochem. Biophys. 351:257-64.
- Brouwer M., Brouwer T.H., Grater W., Enghild J.J., Thogersen I.B. (1997). *The paradigm that all oxygen-respiring eukaryotes have cytosolic CuZn-superoxide dismutase and that Mn-superoxide dismutase is localized to the mitochondria does not apply to a large group of marine arthropods*. Biochemistry. 36:13381-8.
- Brouwer M., Enghild J., Hoexum-Brouwer T., Thogersen I., Truncali A. (1995). *Primary structure and tissue-specific expression of blue crab (Callinectes sapidus) metallothionein isoforms*. Biochem. J. 311: 617-622.
- Brouwer M., Syring R., Hoexum-Brouwer T. (2002). *Role of a copper-specific metallothionein of the blue crab, Callinectes sapidus, in copper metabolism associated with degradation and synthesis of hemocyanin*. J. Inorg. Biochem. 88:228-239.
- Brouwer M., Winge D.R., Gray W.R. (1989). *Structural and functional diversity of copper-metallothioneins from the American lobster Homarus americanus*. J. Inorg. Biochem. 35:289-303.
- Brown N.S., Bicknell R. (2001). *Hypoxia and oxidative stress in breast cancer. Oxidative stress: its effects on the growth, metastatic potential and response to therapy of breast cancer*. Breast Cancer Res. 3:323-7.
- Bruinsma J.J., Jirakulaporn T., Muslin A.J., Kornfeld K. (2002). *Zinc ions and cation diffusion facilitator proteins regulate Ras-mediated signaling*. Dev. Cell. 2:567-78.
- Buhler R.H., Kagi J.H. (1979). *Spectroscopic properties of zinc-metallothionein*. Experientia Suppl. 34:211-20.
- Burdette S.C., Lippard S.J. (2003). *Meeting of the minds: metalloneurochemistry*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 100:3605-10.
- Cancre I., Van-Wormhoudt A., LeGal Y. (1995). *Effects of cellular growth factors on crustacean hepatopancreas cell suspensions*. J. Mar. Biotechnol. 2:83-87.
- Capdevila M., Cols N., Romero-Isart N., Gonzalez-Duarte R., Atrian S., Gonzalez-Duarte P. (1997). *Recombinant synthesis of mouse Zn3-beta and Zn4-alpha metallothionein 1 domains and characterization of their cadmium(II) binding capacity*. Cell. Mol. Life Sci. 53:681-8.
- Carocci F. (2000). *Global fishery resources distribution of Panulirus argus [Carib. spiny lobster]*. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). Marine Resources Service (FIRM).
- Cash W.D., Aanning H.L., Carlson H.E., Cox S.W., Ekong E.A. (1968). *Role of Zn(II) in the mitochondrial swelling action of insulin*. Arch. Biochem. Biophys. 128:456-9.
- Cismowski M.J., Huang P.C. (1991a). *Effect of cysteine replacements at positions 13 and 50 on metallothionein structure*. Biochemistry 30:6626-32.

- Cismowski M.J., Narula S.S., Armitage I.M., Chernaik M.L., Huang P.C. (1991b). *Mutation of invariant cysteines of mammalian metallothionein alters metal binding capacity, cadmium resistance, and ^{113}Cd NMR spectrum*. J. Biol. Chem. 266:24390-7.
- Cody C.W., Huang P.C. (1994). *Replacement of all alpha-domain lysines with glutamates reduces metallothionein detoxification function*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 202:954-9.
- Cohen J.J., Duke R.C. (1984). *Glucocorticoid activation of a calcium-dependent endonuclease in thymocyte nuclei leads to cell death*. J. Immunol. 132:38-42.
- Coleman J. E. (1974). *The role of Zn(II) in transcription by T7 RNA polymerase*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 60:641-8.
- Coleman J.E. (1992). *Zinc proteins: enzymes, storage proteins, transcription factors, and replication proteins*. Annu. Rev. Biochem. 61:897-946.
- Colombini M. (2004). *VDAC: the channel at the interface between mitochondria and the cytosol*. Mol. Cell. Biochem. 256/257:107-15.
- Costello L.C., Guan Z., Franklin R.B., Feng P. (2004). *Metallothionein can function as a chaperone for zinc uptake transport into prostate and liver mitochondria*. J. Inorg. Biochem. 98:664-6.
- Csermely P., Sandor P., Radics L., Somogyi J. (1989). *Zinc forms complexes with higher kinetic stability than calcium, 5-F-BAPTA as a good example*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 165:838-844.
- Chabicovsky M., Niederstatter H., Thaler R., Hodl E., Parson W., Rossmann W., Dallinger R. (2003). *Localization and quantification of Cd- and Cu-specific metallothionein isoform mRNA in cells and organs of the terrestrial gastropod Helix pomatia*. Toxicol. Appl. Pharmacol. 190:25-36.
- Chance B., Sies H., Boveris A. (1979). *Hydroperoxide metabolism in mammalian organs*. Physiol. Rev. 59:527-605.
- Chassaing H., Lobinski R. (1998). *Polymorphism and identification of metallothionein isoforms by reversed-phase HPLC with on-line ion-spray mass spectrometric detection*. Anal. Chem. 70:2536-43.
- Chavez-Crooker P., Pozo P., Castro H., Dice M.S., Boutet I., Tanguy A., Moraga D., Ahearn G.A. (2003). *Cellular localization of calcium, heavy metals, and metallothionein in lobster (Homarus americanus) hepatopancreas*. Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol. 136:213-24.
- Chen M.L., Failla M.L. (1989). *Degradation of zinc-metallothionein in monolayer cultures of rat hepatocytes*. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 191:130-8.
- Chen P., Muñoz A., Nettesheim D., Shaw C.F. 3rd, Petering D.H. (1996). *Stoichiometry and cluster specificity of copper binding to metallothionein: homogeneous metal clusters*. Biochem. J. 317:395-402.
- Chen Y., Maret W. (2001). *Catalytic selenols couple the redox cycles of metallothionein and glutathione*. Eur. J. Biochem. 268:3346-53.

- Chen X., Zhang B., Harmon P.M., Schaffner W., Peterson D.O., Giedroc D.P. (2004). *A novel cysteine cluster in human metal-responsive transcription factor 1 is required for heavy metal-induced transcriptional activation in vivo*. J. Biol. Chem. 279:4515-22.
- Cherian M.G., Apostolova M.D. (2000). *Nuclear localization of metallothionein during cell proliferation and differentiation*. Cell Mol. Biol. 46:347-356.
- Cherian M.G., Jayasurya A., Bay B.H. (2003). *Metallothioneins in human tumors and potential roles in carcinogenesis*. Mutat. Res. 533:201-9.
- Chimienti F., Aouffen M., Favier A., Seve M. (2003). *Zinc homeostasis-regulating proteins: new drug targets for triggering cell fate*. Curr. Drug Targets. 4:323-38.
- Chimienti F., Seve M., Richard S., Mathieu J., Favier A. (2001). *Role of cellular zinc in programmed cell death: temporal relationship between zinc depletion, activation of caspases and cleavage of Sp family transcription factors*. Biochem. Pharmacol. 62:51-62.
- Cho Y., Gorina S., Jeffrey P. D., Pavletich N. P. (1994). *Crystal structure of a p53 tumor suppressor-DNA complex: understanding tumorigenic mutations*. Science. 265:346-55.
- Chomczynski P., Sacchi N. (1987). *Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction*. Anal. Biochem. 162:156-159.
- Chung R.S., Adlard P.A., Dittmann J., Vickers J.C., Chuah M.I., West A.K. (2004). *Neuron-glia communication: metallothionein expression is specifically up-regulated by astrocytes in response to neuronal injury*. J. Neurochem. 88:454-61.
- Dallinger R. (1994). *Invertebrate organisms as biological indicators of heavy metal pollution*. Appl. Biochem. Biotechnol. 48:27-31.
- Dallinger R., Berger B., Hunziker P., Kägi J.H. (1997). *Metallothionein in snail Cd and Cu metabolism*. Nature. 388:237-238.
- Dallinger R., Berger B., Hunziker P.E., Birchler N., Hauer C.R., Kägi J.H. (1993). *Purification and primary structure of snail metallothionein. Similarity of the N-terminal sequence with histones H4 and H2A*. Eur. J. Biochem. 216:739-746.
- Dallinger R., Wang Y., Berger B., Mackay E.A., Kagi JH. (2001). *Spectroscopic characterization of metallothionein from the terrestrial snail, Helix pomatia*. Eur. J. Biochem. 268:4126-33.
- Dameron C.T., Harrison M.D. (1998). *Mechanisms for protection against copper toxicity*. Am. J. Clin. Nutr. 67(Suppl):1091S-1097S.
- Das K., Debacker V., Bouquegneau J.M. (2000). *Metallothioneins in marine mammals*. Cell. Mol. Biol. (Noisy-le-grand). 46:283-94.
- Davis S.R., Cousins R.J. (2000). *Metallothionein expression in animals: a physiological perspective on function*. J. Nutr. 130:1085-1088.
- Davis S.R., McMahon R.J., Cousins R.J. (1998). *Metallothionein knockout and transgenic mice exhibit altered intestinal processing of zinc with uniform zinc-dependent zinc transporter-1 expression*. J. Nutr. 128:825-31.

