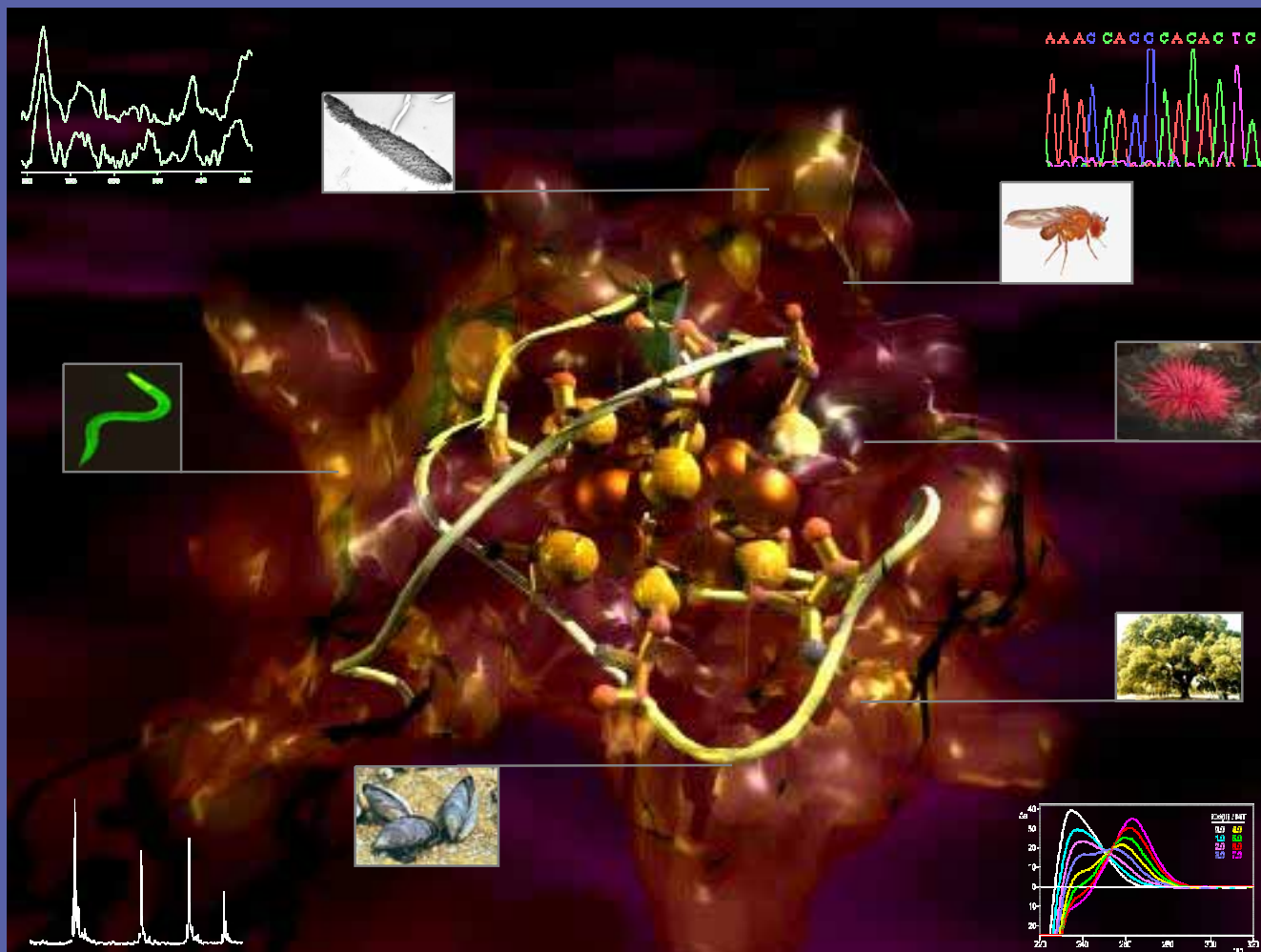


Estudi de la relació estructura/funció en Metal·lotioneïnes d'Invertebrats, Protozous i Plantes



Jordi Domènech Casal

TESI DOCTORAL

Realitzada al Departament de Genètica de la Facultat de
Biologia de la Universitat de Barcelona, sota la direcció de la
Dra. Silvia Atrian i la Dra. Mercè Capdevila
i defensada l'11 de gener de 2007.