- Davis W.Jr., Ronai Z., Tew K.D. (2001). *Cellular thiols and reactive oxygen species in drug-induced apoptosis*. J. Pharmacol. Exp. Ther. 296:1-6.
- De Lisle R.C., Sarras M.P. Jr., Hidalgo J., Andrews G.K. (1996). *Metallothionein is a component of exocrine pancreas secretion: implications for zinc homeostasis*. Am. J. Physiol. 271:C1103-10.
- Degli Esposti M., McLennan H. (1998). *Mitochondria and cells produce reactive oxygen species in virtual anaerobiosis: relevance to ceramide-induced apoptosis*. FEBS Lett. 430:338-42.
- Deng D.X., Chakrabarti S., Waalkes M.P., Cherian M.G. (1998). *Metallothionein and apoptosis in primary human hepatocellular carcinoma and metastatic adenocarcinoma*. Histopathology. 32:340-347.
- Diekert K., de Kroon A.I., Ahting U., Niggemeyer B., Neupert W., de Kruijff B., Lill R. (2001). *Apocytochrome c requires the TOM complex for translocation across the mitochondrial outer membrane*. EMBO J. 20:5626-35.
- Diekert K., Kispal G., Guiard B., Lill R. (1999). *An internal targeting signal directing proteins into the mitochondrial intermembrane space*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 96:11752-7.
- Drahota Z., Chowdhury S.K., Floryk D., Mracek T., Wilhelm J., Rauchova H., Lenaz G., Houstek J. (2002). *Glycerophosphate-dependent hydrogen peroxide production by brown adipose tissue mitochondria and its activation by ferricyanide*. J. Bioenerg. Biomembr. 34:105-13.
- Droge W. (2002). *Free radicals in the physiological control of cell function*. Physiol. Rev. 82:47-95.
- Duguid J.R., Bohmont C.W., Liu N.G., Tourtellotte W.W. (1989). *Changes in brain gene expression shared by scrapie and Alzheimer disease*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:7260-4.
- El Refaey H., Ebadi M., Kuszynski C.A., Sweeney J., Hamada F.M., Hamed A. (1997). *Identification of metallothionein receptors in human astrocytes*. Neurosci. Lett. 231:131-4.
- Emdin S.O., Dodson G.G., Cutfield J.M., Cutfield S.M. (1980). *Role of zinc in insulin biosynthesis. Some possible zinc-insulin interactions in the pancreatic B-cell*. Diabetologia. 19:174-82.
- Endo T., Kohda D. (2002). *Functions of outer membrane receptors in mitochondrial protein import*. Biochim. Biophys. Acta. 1592:3-14.
- English T.E., Storey K.B. (2003). *Freezing and anoxia stresses induce expression of metallothionein in the foot muscle and hepatopancreas of the marine gastropod Littorina littorea*. J. Exp. Biol. 206:2517-24.
- Erickson J.C., Hollopeter G., Thomas S.A., Froelick G.J., Palmiter R.D. (1997). *Disruption of the metallothionein-III gene in mice: analysis of brain zinc, behavior, and neuron vulnerability to metals, aging, and seizures*. J. Neurosci. 17:1271-81.

- Fabris D., Zaia J., Hathout Y., Fenselau C. (1996). *Retention of thiol protons in two classes of protein zinc ion coordination centers*. J. Am. Chem. Soc. 118: 12242-12243.
- Fang J., Beattie D.S. (2003). *External alternative NADH dehydrogenase of Saccharomyces cerevisiae: a potential source of superoxide*. Free Radic. Biol. Med. 34:478-88.
- Feldman S.L., Failla M.L., Cousins R.J. (1978). *Degradation of rat liver metallothioneins in vitro*. Biochim Biophys Acta. 544:638-46.
- Felix K., Lengfelder E., Hartmann H.J., Weser U. (1993). *A pulse radiolytic study on the reaction of hydroxyl and superoxide radicals with yeast Cu(I)-thionein*. Biochim. Biophys. Acta. 1203:104-8.
- Fischer E.H., Davie E.W. (1998). *Recent excitement regarding metallothionein*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:3333-34.
- Forman H.J., Kennedy J. (1976). *Dihydroorotate-dependent superoxide production in rat brain and liver. A function of the primary dehydrogenase*. Arch. Biochem. Biophys. 173:219-24.
- Fowler B.A., Hildebrand C.E., Kojima Y., Webb M. (1987). *Nomenclature of metallothionein*. Experientia Suppl. 52:19-22.
- Frederickson C.J., Bush A.I. (2001). *Synaptically released zinc: physiological functions and pathological effects*. Biometals. 14:353-66.
- Freedman J.H., Slice L.W., Dixon D., Fire A., Rubin C.S. (1993). *The novel metallothionein genes of Caenorhabditis elegans. Structural organization and inducible, cell-specific expression*. J. Biol. Chem. 268:2554-64.
- Fridman J.S., Lowe S.W. (2003). *Control of apoptosis by p53*. Oncogene. 22:9030-40.
- Frohlich K.U., Madeo F. (2000). *Apoptosis in yeast – a monocellular organism exhibits altruistic behaviour*. FEBS Lett. 473:6-9.
- Furey W.F., Robbins A.H., Clancy L.L., Winge D.R., Wang B.C., Stout C.D. (1986). *Crystal structure of Cd,Zn metallothionein*. Science 231:704-710.
- Gaither L.A., Eide D.J. (2001). *Eukaryotic zinc transporters and their regulation*. Biometals. 14:251-70.
- Gamaley I.A., Klyubin I.V. (1999). *Roles of reactive oxygen species: Signaling and regulation of cellular functions*. Int. Rev. Cytol. 188:203-238.
- Genova M.L., Ventura B., Giuliano G., Bovina C., Formiggini G., Parenti Castelli G., Lenaz G. (2001). *The site of production of superoxide radical in mitochondrial Complex I is not a bound ubiquinone but presumably iron-sulfur cluster N2*. FEBS Lett. 505:364-8.
- Geracitano L.A., Bocchetti R., Monserrat J.M., Regoli F., Bianchini A. (2004). *Oxidative stress responses in two populations of Laeonereis acuta (Polychaeta, Nereididae) after acute and chronic exposure to copper*. Mar. Environ. Res. 58:1-17.
- Geret F., Serafim A., Barreira L., Bebianno M.J. (2002). *Effect of cadmium on antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation in the gills of the clam Ruditapes decussatus*. Biomarkers. 7:242-56.