Donada l'estructuració d'aquesta tesi com a compendi de publicacions, la introducció que es presenta a continuació té un caràcter general, reservant-se per a cada capítol concret els coneixements més específics.

1- METAL·LOTIONEÏNES: DESCRIPCIÓ GENERAL

El 1957, els investigadors Margoshes i Vallee injectaren cadmi en cavalls i n'analitzaren els extractes de còrtex de ronyó, descobrint una nova proteïna que es caracteritzava per tenir un baix pes molecular, contenir cadmi i sofre, i per l'absència d'aminoàcids aromàtics (Fig. 1). Aquest fou només el primer membre d'una llarga llista de proteïnes que es coneixen genèricament com a Metal·lotioneïnes (MT).

A CADMIUM PROTEIN FROM
EQUINE KIDNEY CORTEX

Sir:
Cadmium never has been demonstrated to be an integral part of a natural product although present in various species.^{1,2,3} Physiological function has not been shown.
Colorimetric analyses⁴ of human, horse, cow, hog, and sheep kidney for cadmium led to the choice of horse kidney cortex for fractionation.

T.A.
EMISSION SPECTROGRAPHIC AND COLORIMETRIC

Cadmium determined by spectrography⁵ and by colorimetry measured by dry weight of material precipitated by trichloroacetic acid as $\mu\text{g.}/\text{g.}$ protein for the fractions.

	Cortex	Fraction I	Fraction II
Preparation B: colorimetric cadmium	82.7	1180	301
Preparation C: colorimetric cadmium	83.7	774	344
Spectrographic cadmium	137	687	263
Spectrographic zinc	91	340	144
Other metals (spectrographic) ⁶	829	241	228

* Protein concentration too small to measure by trichloroacetic acid. † Contamination with Mg and Ca introduced with Na, K, Cu not determined.

Fractionation of horse kidney cortex with ethanol and ammonium sulfate gave a product containing 20 to 25 milligrams of cadmium per gram dry weight of trichloroacetic acid precipitable material in successive fractionations. Ultracentrifugation⁷ in a synthetic boundary cell showed the final products of four successive fractionations to be monodisperse with a sedimentation constant (uncorrected for viscosity and diffusion) varying from 0.94 to 1.22×10^{-13} . Paper electrophoresis at pH 8.5 of

(1) D. P. Margoshes, *Compt. rend. Acad. Sci. U.S.S.R.*, **31**, 145 (1957).

Fig. 1.-Amb el títol "A Cadmium Protein from equine kidney cortex", el 1957 es publicaren les primeres dades d'una MT (Margoshes & Vallee, 1957).

Les MT constitueixen una superfamília de proteïnes representada molt àmpliament en els organismes vius, tant en organismes unicel·lulars (cianobacteris, llevats, i protozous) com en metazous (vertebrats, invertebrats i plantes). Presenten homologia dins de subgrups taxonòmics concrets (p.ex. dins del gènere *Tetrahymena*, dins del grup dels vertebrats o el gènere *Drosophila*) però no a nivell general.

La seva presència tan generalitzada i la seva capacitat d'unió a metalls han suscitat un gran interès, tant per la incògnita de la seva funció i la peculiaritat de la seva estructura, com per la possible aplicació biotecnològica que se'n deriva.

Les característiques generals de les MT són: **Mida.** Tenen un baix pes molecular, entre els 2,5 i 16 kDa, que suposa aproximadament entre uns 25 i 160 aminoàcids, tot i que la majoria de les MT conegudes tenen al voltant de 6 kDa.

Composició. Tenen un alt contingut de cisteïnes, que representen un terç del total d'aminoàcids, i també de serines i glicines. Presenten rarament aminoàcids aromàtics (Phe, Tyr, Trp) en la seva seqüència. Les cisteïnes estan distribuïdes al llarg de la seqüència i formen motius cisteïnics característics Cys-Cys, Cys-X-Cys, Cys-Cys-Cys, entre d'altres (essent X un aminoàcid qualsevol).

Expressió. La seva síntesi s'indueix per exposició a metalls pesants (Zn, Cu, Cd, Hg, Ag,...) i situacions d'estrès i/o els seus intermediaris. Les MT es troben principalment a citosol, però en determinades situacions, també a nucli.

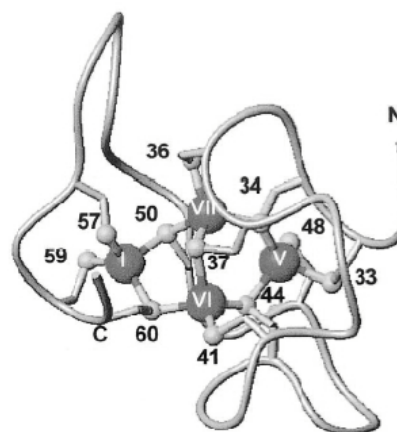


Fig. 2- Cluster metal-tiolat que forma un domini de la MT2 de mamífer amb Cd. S'aprecien les Cys (numerades en el gràfic) coordinant els ions metàl·lics, (en xifres romanes en el gràfic). Imatge modificada de Blindauer et al., 2001.

Propietats funcionals. Són capaces d'unir metalls pesants, ja siguin tòxics (Cd, Hg, Pb, Ag, Pt,...) com fisiològics (Zn o Cu), a

través dels grups tiol de les cisteïnes, formant *clusters* metall-tiolat (Fig. 2).

Propietats estructurals. Adquireixen la seva estructura mitjançant la formació d'enllaços entre els residus de cisteïna i els metalls. Tenen comportaments químics i espectroscòpics propis dels agregats metall-tiolat, i perden la unió a metalls a pH àcid i en condicions oxidants.

2- LA COORDINACIÓ METÀL·LICA I LES METAL·LOPROTEÏNES

2.1- Els metalls pesants

Es coneixen com a metalls pesants un grup d'elements que tenen en comú la seva elevada massa atòmica i la seva toxicitat, i que inclou elements amb característiques químiques diverses. N'existeixen diferents definicions, la més àmplia de les quals és la de Hawkes, que el 1997 els definí com aquells elements situats entre els grups 3 i 16 i a partir del període quart de la taula periòdica, tal com es presenta a la Fig. 3.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120	121	122	123	124	125	126	127	128	129	130	131	132	133	134	135	136	137	138	139	140	141	142	143	144	145	146	147	148	149	150	151	152	153	154	155	156	157	158	159	160	161	162	163	164	165	166	167	168	169	170	171	172	173	174	175	176	177	178	179	180	181	182	183	184	185	186	187	188	189	190	191	192	193	194	195	196	197	198	199	200	201	202	203	204	205	206	207	208	209	210	211	212	213	214	215	216	217	218	219	220	221	222	223	224	225	226	227	228	229	230	231	232	233	234	235	236	237	238	239	240	241	242	243	244	245	246	247	248	249	250	251	252	253	254	255	256	257	258	259	260	261	262	263	264	265	266	267	268	269	270	271	272	273	274	275	276	277	278	279	280	281	282	283	284	285	286	287	288	289	290	291	292	293	294	295	296	297	298	299	300	301	302	303	304	305	306	307	308	309	310	311	312	313	314	315	316	317	318	319	320	321	322	323	324	325	326	327	328	329	330	331	332	333	334	335	336	337	338	339	340	341	342	343	344	345	346	347	348	349	350	351	352	353	354	355	356	357	358	359	360	361	362	363	364	365	366	367	368	369	370	371	372	373	374	375	376	377	378	379	380	381	382	383	384	385	386	387	388	389	390	391	392	393	394	395	396	397	398	399	400	401	402	403	404	405	406	407	408	409	410	411	412	413	414	415	416	417	418	419	420	421	422	423	424	425	426	427	428	429	430	431	432	433	434	435	436	437	438	439	440	441	442	443	444	445	446	447	448	449	450	451	452	453	454	455	456	457	458	459	460	461	462	463	464	465	466	467	468	469	470	471	472	473	474	475	476	477	478	479	480	481	482	483	484	485	486	487	488	489	490	491	492	493	494	495	496	497	498	499	500	501	502	503	504	505	506	507	508	509	510	511	512	513	514	515	516	517	518	519	520	521	522	523	524	525	526	527	528	529	530	531	532	533	534	535	536	537	538	539	540	541	542	543	544	545	546	547	548	549	550	551	552	553	554	555	556	557	558	559	560	561	562	563	564	565	566	567	568	569	570	571	572	573	574	575	576	577	578	579	580	581	582	583	584	585	586	587	588	589	590	591	592	593	594	595	596	597	598	599	600	601	602	603	604	605	606	607	608	609	610	611	612	613	614	615	616	617	618	619	620	621	622	623	624	625	626	627	628	629	630	631	632	633	634	635	636	637	638	639	640	641	642	643	644	645	646	647	648	649	650	651	652	653	654	655	656	657	658	659	660	661	662	663	664	665	666	667	668	669	670	671	672	673	674	675	676	677	678	679	680	681	682	683	684	685	686	687	688	689	690	691	692	693	694	695	696	697	698	699	700	701	702	703	704	705	706	707	708	709	710	711	712	713	714	715	716	717	718	719	720	721	722	723	724	725	726	727	728	729	730	731	732	733	734	735	736	737	738	739	740	741	742	743	744	745	746	747	748	749	750	751	752	753	754	755	756	757	758	759	760	761	762	763	764	765	766	767	768	769	770	771	772	773	774	775	776	777	778	779	780	781	782	783	784	785	786	787	788	789	790	791	792	793	794	795	796	797	798	799	800	801	802	803	804	805	806	807	808	809	810	811	812	813	814	815	816	817	818	819	820	821	822	823	824	825	826	827	828	829	830	831	832	833	834	835	836	837	838	839	840	841	842	843	844	845	846	847	848	849	850	851	852	853	854	855	856	857	858	859	860	861	862	863	864	865	866	867	868	869	870	871	872	873	874	875	876	877	878	879	880	881	882	883	884	885	886	887	888	889	890	891	892	893	894	895	896	897	898	899	900	901	902	903	904	905	906	907	908	909	910	911	912	913	914	915	916	917	918	919	920	921	922	923	924	925	926	927	928	929	930	931	932	933	934	935	936	937	938	939	940	941	942	943	944	945	946	947	948	949	950	951	952	953	954	955	956	957	958	959	960	961	962	963	964	965	966	967	968	969	970	971	972	973	974	975	976	977	978	979	980	981	982	983	984	985	986	987	988	989	990	991	992	993	994	995	996	997	998	999	1000
---	---	---	---	---	---	---	---	---	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	------