- Ghoshal K., Majumder S., Li Z., Bray T.M., Jacob S.T. (1999). *Transcriptional induction of metallothionein-I and -II genes in the livers of Cu,Zn-superoxide dismutase knockout mice*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 264:735-42.
- Gibson, R. y Barker, P.L. 1979. *The Decapodod Hepatopancreas*. *Oceanogr. Mar. Biol. Ann. Rev.* 17:285-346.
- Giedroc D.P, Chen X., Apuy J.L. (2001). *Metal response element (MRE)-binding transcription factor-1 (MTF-1): structure, function, and regulation*. *Antioxid. Redox. Signal.* 3:577-596.
- Gold G., Grodsky G.M. (1984). *Kinetic aspects of compartmental storage and secretion of insulin and zinc*. *Experientia.* 40:1105-14.
- Gopalakrishna R., Chen Z.H., Gundimeda U. (1997). *Selenocompounds induce a redox modulation of protein kinase C in the cell, compartmentally independent from cytosolic glutathione: its role in inhibition of tumor promotion*. *Arch. Biochem. Biophys.* 348:37-48.
- Gordon D.M., Dancis A., Pain D. (2000). *Mechanisms of mitochondrial protein import*. *Essays Biochem.* 36:61-73.
- Gruber C., Sturzenbaum S., Gehrig P., Sack R., Hunziker P., Berger B., Dallinger R. (2000). *Isolation and characterization of a self-sufficient one-domain protein. (Cd)-metallothionein from Eisenia foetida*. *Eur. J. Biochem.* 267:573-82.
- Gueux N., Peitsch M.C. (1997). *SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling*. *Electrophoresis.* 18:2714-23.
- Hamer D.H. (1986). *Metallothionein*. *Annu. Rev. Biochem.* 55:913-951.
- Hammes B.S., Carrano C.J. (2001). *Methylation of (2-methylethanethiol-bis-3,5-dimethylpyrazolyl)methane zinc complexes and coordination of the resulting thioether: relevance to zinc-containing alkyl transfer enzymes*. *Inorg. Chem.* 40:919-27.
- Han D., Williams E., Cadenas E. (2001). *Mitochondrial respiratory chain-dependent generation of superoxide anion and its release into the intermembrane space*. *Biochem. J.* 353:411-6.
- Hanas J.S., Hazuda D.J., Bogenhagen D.F, Wu F.Y., Wu C.W. (1983). *Xenopus transcription factor A requires zinc for binding to the 5 S RNA gene*. *J. Biol. Chem.* 258:14120-5.
- Hartmann H.J., Weser U. (2000). *Copper-release from yeast Cu(I)-metallothionein by nitric oxide (NO)*. *Biomaterials.* 13:153-6.
- Hasler D.W., Jensen L.T., Zerbe O., Winge D.R., Vasak M. (2000). *Effect of the two conserved prolines of human growth inhibitory factor (metallothionein-3) on its biological activity and structure fluctuation: comparison with a mutant protein*. *Biochemistry.* 39:14567-75.
- Hauptmann N., Grimsby J., Shih J.C., Cadenas E. (1996). *The metabolism of tyramine by monoamine oxidase A/B causes oxidative damage to mitochondrial DNA*. *Arch. Biochem. Biophys.* 335:295-304.
- Heguy A., West A., Richards R.I., Karin M. (1986). *Structure and tissue-specific expression of the human metallothionein IB gene*. *Mol. Cell. Biol.* 6:2149-57.
- Hidalgo J., Aschner M., Zatta P., Vasak M. (2001). *Roles of the metallothionein family of proteins in the central nervous system*. *Brain Res. Bull.* 55:133-145.

- Hoadley J.E., Leinart A.S., Cousins R.J. (1988). *Relationship of ^{65}Zn absorption kinetics to intestinal metallothionein in rats: effects of zinc depletion and fasting*. J. Nutr. 118:497-502.
- Hoch F.L., Vallee B.L. (1956). *Kinetic studies on the role of zinc and diphosphopyridine nucleotide in the activity of yeast alcohol dehydrogenase*. J. Biol. Chem. 221:491-500.
- Hong S., Toyama M., Maret W., Murooka Y. (2001). *High yield expression and single step purification of human thionein/metallothionein*. Protein. Expr. Purif. 21:243-50.
- Horvitz H.R. (1999). *Genetic control of programmed cell death in the nematode Caenorhabditis elegans*. Cancer Res. 59:1701s-6s.
- Hozumi I., Inuzuka T., Tsuji S. (1998). *Brain injury and growth inhibitory factor (GIF)--a minireview*. Neurochem. Res. 23:319-328.
- Huang L., Kirschke C.P., Gitschier J. (2002). *Functional characterization of a novel mammalian zinc transporter, ZnT6*. J. Biol. Chem. 277:26389-95.
- Hunte C., Palsdottir H., Trumpower B.L. (2003). *Protonmotive pathways and mechanisms in the cytochrome bc1 complex*. FEBS Lett. 545:39-46.
- Hunziker P.E. (1991). *Purification of human isometallothioneins*. Methods Enzymol. 205:244-247.
- Hunziker P.E., Kaur P., Wan M., Kanzig A. (1995). *Primary structures of seven metallothioneins from rabbit tissue*. Biochem. J. 306:265-70.
- Iszard M.B., Liu J., Liu Y., Dalton T., Andrews G.K., Palmiter R.D., Klaassen C.D. (1995). *Characterization of metallothionein-I-transgenic mice*. Toxicol. Appl. Pharmacol. 133:305-12.
- Jacob C., Maret W., Vallee B.L. (1998). *Control of zinc transfer between thionein, metallothionein, and zinc proteins*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 95:3489-3494.
- Jenner P. (2003). *A2A antagonists as novel non-dopaminergic therapy for motor dysfunction in PD*. Neurology. 61:S32-8.
- Jiang D., Sullivan P.G., Sensi S.L., Steward O., Weiss J.H. (2001). *Zn(2+) induces permeability transition pore opening and release of pro-apoptotic peptides from neuronal mitochondria*. J. Biol. Chem. 276:47524-9.
- Jiang L.J., Maret W., Vallee B.L. (1998). *The ATP-metallothionein complex*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 95:9146-9.
- Jiang L.J., Vasak M., Vallee B.L., Maret W. (2000). *Zinc transfer potentials of the alpha - and beta-clusters of metallothionein are affected by domain interactions in the whole molecule*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:2503-8.
- Kambe T., Narita H., Yamaguchi-Iwai Y., Hirose J., Amano T., Sugiura N., Sasaki R., Mori K., Iwanaga T., Nagao M. (2002). *Cloning and characterization of a novel mammalian zinc transporter, zinc transporter 5, abundantly expressed in pancreatic beta cells*. J. Biol. Chem. 277:19049-55.
- Kambe T., Yamaguchi-Iwai Y., Sasaki R., Nagao M. (2004). *Overview of mammalian zinc transporters*. Cell. Mol. Life Sci. 61:49-68.

- Kang S.W., Chae H.Z., Seo M.S., Kim K., Baines I.C., Rhee S.G. (1998). *Mammalian peroxiredoxin isoforms can reduce hydrogen peroxide generated in response to growth factors and tumor necrosis factor-alpha*. J. Biol. Chem. 273:6297-302.
- Kang Y.J., Chen Y., Yu A., Voss-McCowan M., Epstein P.N. (1997). *Overexpression of metallothionein in the heart of transgenic mice suppresses doxorubicin cardiotoxicity*. J. Clin. Invest. 100:1501-6.
- Kangur L., Palumaa P. (2001). *The effects of physiologically important nonmetallic ligands in the reactivity of metallothionein towards 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid). A new method for the determination of ligand interactions with metallothionein*. Eur. J. Biochem. 268:4979-84.
- Kaur H., Halliwell B. (1994). *Evidence for nitric oxide-mediated oxidative damage in chronic inflammation. Nitrotyrosine in serum and synovial fluid from rheumatoid patients*. FEBS Lett. 350:9-12.
- Keilin D., Mann T. (1940). *Carbonic anhydrase, purification and nature of the enzyme*. Biochem. J., 34, 1163–1176.
- Kelly E.J., Quaipe C.J., Froelick G.J., Palmiter R.D. (1996). *Metallothionein I and II protect against zinc deficiency and zinc toxicity in mice*. J. Nutr. 126:1782-90.
- Kelly E.J., Sandgren E.P., Brinster R.L., Palmiter R.D. (1997). *A pair of adjacent glucocorticoid response elements regulate expression of two mouse metallothionein genes*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:10045-10050.
- Kershaw W.C., Klaassen C.D. (1992). *Degradation and metal composition of hepatic isometallothioneins in rats*. Toxicol. Appl. Pharmacol. 112:24-31.
- Kirschke C.P., Huang L. (2003). *ZnT7, a novel mammalian zinc transporter, accumulates zinc in the Golgi apparatus*. J. Biol. Chem. 278:4096-102.
- Kissling M.M., Kagi H.R. (1977). *Primary structure of human hepatic metallothionein*. FEBS Lett. 82:247-50.
- Klaassen C.D., Choudhuri S., McKim J.M. Jr., Lehman-McKeeman L.D., Kershaw W.C. (1994). *In vitro and in vivo studies on the degradation of metallothionein*. Environ. Health Perspect. 102:141-6.
- Klaassen C.D., Liu J., Choudhuri S. (1999). *Metallothionein: an intracellular protein to protect against cadmium toxicity*. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 39:267-94.
- Kobayashi H., Uchida Y., Ihara Y., Nakajima K., Kohsaka S., Miyatake T., Tsuji S. (1993). *Molecular cloning of rat growth inhibitory factor cDNA and the expression in the central nervous system*. Brain Res. Mol. Brain Res. 19:188-94.
- Kondo Y., Rusnak J.M., Hoyt D.G., Settineri C.E., Pitt B.R., Lazo J.S. (1997). *Enhanced apoptosis in metallothionein null cells*. Mol. Pharmacol. 52:195-201.
- Korshunov S.S., Skulachev V.P., Starkov A.A. (1997). *High protonic potential actuates a mechanism of production of reactive oxygen species in mitochondria*. FEBS Lett. 416:15-8.