Fig. 3- Enmarcats amb un requadre negre, els metalls pesants segons Hawkes.

La majoria d'aquests elements pertanyen al bloc *d*, és a dir, aquells que en algun dels seus estats d'oxidació habituals tenen els orbitals *d* semiplens. Les seves propietats tòxiques depenen del metall pesant que es consideri, de la seva forma química i concentració, i es deuen principalment al fet que tenen una elevada afinitat per enllaçar-se a macromolècules biològiques, interferint amb enzims que usen metalls com a cofactors, alterant la membrana lipídica o interaccionant directament amb el DNA (Madden, 2003, Garza *et al.*, 2006).

Pel que fa a l'estudi de la interacció entre metal·lotioneïnes i metalls pesants, destaquen per la seva abundància els estudis sobre agregats Zn-, Cu- i Cd-MT. El Zn i el Cu són metalls fisiològics. En canvi, el Cd és un metall xenobiòtic, i la seva presència en l'organisme s'associa a intoxicació. En aquest apartat es fa una breu síntesi de les propietats químiques del Zn, el Cu i el Cd, que són els metalls amb què s'ha treballat en aquesta tesi. El Cu és un metall de transició, i com a tal dóna lloc a compostos de coordinació o complexes. En les seves formes iòniques, el Cu pot presentar dos estats d'oxidació: l'estat divalent +2 o l'estat monovalent +1, que s'escriuen, respectivament, Cu(II) i Cu(I). El Cu(I) pot oxidar-se i passar a Cu(II) i aquest es pot reduir a Cu(I). Aquesta capacitat de transformació *redox* del Cu li confereix una gran capacitat catalítica, cosa que fa que sigui present en molts enzims que catalitzen reaccions *redox*. Un exemple en seria la Citocrom C oxidasa, en què el Cu juga un paper clau en la cadena respiratòria (Belevich *et al.*, 2006). En les MT, el Cu es troba coordinat com a Cu(I), en la forma monovalent, i pot adoptar diverses geometries de coordinació, digonal, trigonal, o fins i tot tetraèdrica (Christianson, 1991; Kulkarni *et al.*, 2006). En canvi, tant el Zn com el Cd són metalls pesants que habitualment presenten un únic estat d'oxidació divalent +2, (Zn(II) i Cd(II)), i solen presentar geometries de coordinació tetraèdriques (Christianson, 1991, Sarkar *et al.*, 2005). La semblança entre el Zn i el Cd fa que en molts estudis de les propietats estructurals d'agregats biològics, el Cd(II) sigui usat com a model del Zn(II), donades les seves propietats magnètiques molt útils en tècniques bàsiques de determinació estructural, com l'NMR.

2.2- La coordinació metal·lica en proteïnes

Els metalls són elements determinants en l'estructura i funció de moltes proteïnes. Segons una revisió recent (Kulkarni *et al.*, 2006), una de cada tres proteïnes de què es coneix l'estructura conté metall com a cofactor. Aquesta proporció inclou més de

700 proteïnes amb Zn i prop de 170 proteïnes amb Cu (Degtyarenko, 2000). La coordinació metàl·lica implica la unió d'un ió metàl·lic (normalment amb càrrega positiva) amb un lligand (neutre o carregat negativament), per formar un compost de coordinació (que pot ser neutre o carregat). El lligand, per poder coordinar ions metàl·lics ha d'ésser una base de Lewis, és a dir, disposar d'un parell d'electrons lliures que pot compartir amb el metall. Les proteïnes poden coordinar els metalls a través de diversos lligands. Depenent d'aquests i del metall que s'enllaci, queden determinades les propietats del corresponent *cluster* metàl·lic. En funció del seu origen, els lligands es poden classificar com a lligands endògens (que formen part de la cadena polipeptídica) o lligands exògens (que no en formen part) (Degtyarenko, 2000).

Lligands endògens i MT

Els aminoàcids contenen grups capaços de coordinar metalls. Entre els lligands endògens més habituals en les proteïnes hi trobem el grup tiolat de la cisteïna, el grup carboxilat de l'aspartat i el glutamat, i el grup imidazol de la histidina. Altres grups menys freqüents són el grup tioèter de la metionina, els grups amida i carbonil de l'enllaç peptídic, el grup hidroxil de la serina i la treonina, el grup amino de la lisina, el grup fenol de la tirosina, el grup selenol de la selenocisteïna i els grups amino- i carboxi- terminals dels extrems del pèptid (Degtyarenko, 2000, Auld, 2001). Mentre els metalls durs (Fe, Cr, Vn) prefereixen donants durs (del tipus del carboxilat), els metalls tous (Zn, Cu, Cd) prefereixen donants tous (del tipus del tiolat, tioèter, imidazol) (Belle *et al.*, 2005). Malgrat que aminoàcids com l'aspartat, el glutamat, l'asparagina o la tirosina participen en la coordinació metàl·lica en altres proteïnes, en les MT aquests aminoàcids jugarien només papers menors en l'estabilització dels agregats, ja que pel que fa als lligands endògens, la coordinació metàl·lica en les MT és duta a terme principalment per la cisteïna i, en algun cas,

també la histidina (Pande *et al.*, 1985). Tot seguit, es comenten amb més profunditat les propietats d'aquests dos lligands.

La cisteïna coordina a través del grup tiol

Els grups tiol (R-SH) de les cisteïnes (Cys), que poden desprotonar-se (R-S⁻) i donar lloc a grups tiolat capaços de coordinar-se a centres metàl·lics (Fig. 4A). La unió de Cys amb més d'un ió metàl·lic pot generar *clusters* metall-tiolat d'estructures diverses, dependent de la disposició de les Cys al llarg de la cadena peptídica, i en els quals cada centre metàl·lic pot presentar geometries de coordinació variables dependent de la naturalesa del metall. Les cisteïnes contribueixen també a la reactivitat de les MT davant els agents electrofílics (oxidants) - ja que l'oxidació de la cisteïna (R-SH) a cistina (R-S-S-R) pot resultar en l'alliberament del metall- i en la unió a metalls proporcionen una elevada estabilitat termodinàmica combinada amb una labilitat a nivell cinètic. És a dir, agregats proteïna-metall molt estables però també molt aptes per a l'intercanvi de metalls (Maret, 2004). La substitució metàl·lica segueix en les MT l'ordre característic d'afinitat metàl·lica dels grups tiol: $Hg^{2+} > Ag^{1+} = Cu^{1+} > Cd^{2+} > Zn^{2+}$, de manera que partint d'una Zn-MT es poden obtenir els agregats amb qualsevol dels altres metalls, per substitució.