- Kowaltowski A.J., Castilho R.F, Vercesi A.E. (2001). *Mitochondrial permeability transition and oxidative stress*. FEBS Lett. 495:12-5.
- Kozak M. (1989). *The scanning model for translation: An update*. J. Cell. Biol. 108:229-241.
- Kozak M. (1997). *Recognition of AUG and alternative initiator codons is augmented by G in position +4 but is not generally affected by the nucleotides in positions +5 and +6*. EMBO J. 16: 2482-2492.
- Kushnareva Y., Murphy A.N., Andreyev A. (2002). *Complex I-mediated reactive oxygen species generation: modulation by cytochrome c and NAD(P)⁺ oxidation-reduction state*. Biochem. J. 368:545-53.
- Laemmli U.K. (1970). *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature. 227:680-5.
- Laitly J.H., Lee B.M., Wright P.E. (2001). *Zinc finger proteins: new insights into structural and functional diversity*. Curr. Opin. Struct. Biol. 11:39-46.
- Langmade S.J., Ravindra R., Daniels P.J., Andrews G.K. (2000). *The transcription factor MTF-1 mediates metal regulation of the mouse ZnT1 gene*. J. Biol. Chem. 275:34803-9.
- Lastowski-Perry D., Otto E., Maroni G. (1985). *Nucleotide sequence and expression of a Drosophila metallothionein*. J. Biol. Chem. 260: 1527-1530.
- Latt S.A., Holmquist B., Vallee B.L. (1969). *Thermolysin: a zinc metalloenzyme*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 37:333-9.
- Lazo J.S., Kondo Y., Dellapiazza D., Michalska A.E., Choo K.H., Pitt B.R. (1995). *Enhanced sensitivity to oxidative stress in cultured embryonic cells from transgenic mice deficient in metallothionein I and II genes*. J. Biol. Chem. 270:5506-10.
- Lazo J.S., Kuo S.M., Woo E.S., Pitt B.R. (1998). *The protein thiol metallothionein as an antioxidant and protectant against antineoplastic drugs*. Chem. Biol. Interact. 111-112:255-62.
- LeDoux S.P., Driggers W.J., Hollensworth B.S., Wilson G.L. (1999). *Repair of alkylation and oxidative damage in mitochondrial DNA*. Mutat. Res. 434:149-59.
- Lenaz G. (2001). *The mitochondrial production of reactive oxygen species: mechanisms and implications in human pathology*. IUBMB Life. 52:159-64.
- Lerch K., Ammer D., Olafson R.W. (1982). *Crab metallothionein. Primary structures of metallothioneins 1 and 2*. J. Biol. Chem. 257:2420-26.
- Lewis K. (2000). *Programmed death in bacteria*. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 64:503-14.
- Link T.A., von Jagow G. (1995). *Zinc ions inhibit the QP center of bovine heart mitochondrial bc1 complex by blocking a protonatable group*. J. Biol. Chem. 270:25001-6.
- Liochev S.I., Fridovich I. (1999). *Superoxide and iron: partners in crime*. IUBMB Life. 48:157-61.
- Lithgow T. (2000). *Targeting of proteins to mitochondria*. FEBS Lett. 476:22-6.
- Liu J., Klaassen C.D. (1996). *Absorption and distribution of cadmium in metallothionein-I transgenic mice*. Fundam. Appl. Toxicol. 29:294-300.

- Liu Y.L., Lee H.T., Chang C.C., Kan L.S. (2003). *Reversible folding of cysteine-rich metallothionein by an overcritical reaction path*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 306:59-63.
- Liu J., Lei D., Waalkes M.P., Beliles R.P., Morgan D.L. (2003). *Genomic analysis of the rat lung following elemental mercury vapor exposure*. *Toxicol. Sci.* 74:174-81.
- Liu Y., Liu J., Iszard M.B., Andrews G.K., Palmiter R.D., Klaassen C.D. (1995). *Transgenic mice that overexpress metallothionein-I are protected from cadmium lethality and hepatotoxicity*. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 135:222-8.
- Longin A.S., Mezin P., Favier A., Verdet J. (1997). *Presence of zinc and calcium permeant channels in the inner membrane of the nuclear envelope*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 235:236-41.
- Loo J.A., Loo R.R., Udseth H.R., Edmonds C.G., Smith R.D. (1991). *Solvent-induced conformational changes of polypeptides probed by electrospray-ionization mass spectrometry*. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 5:101-5.
- Lorusso M., Cocco T., Sardanelli A.M., Minuto M., Bonomi F., Papa S. (1991). *Interaction of Zn²⁺ with the bovine-heart mitochondrial bc1 complex*. *Eur. J. Biochem.* 197:555-61.
- MacDiarmid C.W., Gaither L.A., Eide D. (2000). *Zinc transporters that regulate vacuolar zinc storage in *Saccharomyces cerevisiae**. *EMBO J.* 19:2845-55.
- MacNee W. (2001). *Oxidative stress and lung inflammation in airways disease*. *Eur. J. Pharmacol.* 429:195-207.
- Malikayil J.A., Lerch K., Armitage I.M. (1989). *Proton NMR studies of a metallothionein from *Neurospora crassa*: sequence-specific assignments by NOE measurements in the rotating frame*. *Biochemistry.* 28:2991-2995.
- Mantel L.H., Bliss D.E. (1983). *The Biology of Crustacea. Internal anatomy and Physiological regulation*. Academic Press. New York.
- Maret W. (2000). *The function of zinc metallothionein: a link between cellular zinc and redox state*. *J. Nutr.* 130(Suppl.):1455S-1458S.
- Maret W., Jacob C., Vallee B.L., Fischer E.H. (1999). *Inhibitory sites in enzymes: zinc removal and reactivation by thionein*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96:1936-40.
- Maret W., Vallee B.L. (1998). *Thiolate ligands in metallothionein confer redox activity on zinc clusters*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95:3478-3482.
- Maret W., Yetman C.A., Jiang L. (2001). *Enzyme regulation by reversible zinc inhibition: glycerol phosphate dehydrogenase as an example*. *Chem. Biol. Interact.* 130-132:891-901.
- Margoshes M., Vallee B.L. (1957). *A cadmium protein from equine kidney cortex*. *J. Am. Chem. Soc.* 79:4813-4814.
- Marti A., Graber H., Lazar H., Ritter P.M., Baltzer A., Srinivasan A., Jaggi R. (2000). *Caspases: decoders of apoptotic signals during mammary involution. Caspase activation during involution*. *Adv. Exp. Med. Biol.* 480:195-201.

- Masters B.A., Kelly E.J., Quaife C.J., Brinster R.L., Palmiter R.D. (1994a). *Targeted disruption of metallothionein I and II genes increases sensitivity to cadmium*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 91:584-8.
- Masters B.A., Quaife C.J., Erickson J.C., Kelly E.J., Froelick G.J., Zambrowicz B.P., Brinster R.L., Palmiter R.D. (1994b). *Metallothionein III is expressed in neurons that sequester zinc in synaptic vesicles*. J. Neurosci. 14:5844-57.
- Mathieu D., Mathieu-Nolf M., Wattel F. (1996). *Carbon monoxide poisoning: current aspects*. Bull. Acad. Natl. Med. 180:965-71
- Maxfield A.B., Heaton D.N., Winge D.R. (2004). *Cox17 is functional when tethered to the mitochondrial inner membrane*. J. Biol. Chem. 279:5072-80.
- McCormick C.C., Lin L.Y. (1991). *Quantification and identification of metallothioneins by gel electrophoresis and silver staining*. Methods Enzymol. 205:71-8.
- McKim J.M. Jr., Choudhuri S., Klaassen C.D. (1992). *In vitro degradation of apo-, zinc-, and cadmium-metallothionein by cathepsins B, C, and D*. Toxicol. Appl. Pharmacol. 116:117-24.
- McLennan H.R., Degli Esposti M. (2000). *The contribution of mitochondrial respiratory complexes to the production of reactive oxygen species*. J. Bioenerg. Biomembr. 32:153-62.
- Meplan C., Richard M.J., Hainaut P. (2000). *Metalloregulation of the tumor suppressor protein p53: zinc mediates the renaturation of p53 after exposure to metal chelators in vitro and in intact cells*. Oncogene. 19:5227-36.
- Merrifield M.E., Huang Z., Kille P., Stillman M.J. (2002). *Copper speciation in the alpha and beta domains of recombinant human metallothionein by electrospray ionization mass spectrometry*. J. Inorg. Biochem. 88:153-72.
- Messlerle B.A., Schaffer A., Vasak M., Kagi J.H., Wuthrich K. (1990). *Three-dimensional structure of human [113Cd7]metallothionein-2 in solution determined by nuclear magnetic resonance spectroscopy*. J. Mol. Biol. 214:765-79.
- Michalczyk A.A., Allen J., Blomeley R.C., Ackland M.L. (2002). *Constitutive expression of hZnT4 zinc transporter in human breast epithelial cells*. Biochem. J. 364:105-13.
- Michalska A.E., Choo K.H. (1993). *Targeting and germ-line transmission of a null mutation at the metallothionein I and II loci in mouse*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 90:8088-92.
- Miles A.T., Hawksworth G.M., Beattie J.H., Rodilla V. (2000). *Induction, regulation, degradation, and biological significance of mammalian metallothioneins*. Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol. 35:35-70.
- Miller J., McLachlan A.D., Klug A. (1985). *Repetitive zinc-binding domains in the protein transcription factor IIIA from Xenopus oocytes*. EMBO J. 4:1609-14.
- Mitchell P. (1975). *Protonmotive redox mechanism of the cytochrome b-c1 complex in the respiratory chain: protonmotive ubiquinone cycle*. FEBS Lett. 56:1-6.
- Mitchell P. (1977). *Vectorial chemiosmotic processes*. Annu. Rev. Biochem. 46:996-1005.

- Montoliu C., Monfort P., Carrasco J., Palacios O., Capdevila M., Hidalgo J., Felipe V. (2000). *Metallothionein-III prevents glutamate and nitric oxide neurotoxicity in primary cultures of cerebellar neurons*. J. Neurochem. 75:266-73.
- Muñoz A., Forsterling F.H., Shaw C.F. 3rd, Petering D.H. (2002). *Structure of the (113)Cd(3)beta domains from Homarus americanus metallothionein-1: hydrogen bonding and solvent accessibility of sulfur atoms*. J. Biol. Inorg. Chem. 7:713-24.
- Muñoz A., Laib F, Petering D.H., Shaw C.F. 3rd. (1999). *Characterization of the cadmium complex of peptide 49-61: a putative nucleation center for cadmium-induced folding in rabbit liver metallothionein IIA*. J. Biol. Inorg. Chem. 4:495-507.
- Muñoz A., Petering D.H., Shaw C.F. 3rd. (2000). *Structure-reactivity relationships among metallothionein three-metal domains: role of non-cysteine amino acid residues in lobster metallothionein and human metallothionein-3*. Inorg. Chem. 39:6114-23.
- Myers L.C., Wagner G., Verdine G.L. (1995). *Direct activation of the methyl chemosensor protein N-Ada by CH₃I*. J. Am. Chem. Soc. 117:10749-10750.
- Nakajima K., Suzuki K. (1995). *Immunochemical detection of metallothionein in brain*. Neurochem. Int. 27:73-87.
- Nakamura H., Nakamura K., Yodoi J. (1997). *Redox regulation of cellular activation*. Annu.Rev. Immunol. 15:351-369.
- Narula S.S., Brouwer M., Hua Y., Armitage I.M. (1995). *Three-dimensional solution structure of Callinectes sapidus metallothionein-1 determined by homonuclear and heteronuclear magnetic resonance spectroscopy*. Biochemistry. 34:620-631.
- Narula S.S., Winge D.R., Armitage I.M. (1993). *Copper- and silver-substituted yeast metallothioneins: sequential 1H NMR assignments reflecting conformational heterogeneity at the C terminus*. Biochemistry. 32:6773-6787.
- Neal J.W., Singhrao S.K., Jasani B., Newman G.R. (1996). *Immunocytochemically detectable metallothionein is expressed by astrocytes in the ischaemic human brain*. Neuropathol. Appl. Neurobiol. 22:243-7.
- Nelbach M.E., Pigiet V.P. Jr, Gerhart J.C., Schachman H.K. (1972). *A role for zinc in the quaternary structure of aspartate transcarbamylase from Escherichia coli*. Biochemistry. 11:315-27.
- Nelson D.L., Cox M.M. (2000). *Lehninger Principles of Biochemistry*. Third edition. Worth Publishers. New York.
- Nettesheim D.G., Engeseth H.R., Otvos J.D. (1985). *Products of metal exchange reactions of metallothionein*. Biochemistry 24:6744-51.
- Nicholls D.G. (2002). *Mitochondrial function and dysfunction in the cell: its relevance to aging and aging-related disease*. Int. J. Biochem. Cell. Biol. 34:1372-81.
- Nielson K.B., Winge D.R. (1985). *Independence of the domains of metallothionein in metal binding*. J. Biol. Chem. 260:8698-8701.
- Noji H., Yoshida M. (2001). *The rotary machine in the cell, ATP synthase*. J. Biol. Chem. 276:1665-8. Epub 2000 Nov 15.

- Okado-Matsumoto A., Fridovich I. (2001). *Subcellular distribution of superoxide dismutases (SOD) in rat liver: Cu,Zn-SOD in mitochondria*. J. Biol. Chem. 276:38388-93.
- Otvos J.D., Armitage I.M. (1980). *Structure of the metal clusters in rabbit liver metallothionein*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 77:7094-98.
- Overnell J., Good M., Vasak M. (1988). *Spectroscopic studies on cadmium (II)- and cobalt(II)-substituted metallothionein from the crab Cancer pagurus. Evidence for one additional low-affinity metal-binding site*. Eur. J. Biochem. 172:171-7.
- Palmiter R.D. (1987). *Molecular biology of metallothionein gene expression*. Experientia Suppl. 52:63-80.
- Palmiter R.D. (1994). *Regulation of metallothionein genes by heavy metals appears to be mediated by a zinc-sensitive inhibitor that interacts with a constitutively active transcription factor, MTF-1*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 91:1219-23.
- Palmiter R.D. (1998). *The elusive function of metallothioneins*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 95:8428-30.
- Palmiter R.D., Cole T.B., Findley S.D. (1996). *ZnT-2, a mammalian protein that confers resistance to zinc by facilitating vesicular sequestration*. EMBO J. 15:1784-91.
- Palmiter R.D., Findley S.D. (1995). *Cloning and functional characterization of a mammalian zinc transporter that confers resistance to zinc*. EMBO J. 14:639-49.
- Palmiter R.D., Findley S.D., Whitmore T.E., Durnam D.M. (1992). *MT-III, a brain-specific member of the metallothionein gene family*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 89:6333-6337.
- Palumaa P., Njunkova O., Pokras L., Eriste E., Jornvall H., Sillard R. (2002). *Evidence for non-isostructural replacement of Zn(2+) with Cd(2+) in the beta-domain of brain-specific metallothionein-3*. FEBS Lett. 527:76-80.
- Palumaa P., Tammiste I., Kruusel K., Kangur L., Jornvall H., Sillard R. (2005). *Metal binding of metallothionein-3 versus metallothionein-2: lower affinity and higher plasticity*. Biochim. Biophys. Acta. 1747:205-11.
- Pan P.K., Hou F.Y., Cody C.W., Huang P.C. (1994). *Substitution of glutamic acids for the conserved lysines in the alpha domain affects metal binding in both the alpha and beta domains of mammalian metallothionein*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 202:621-8.
- Pattanaik A., Shaw C.F. 3rd, Petering D.H., Garvey J., Kraker A.J. (1994). *Basal metallothionein in tumors: widespread presence of apoprotein*. J. Inorg. Biochem. 54:91-105.
- Pearson W.R., Lipman D.J. (1988). *Improved tools for biological sequence comparison*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 85:2444-8.
- Pedersen K.L., Pedersen S.N., Hojrup P., Andersen J.S., Roepstorff P., Knudsen J., Depledge M.H. (1994). *Purification and characterization of a cadmium-induced metallothionein from the shore crab Carcinus maenas (L.)*. Biochem. J. 297:609-614.
- Pedersen S.N., Pedersen K.L., Hojrup P., Depledge M.H., Knudsen J. (1996). *Primary structures of decapod crustacean metallothioneins with special emphasis on freshwater and semi-terrestrial species*. Biochem. J. 319:999-1003.