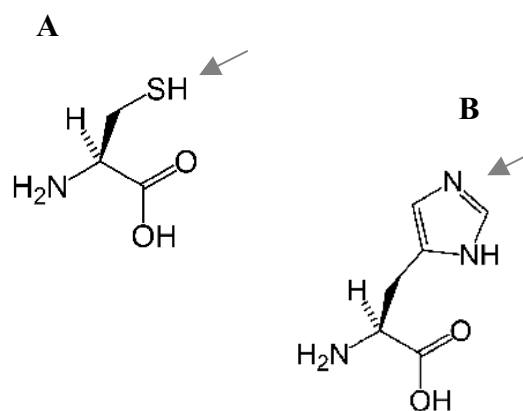


Fig. 4- Esquema de la Cys (A) i la His (B). Marcats amb fletxes grises, el lloc d'unió al metall

El radical tiol oxidat esdevé un radical *tiyl*, que té un estat d'oxidació intermedi entre el del sofre del grup tiol i el del pont di-sulfur (Ferrerri *et al.*, 2005) i al que s'ha atribuït un paper *redox* important (Giles *et al.*, 2001). Algunes dades indiquen que podrien també existir radicals *tiyl* permanents en MT que tindrien una facilitat especial per a acollir-ne la formació (Sievers *et al.*, 1996). En la majoria de casos, però, quan la cisteïna s'oxida ho fa completament, generant grups disulfur.

La histidina, la gran desconeguda en les MT

La histidina (His) és un aminoàcid amb un grup imidazòlic a la seva cadena lateral susceptible de coordinar metalls (Fig. 4B). El recent descobriment d'una nova família de proteïnes (les polihistines) que coordinen metalls exclusivament a través d'histidines (Gupta *et al.*, 2002) és un exemple del gran potencial de coordinació metàl·lica que té també aquest aminoàcid, present en altres proteïnes riques en cisteïnes relacionades amb la coordinació metàl·lica, com és el cas de la proteïna CRP1, de *E.bucholzi* (Willuhn *et al.*, 1994). Tot i que les MT es descrigueren inicialment com a proteïnes mancades de residus His, **aquest aminoàcid és present en diverses MT** (per exemple, les MT CUP1 i CRC5 del llevat *S.cerevisiae*, CeMT2 i CeMT2 de *C.elegans* i MT de l'au *G.gallus*, la planta *M.grisea* i el bacteri *Synechococcus*).

La seva participació en la formació de *clusters* metall-MT ha estat corroborada només en el cas de les MT SmtA i SmtB, de *Synechococcus* (Blindauer *et al.*, 2001) (Fig. 5) i proposada per a les MT del fong *M.grisea* (Tucker *et al.*, 2004) i la MT de *G.gallus* (Villarreal *et al.*, 2006). Estudis amb formes mutades de MT de mamífer han demostrat que la His pot suplir el paper de la Cys en la coordinació metàl·lica (Romero-Isart *et al.*, 1999). En tot cas, malgrat que les cisteïnes juguen indubtablement un paper essencial en la determinació de les propietats dels agregats metall-MT, s'ha demostrat que **els aminoàcids no cisteïnics poden arribar a determinar la seva afinitat pels metalls i les preferències coordinants**. Aquest fet

s'ha pogut observar en comparar MT1, MT2 i MT4 de mamífer i les MT de *H.pomatia* entre elles (Winge & Miklossy, 1982; Dallinger *et al.*, 1997; Tio *et al.*, 2004), que mostren especificitats metàl·liques diferents malgrat presentar un patró de cisteïnes idèntic.

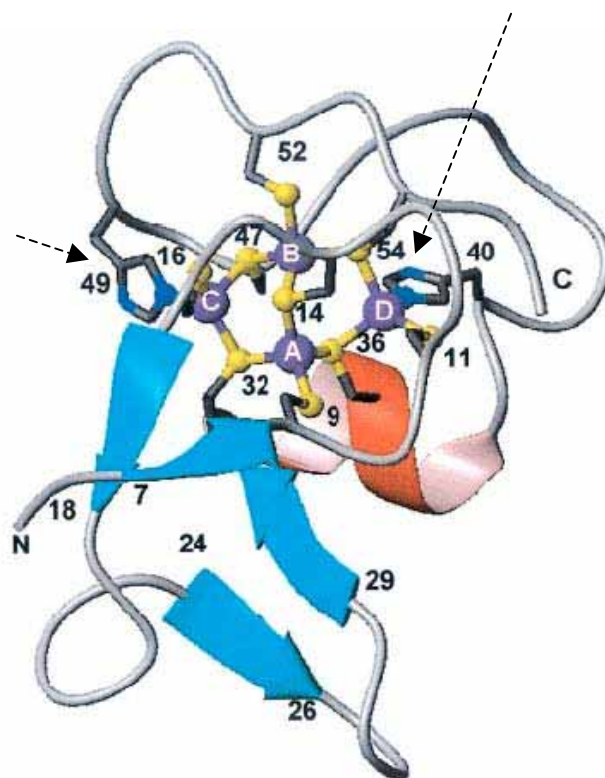


Fig. 5.-Estructura de SmtA, del cianobacteri *Synechococcus*. Els 4 ions Zn^{2+} (A, B, C, D) són coordinats per residus de Cys (en groc a la figura) i residus d'His (identificats per fletxes a la figura). Imatge modificada de (Blindauer *et al.*, 2001).