- Pedersen S.N., Pedersen K.L., Hojrup P., Knudsen J., Depledge M.H. (1998). *Induction and identification of cadmium-, zinc- and copper-metallothioneins in the shore crab Carcinus maenas (L.)*. Comp. Biochem. Physiol. C Pharmacol. Toxicol. Endocrinol. 120:251-259.
- Penkowa M., Carrasco J., Giralt M., Molinero A., Hernandez J., Campbell I.L., Hidalgo J. (2000). *Altered central nervous system cytokine-growth factor expression profiles and angiogenesis in metallothionein-I+II deficient mice*. J. Cereb. Blood Flow Metab. 20:1174-89.
- Penkowa M., Carrasco J., Giralt M., Moos T., Hidalgo J. (1999). *CNS wound healing is severely depressed in metallothionein I- and II-deficient mice*. J. Neurosci. 19:2535-45.
- Penkowa M., Hidalgo J. (2001). *Metallothionein treatment reduces proinflammatory cytokines IL-6 and TNF- α and apoptotic cell death during Experimental Autoimmune Encephalomyelitis (EAE)*. Exp. Neurol. 170:1-14.
- Peterson C.W., Narula S.S., Armitage I.M. (1996). *3D solution structure of copper and silver-substituted yeast metallothioneins*. FEBS Lett. 379:85-93.
- Piccinni E., Staudenmann W., Albergoni V., De Gabrieli R., James P. (1994). *Purification and primary structure of metallothioneins induced by cadmium in the protists Tetrahymena pigmentosa and Tetrahymena pyriformis*. Eur. J. Biochem. 226:853-859.
- Pitt B.R., Schwarz M., Woo E.S., Yee E., Wasserloos K., Tran S., Weng W., Mannix R.J., Watkins S.A., Tyurina Y.Y., Tyurin V.A., Kagan V.E., Lazo J.S. (1997). *Overexpression of metallothionein decreases sensitivity of pulmonary endothelial cells to oxidant injury*. Am. J. Physiol. 273:L856-65.
- Plocke D.J., Levinthal C., Vallee B.L. (1962). *Alkaline phosphatase of Escherichia coli: a zinc metalloenzyme*. Biochemistry. 25:1:373-8.
- Popov V.N. (2003). *Possible role of free oxidation processes in the regulation of reactive oxygen species production in plant mitochondria*. Biochem. Soc. Trans. 31:1316-7.
- Pulido P., Kagi J.H., Vallee B.L. (1966). *Isolation and some properties of human metallothionein*. Biochemistry. 5:1768-1777.
- Quaife C.J., Findley S.D., Erickson J.C., Froelick G.J., Kelly E.J., Zambrowicz B.P., Palmiter R.D. (1994). *Induction of a new metallothionein isoform (MT-IV) occurs during differentiation of stratified squamous epithelia*. Biochemistry. 33:7250-9.
- Quesada A.R., Byrnes R.W., Krezoski S.O., Petering D.H. (1996). *Direct reaction of H₂O₂ with sulfhydryl groups in HL-60 cells: zinc-metallothionein and other sites*. Arch. Biochem. Biophys. 334:241-50.
- Radi R., Cassina A., Hodara R., Quijano C., Castro L. (2002). *Peroxynitrite reactions and formation in mitochondria*. Free Radic Biol Med. 33:1451-64.
- Riek R., Precheur B., Wang Y., Mackay E.A., Wider G., Guntert P., Liu A., Kägi J.H., Wuthrich K. (1999). *NMR structure of the sea urchin (Strongylocentrotus purpuratus) metallothionein MTA*. J. Mol. Biol. 291:417-428.

- Rigobello M.P., Callegaro M.T., Barzon E., Benetti M., Bindoli A. (1998). *Purification of mitochondrial thioredoxin reductase and its involvement in the redox regulation of membrane permeability*. Free Radic. Biol. Med. 24:370-6.
- Robbins A.H., McRee D.E., Williamson M., Collett S.A., Xuong N.H., Furey W.F., Wang B.C., Stout C.D. (1991). *Refined crystal structure of Cd, Zn metallothionein at 2.0 Å resolution*. J. Mol. Biol. 221:1269-93.
- Robinson N.J., Whitehall S.K., Cavet J.S. (2001). *Microbial metallothioneins*. Adv. Microb. Physiol. 44:183-213.
- Rofe A.M., Philcox J.C., Coyle P. (1996). *Trace metal, acute phase and metabolic response to endotoxin in metallothionein-null mice*. Biochem. J. 314:793-7.
- Rofe A.M., Philcox J.C., Coyle P. (2000). *Activation of glycolysis by zinc is diminished in hepatocytes from metallothionein-null mice*. Biol. Trace Elem. Res. 75:87-97.
- Romero-Isart N., Cols N., Termansen M.K., Gelpi J.L., Gonzalez-Duarte R., Atrian S., Capdevila M., Gonzalez-Duarte P. (1999). *Replacement of terminal cysteine with histidine in the metallothionein alpha and beta domains maintains its binding capacity*. Eur. J. Biochem. 259:519-27.
- Romero-Isart N., Jensen L.T., Zerbe O., Winge D.R., Vasak M. (2002). *Engineering of metallothionein-3 neuroinhibitory activity into the inactive isoform metallothionein-1*. J. Biol. Chem. 277:37023-8.
- Romero-Isart N., Vasak M. (2002). *Advances in the structure and chemistry of metallothioneins*. J. Inorg. Biochem. 88:388-96.
- Romero-Ruiz A., Amezcua O., Rodriguez-Ortega M.J., Munoz J.L., Alhama J., Rodriguez-Ariza A., Gomez-Ariza J.L., Lopez-Barea J. (2003). *Oxidative stress biomarkers in bivalves transplanted to the Guadalquivir estuary after Aznalcollar spill*. Environ. Toxicol. Chem. 22:92-100.
- Rubbo H., Radi R., Trujillo M., Telleri R., Kalyanaraman B., Barnes S., Kirk M., Freeman B.A. (1994). *Nitric oxide regulation of superoxide and peroxynitrite-dependent lipid peroxidation. Formation of novel nitrogen-containing oxidized lipid derivatives*. J. Biol. Chem. 269:26066-75.
- Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. (1989). *Molecular cloning. A Laboratory Manual*. Second edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York.
- Santovito G., Irato P., Palermo S., Boldrin F., Sack R., Hunziker P., Piccinni E.L. (2001). *Identification, cloning and characterisation of a novel copper-metallothionein in tetrahymena pigmentosa. Sequencing of cDNA and expression*. Protist. 152:219-229.
- Saris N.E., Niva K. (1994). *Is Zn²⁺ transported by the mitochondrial calcium uniporter?* FEBS Lett. 356:195-8.
- Sastry P.S., Rao K.S. (2000). *Apoptosis and the nervous system*. J. Neurochem. 74:1-20.
- Satoh M., Nishimura N., Kanayama Y., Naganuma A., Suzuki T., Tohyama C. (1997). *Enhanced renal toxicity by inorganic mercury in metallothionein-null mice*. J. Pharmacol. Exp. Ther. 283:1529-33.

- Savas M.M., Shaw C.F. 3rd, Petering D.H. (1993). *The oxidation of rabbit liver metallothionein-II by 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) and glutathione disulfide*. J. Inorg. Biochem. 52:235-49.
- Sayle R.A., Milner-White E.J. (1995). *RASMOL: biomolecular graphics for all*. Trends Biochem. Sci. 20:374.
- Schagger H., von Jagow G. (1987). *Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa*. Anal. Biochem. 166:368-79.
- Schmidt C., Beyersmann D. (1999). *Transient peaks in zinc and metallothionein levels during differentiation of 3T3L1 cells*. Arch. Biochem. Biophys. 364:91-8.
- Schrantz N., Auffredou M.T., Bourgeade M.F., Besnault L., Leca G., Vazquez A. (2001). *Zinc-mediated regulation of caspases activity: dose-dependent inhibition or activation of caspase-3 in human Burkitt lymphoma B cells (Ramos)*. Cell Death Differ. 8:152-61.
- Schutte B., Ramaekers F.C. (2000). *Molecular switches that govern the balance between proliferation and apoptosis*. Prog. Cell Cycle Res. 4:207-17.
- Schwarz M.A., Lazo J.S., Yalowich J.C., Allen W.P., Whitmore M., Bergonia H.A., Tzeng E., Billiar T.R., Robbins P.D., Lancaster J.R. Jr., Pitt B.R. (1995). *Metallothionein protects against the cytotoxic and DNA-damaging effects of nitric oxide*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 92:4452-56.
- Searle P.F., Davison B.L., Stuart G.W., Wilkie T.M., Norstedt G., Palmiter R.D. (1984). *Regulation, linkage, and sequence of mouse metallothionein I and II genes*. Mol. Cell. Biol. 4:1221-30.
- Sensi S.L., Yin H.Z., Carriedo S.G., Rao S.S., Weiss J.H. (1999). *Preferential Zn²⁺ influx through Ca²⁺-permeable AMPA/kainate channels triggers prolonged mitochondrial superoxide production*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 96:2414-9.
- Seve M., Chimienti F., Favier A. (2002). *Role of intracellular zinc in programmed cell death*. Pathol. Biol. (Paris). 50:212-21.
- Sewell A.K., Jensen L.T., Erickson J.C., Palmiter R.D., Winge D.R. (1995). *Bioactivity of metallothionein-3 correlates with its novel beta domain sequence rather than metal binding properties*. Biochemistry. 34:4740-7.
- Shaikh Z.A. (1991). *Radioimmunoassay for metallothionein in body fluids and tissues*. En: Riordan J.F., Vallee B.L. (Eds.), Methods in Enzymology. New York: Academic Press. p. 27.
- Shaw C.F. 3rd, Savas M.M., Petering D.H. (1991). *Ligand substitution and sulfhydryl reactivity of metallothionein*. Methods. Enzymol. 205:401-14.
- Shaw G., Kamen R. (1986). *A conserved AU sequence from the 3' untranslated region of GM-CSF mRNA mediates selective mRNA degradation*. Cell 46:659-67.
- Shimoda R., Achanzar W.E., Qu W., Nagamine T., Takagi H., Mori M., Waalkes M.P. (2003). *Metallothionein is a potential negative regulator of apoptosis*. Toxicol. Sci. 73:294-300.

- Shindler K.S., Zurakowski D., Dreyer E.B. (2000). Caspase inhibitors block zinc-chelator induced death of retinal ganglion cells. *Neuroreport*. 11:2299-302.
- Shinyashiki M., Chiang K.T., Switzer C.H., Gralla E.B., Valentine J.S., Thiele D.J., Fukuto J.M. (2000). *The interaction of nitric oxide (NO) with the yeast transcription factor Ace1: A model system for NO-protein thiol interactions with implications to metal metabolism*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:2491-2496.
- Silar P., Theodore L., Mokdad R., Erraiss N.E., Cadic A., Wegnez M. (1990). *Metallothionein Mto gene of Drosophila melanogaster: structure and regulation*. *J. Mol. Biol.* 215:217-224.
- Sillevis Smitt P.A., van Beek H., Baars A.J., Troost D., Louwense E.S., Krops-Hermus A.C., de Wolff F.A., de Jong J.M. (1992). *Increased metallothionein in the liver and kidney of patients with amyotrophic lateral sclerosis*. *Arch. Neurol.* 49:721-4.
- Simons T.J. (1991). *Intracellular free zinc and zinc buffering in human red blood cells*. *J. Membr. Biol.* 123:63-71.
- Simpkins C., Balderman S., Mensah E. (1998). *Mitochondrial oxygen consumption is synergistically inhibited by metallothionein and calcium*. *J. Surg. Res.* 80:16-21.
- Simpkins C., Eudarc P., Torrence C., Yang Z. (1993). *Metallothionein I reduction of cytochrome c*. *Life Sci.* 53:1975-80.
- Simpkins C.O., Zhao H.L., Torrence C.A. (1994). *Effect of metallothionein I on mitochondrial oxygen consumption*. *Life Sci.* 55:221-6.
- Skulachev V.P. (1998). *Uncoupling: new approaches to an old problem of bioenergetics*. *Biochim. Biophys. Acta.* 1363:100-24.
- Skulachev V.P., Chistyakov V.V., Jasaitis A.A., Smirnova E.G. (1967). *Inhibition of the respiratory chain by zinc ions*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 26:1-6.
- Somers W., Ultsch M., De Vos A.M., Kossiakoff A.A. (1994). *The X-ray structure of a growth hormone-prolactin receptor complex*. *Nature.* 372:478-81.
- Stadtman E.R., Levine R.L. (2000). *Protein oxidation*. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 899:191-208.
- Starkov A.A., Fiskum G. (2001). *Myxothiazol induces H₂O₂ production from mitochondrial respiratory chain*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 281:645-50.
- St Croix C.M., Wasserloos K.J., Dineley K.E., Reynolds I.J., Levitan E.S., Pitt B.R. (2002). *Nitric oxide-induced changes in intracellular zinc homeostasis are mediated by metallothionein/thionein*. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 282:L185-92.
- Steiner H., Zollner A., Haid A., Neupert W., Lill R. (1995). *Biogenesis of mitochondrial heme lyases in yeast. Import and folding in the intermembrane space*. *J. Biol. Chem.* 270:22842-9.
- Sternlieb I. (1987). *Hepatic lysosomal copper-thionein*. *Experientia Suppl.* 52:647-53.
- Sturtz L.A., Diekert K., Jensen L.T., Lill R., Culotta V.C. (2001). *A fraction of yeast Cu,Zn-superoxide dismutase and its metallochaperone, CCS, localize to the intermembrane space of mitochondria. A physiological role for SOD1 in guarding against mitochondrial oxidative damage*. *J. Biol. Chem.* 276:38084-9.

- Swain S.C., Keusekotten K., Baumeister R., Sturzenbaum S.R. (2004). *C. elegans metallothioneins: new insights into the phenotypic effects of cadmium toxicosis*. J. Mol. Biol. 341:951-59.
- Syring R.A., Hoexum-Brouwer T., Brouwer M. (2000). *Cloning and sequencing of cDNAs encoding for a novel copper-specific metallothionein and two cadmium-inducible metallothioneins from the blue crab Callinectes sapidus*. Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol. 125:325-332.
- Tamai K.T., Gralla E.B., Ellerby L.M., Valentine J.S., Thiele D.J. (1993). *Yeast and mammalian metallothioneins functionally substitute for yeast copper-zinc superoxide dismutase*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 90:8013-7.
- Tamai K.T., Liu X., Silar P., Sosinowski T., Thiele D.J. (1994). *Heat shock transcription factor activates yeast metallothionein gene expression in response to heat and glucose starvation via distinct signalling pathways*. Mol. Cell. Biol. 14:8155-8165.
- Theocharis S.E., Margeli A.P., Koutselinis A. (2003). *Metallothionein: a multifunctional protein from toxicity to cancer*. Int. J. Biol. Markers. 18:162-9.
- Thiele D.J. (1988). *ACE1 regulates expression of the Saccharomyces cerevisiae metallothionein gene*. Mol. Cell. Biol. 8:2745-2752.
- Thompson C.B. (1995). *Apoptosis in pathogenesis and treatment of disease*. Science. 267:1456-62.
- Thompson J.D., Higgins D.G., Gibson T.J. (1994). *CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice*. Nucleic. Acids. Res. 22:4673-4680.
- Tio L., Villarreal L., Atrian S., Capdevila M. (2004). *Functional Differentiation in the Mammalian Metallothionein Gene Family: metal binding features of mouse mt4 and comparison with its paralog mt1*. J. Biol. Chem. 279:24403-13.
- Trayhurn P., Duncan J.S., Wood A.M., Beattie J.H. (2000a). *Metallothionein gene expression and secretion in white adipose tissue*. Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. 279:R2329-35.
- Trayhurn P., Duncan J.S., Wood A.M., Beattie J.H. (2000b). *Regulation of metallothionein gene expression and secretion in rat adipocytes differentiated from preadipocytes in primary culture*. Horm. Metab. Res. 32:542-7.
- Treves S., Trentini P.L., Ascanelli M., Bucci G., Di Virgilio F. (1994). *Apoptosis is dependent on intracellular zinc and independent of intracellular calcium in lymphocytes*. Exp. Cell. Res. 211-339-43.
- Truesdale G.A., Downing A.L. (1954). *Solubility of oxygen in water*. Nature. 173:1236.
- Trumpower B.L. (1990). *The protonmotive Q cycle. Energy transduction by coupling of proton translocation to electron transfer by the cytochrome bc1 complex*. J. Biol. Chem. 265:11409-12.

- Tsangaris G.T., Tzortzatu-Stathopoulou F. (1998). *Metallothionein expression prevents apoptosis: a study with antisense phosphorothioate oligodeoxynucleotides in a human T cell line*. *Anticancer Res.* 18:2423-2433.
- Tsokos J., Kreisberg R., Michaels A., Komm B., Linton J. (1983). *Respiratory and calcium transport properties of spiny lobster hepatopancreas mitochondria*. *Arch. Biochem. Biophys.* 224:707-17.
- Tsuji S., Kobayashi H., Uchida Y., Ihara Y., Miyatake T. (1992). *Molecular cloning of human growth inhibitory factor cDNA and its down-regulation in Alzheimer's disease*. *EMBO J.* 11:4843-50.
- Tsujikawa K., Suzuki N., Sagawa K., Itoh M., Sugiyama T., Kohama Y., Otaki N., Kimura M., Mimura T. (1994). *Induction and subcellular localization of metallothionein in regenerating rat liver*. *Eur. J. Cell Biol.* 63:240-6.
- Turrens J.F. (1997). *Superoxide production by the mitochondrial respiratory chain*. *Biosci Rep.* 17:3-8.
- Turrens J.F. (2003). *Mitochondrial formation of reactive oxygen species*. *J. Physiol.* 552:335-44.
- Turrens J.F., Alexandre A., Lehninger A.L. (1985). *Ubisemiquinone is the electron donor for superoxide formation by complex III of heart mitochondria*. *Arch. Biochem. Biophys.* 237:408-14.
- Turrens J.F., Boveris A. (1980). *Generation of superoxide anion by the NADH dehydrogenase of bovine heart mitochondria*. *Biochem. J.* 191:421-7.
- Turrens J.F., Freeman B.A., Levitt J.G., Crapo J.D. (1982). *The effect of hyperoxia on superoxide production by lung submitochondrial particles*. *Arch. Biochem. Biophys.* 217:401-10.
- Uchida Y. (1994). *Growth-inhibitory factor, metallothionein-like protein, and neurodegenerative diseases*. *Biol. Signals.* 3:211-215.
- Uchida Y., Takio K., Titani K., Ihara Y., Tomonaga M. (1991). *The growth inhibitory factor that is deficient in the Alzheimer's disease brain is a 68 amino acid metallothionein-like protein*. *Neuron.* 7:337-347.
- Vallee B.L., Neurath H. (1955). *Carboxypeptidase, a zinc metalloenzyme*. *J. Biol. Chem.* 217:253-61.
- Valls M., Bofill R., Gonzalez-Duarte R., Gonzalez-Duarte P., Capdevila M., Atrian S. (2001). *A new insight into metallothionein MT classification and evolution. The in vivo and in vitro metal binding features of Homarus americanus recombinant*. *J. Biol. Chem.* 276: 32385-32843.
- Valls M., Bofill R., Romero-Isart N., Gonzalez-Duarte R., Abian J., Carrascal M., Gonzalez-Duarte P., Capdevila M., Atrian S. (2000). *Drosophila MTN: a metazoan copper-thionein related to fungal forms*. *FEBS Lett.* 467:189-194.
- van Holde K.E., Miller K.I. (1995). *Hemocyanins*. *Adv. Protein. Chem.* 47:1-81.