Lligands exògens i MT

Ions inorgànics poden formar part dels complexos metall-MT tot completant l'esfera de coordinació dels metalls. Entre els lligands exògens més habituals en les proteïnes hi trobem aigua, clorur, cianur, oxigen, amoni, sulfit i sulfur (Degtyarenko, 2000).

La participació d'ions sulfur ha estat demostrada en els agregats metàl·lics d'uns pèptids estretament relacionats amb les MT, les *fitoquelatines* (PC). Les PC són pèptids de síntesi enzimàtica formats per unitats de γ -glutamil-cisteïna que coordinen metalls mitjançant Cys i sulfurs, formant unes estructures en les que el

recobriment proteic embolcalla un microcristall d'un sulfur metàl·lic, i que s'anomenen *crystallites* (Winge *et al.*, 1992) (Fig. 6).

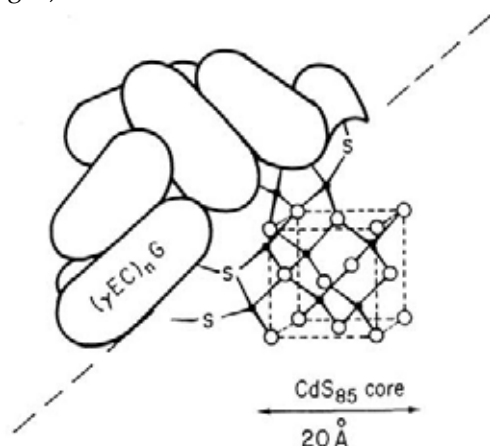


Fig. 6-Les PC contenen estructures metall-sulfur anomenades *crystallites* formades per exemple per xarxes de CdS unides a les PC mitjançant enllaços Cd-Cys. Imatge extreta de (Winge *et al.*, 1992).

Les PC tenen característiques funcionals i estructurals similars a les MT, i per això la possible presència d'ions sulfur en les MT ha estat un dels temes d'estudi en aquesta tesi.

2.3- Propietats funcionals dels agregats metàl·lics

Com hem dit, les propietats estructurals i *redox* de cada agregat metàl·lic depenen de les característiques químiques del metall, i al mateix temps, dels diferents entorns de coordinació que adopti aquest en cada complex (Maret, 2005). S'observa, per exemple, que els *clusters* metàl·lics amb entorns que contenen histidina i lligands exògens inorgànics amb aigua, nitrogen, o oxigen com a àtoms donadors, solen conformar dominis catalítics, mentre que els *clusters* formats exclusivament per entorns amb cisteïnes s'associen a dominis estructurals (Vallee & Auld, 1990; Auld, 2001) (Fig. 7). La cisteïna pot donar lloc també a *clusters* amb papers relacionats amb reactivitat *redox* (Maret, 2005), o combinada amb histidina- formar estructures del tipus "dits de Zn" (Vallee & Auld, 1990; Auld, 2001).

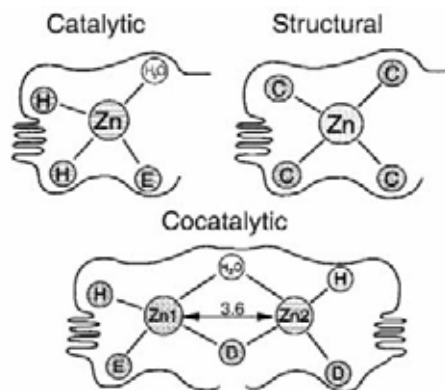


Fig. 7-Les propietats dels agregats depenen també de la distribució i el tipus de lligands. Imatge extreta de (Auld, 2001).