- van Lookeren Campagne M., Thibodeaux H., van Bruggen N., Cairns B., Gerlai R., Palmer J.T., Williams S.P., Lowe D.G. (1999). *Evidence for a protective role of metallothionein-1 in focal cerebral ischemia*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 96:12870-5.
- Vasak M. (1991). *Metal removal and substitution in vertebrate and invertebrate metallothioneins*. Methods Enzymol. 205:452-8.
- Vasak M., Hasler D.W. (2000). *Metallothioneins: new functional and structural insights*. Curr. Opin. Chem. Biol. 4:177-183.
- Vergani L., Grattarola M., Dondero F., Viarengo A. (2003). *Expression, purification, and characterization of metallothionein-A from rainbow trout*. Protein Expr. Purif. 27:338-45.
- Viarengo A., Burlando B., Cavaletto M., Marchi B., Ponzano E., Blasco J. (1999). *Role of metallothionein against oxidative stress in the mussel Mytilus galloprovincialis*. Am. J. Physiol. 277:R1612-9.
- Wang G.W., Zhou Z., Klein J.B., Kang Y.J. (2001). *Inhibition of hypoxia/reoxygenation-induced apoptosis in metallothionein-overexpressing cardiomyocytes*. Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. 280:H2292-9.
- Weisiger R.A., Fridovich I. (1973). *Superoxide dismutase. Organelle specificity*. J. Biol. Chem. 248:3582-92.
- Wenzel H.J., Cole T.B., Born D.E., Schwartzkroin P.A., Palmiter R.D. (1997). *Ultrastructural localization of zinc transporter-3 (ZnT-3) to synaptic vesicle membranes within mossy fiber boutons in the hippocampus of mouse and monkey*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 94:12676-81.
- West A.K., Stallings R., Hildebrand C.E., Chiu R., Karin M., Richards R.I. (1990). *Human metallothionein genes: structure of the functional locus at 16q13*. Genomics 8:513-18.
- Winge D.R., Nielson K.B., Gray W.R., Hamer D.H. (1985). *Yeast metallothionein. Sequence and metal-binding properties*. J. Biol. Chem. 260:14464-70.
- Wolf C.M., Eastman A. (1999). *The temporal relationship between protein phosphatase, mitochondrial cytochrome c release, and caspase activation in apoptosis*. Exp. Cell. Res. 247:505-13.
- Wong K.L., Klaassen C.D. (1979). *Isolation and characterization of metallothionein which is highly concentrated in newborn rat liver*. J. Biol. Chem. 254:12399-403.
- Woo E.S., Dellapiazza D., Wang A.S., Lazo J.S. (2000). *Energy-dependent nuclear binding dictates metallothionein localization*. J. Cell. Physiol. 182:69-76.
- Wood J.P., Osborne N.N. (2001). *The influence of zinc on caspase-3 and DNA breakdown in cultured human retinal pigment epithelial cells*. Arch. Ophthalmol. 119:81-8.
- Wood Z.A., Schroder E., Robin Harris J., Poole L.B. (2003). *Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins*. Trends Biochem. Sci. 28:32-40.
- Wudarczyk J., Debska G., Lenartowicz E. (1999). *Zinc as an inducer of the membrane permeability transition in rat liver mitochondria*. Arch. Biochem. Biophys. 363:1-8.
- Xiong Y., Ru B. (1997). *Purification and characteristics of recombinant mouse metallothionein-I from Escherichia coli*. J. Biochem. (Tokyo). 121:1102-6.

- Xu X., Decker W., Sampson M.J., Craigen W.J., Colombini M. (1999). *Mouse VDAC isoforms expressed in yeast: channel properties and their roles in mitochondrial outer membrane permeability*. J. Membr. Biol. 170:89-102.
- Yamasaki F., Kurasaki M., Oikawa S., Emoto T., Okabe M., Kojima Y. (1997). *Effects of amino acid replacements on cadmium binding of metallothionein alpha-fragment*. Cell. Mol. Life Sci. 53:459-65.
- Ye B., Maret W., Vallee B.L. (2001). *Zinc metallothionein imported into liver mitochondria modulates respiration*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98:2317-22.
- You C., Mackay E.A., Gehrig P.M., Hunziker P.E., Kagi J.H. (1999). *Purification and characterization of recombinant Caenorhabditis elegans metallothionein*. Arch. Biochem. Biophys. 372:44-52.
- Young J.K., Garvey J.S., Huang P.C. (1991). *Glial immunoreactivity for metallothionein in the rat brain*. Glia 4:602-10.
- Yu X., Wojciechowski M., Fenselau C. (1993). *Assessment of metals in reconstituted metallothioneins by electrospray mass spectrometry*. Anal. Chem. 65:1355-9.
- Yu X., Wu Z., Fenselau C. (1995). *Covalent sequestration of melphalan by metallothionein and selective alkylation of cysteines*. Biochemistry. 34:3377-85.
- Zaia J., Jiang L., Han M.S., Tabb J.R., Wu Z., Fabris D., Fenselau C. (1996). *A binding site for chlorambucil on metallothionein*. Biochemistry. 35:2830-5.
- Zalman L.S., Nikaido H., Kagawa Y. (1980). *Mitochondrial outer membrane contains a protein producing nonspecific diffusion channels*. J. Biol. Chem. 255:1771-4.
- Zangger K., Oz G., Haslinger E., Kunert O., Armitage I.M. (2001a). *Nitric oxide selectively releases metals from the amino-terminal domain of metallothioneins: potential role at inflammatory sites*. FASEB J. 15:1303-5.
- Zangger K., Oz G., Otvos J.D., Armitage I.M. (1999). *Three-dimensional solution structure of mouse [Cd7]-metallothionein-1 by homonuclear and heteronuclear NMR spectroscopy*. Protein Sci. 8:2630-38.
- Zangger K., Shen G., Oz G., Otvos J.D., Armitage I.M. (2001b). *Oxidative dimerization in metallothionein is a result of intermolecular disulphide bonds between cysteines in the alpha-domain*. Biochem. J. 359:353-60.
- Zeng J. (1991). *Lysine modification of metallothionein by carbamylation and guanidination*. Methods Enzymol. 205:433-7.
- Zhainazarov A.B., Doolin R., Herlihy J.D., Ache B.W. (2001). *Odor-stimulated phosphatidylinositol 3-kinase in lobster olfactory receptor cells*. J. Neurophysiol. 85:2537-44.
- Zhang L., Yu L., Yu C.A. (1998). *Generation of superoxide anion by succinate-cytochrome c reductase from bovine heart mitochondria*. J. Biol. Chem. 273:33972-6.
- Zhou Z., Kang Y.J. (2000). *Immunocytochemical localization of metallothionein and its relation to doxorubicin toxicity in transgenic mouse heart*. Am. J. Pathol. 156:1653-62.

- Zhu Z., De Rose E.F., Mullen G.P., Petering D.H., Shaw C.F. (1994). *Sequential proton resonance assignments and metal cluster topology of lobster metallothionein-1*. *Biochemistry*. 33:8858-8865.
- Zoratti M., Szabo I. (1995). *The mitochondrial permeability transition*. *Biochim. Biophys. Acta*. 1241:139-76.