3- ESTRUCTURA I CLASSIFICACIÓ DE LES METAL·LOTIONEÏNES

Les MT estan distribuïdes molt àmpliament entre els éssers vius, i presenten una gran diversitat de comportaments d'unió a metalls, seqüències i estructura. Com hem dit, presenten homologia exclusivament entre els membres d'un mateix grup taxonòmic, però no de forma general. Per això, s'han usat diversos criteris per a classificar-les i ordenar-ne el seu estudi.

3.1- Estructura primària

Una classificació inicial basada en l'homologia amb la MT de cavall

La primera MT estudiada fou la de cavall, però de seguida es començaren a caracteritzar MT d'altres mamífers, que resultaren tenir una semblança molt gran entre elles, fet que portà a parlar genèricament de *MT de mamífer*. Els estudis posteriors començaren a identificar, en altres organismes, MT que mostraven graus de semblança molt menors. A partir d'aquestes primeres observacions es proposà una classificació d'aquestes proteïnes segons la seva estructura primària, en funció de la semblança que presentaven amb la MT de cavall (Fowler *et al.*, 1987), que establia tres classes:

Classe I: Inclou les MT d'entre 59 i 63 aminoàcids (dels quals 20 són cisteïnes) les seqüències proteïques de les quals s'alineen

perfectament amb la de MT de cavall. Quan coordinen metalls divalents, s'estructuren en dos dominis i en general no presenten aminoàcids aromàtics. Formen part d'aquesta classe les MT de vertebrats, mol·luscs i crustacis.

Classe II: Inclou les MT que no s'alineen amb les MT de cavall. Tenen mides i continguts de cisteïna variables, i poden presentar aminoàcids aromàtics en petites proporcions. Formen part d'aquesta classe les MT d'insecte, nemàtodes, ciliats, fongs, plantes i cianobacteris.

Classe III: Inclou les fitoquelatines (PC) i cadistines, que són sintetitzats enzimàticament mitjançant la polimerització d'unitats de γ -glutamil-cisteïna, i que responen a la fórmula $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{Gly}$. Aquests pèptids han estat descrits en plantes i fongs, tot i que darrerament s'ha hipotetitzat la seva presència també en metazous, protozous, llevats i cianobacteris, ja que s'hi ha identificat l'enzim responsable de la seva síntesi (PC-sintasa) (Cobbett & Goldsbrough, 2002; Clemens, 2006). No són doncs pròpiament MT, però en comparteixen moltes de les característiques funcionals.

Cal remarcar que aquesta classificació no dona una visió general de les MT, ja que agrupa en la Classe II una sèrie de proteïnes que no tenen cap relació entre elles, ni estructural ni evolutiva. Es pot considerar una classificació desfasada, però és encara usada en alguns casos i per això hem considerat important de citar-la aquí. Malauradament, encara avui, en moltes publicacions, per a definir les MT de forma genèrica s'usen inadequadament les característiques que són exclusives de la Classe I.

La taxonomia i l'estructura: una segona classificació

En les MT, les cisteïnes estan distribuïdes en patrons $\text{Cys-X}^n\text{-Y}^m\text{-Cys}$ (essent X i Y aminoàcids qualsevol i n i m valors entre 0 i 1), essent en general molt freqüent la disposició Cys-X-Cys , que, curiosament, és

la menys habitual en la resta de proteïnes (Miseta & Csutora, 2000).

La incorporació de criteris taxonòmics i la identificació de patrons de seqüència cisteïnics resultà en una nova classificació de les MT més detallada proposada per Binz i Kägi (2001), que divideix les MT en 15 famílies principals (Taula 1).

Les famílies 1 (vertebrats), 3 (crustacis) i 4 (equinoderms) d'aquesta classificació presenten patrons de cisteïnes que s'han associat a uns dominis (dominis *alfa* i *beta*), que es diferencien entre ells principalment per la presència de doblets Cys-Cys, i que, com veurem més endavant, configuren estructures tridimensionals i comportaments coordinants diferenciats. El tipus i ordenació d'aquests dominis al llarg de la seqüència és diversa en les 3 famílies. Mentre en vertebrats es dona una disposició *beta-alfa*, en crustacis és *beta-beta*, i en equinoderms una estructura de tipus *alfa-beta* respecte el sentit N-terminal→C-terminal del pèptid. La família 2, o MT de mol·lusc, presenta similitud amb les MT de mamífer (raó per la qual estaven incloses en la Classe I), però la seva estructuració sembla ser molt més heterogènia. Les famílies de la 5 a la 14 queden restringides en molts casos a rangs taxonòmics molt baixos i presenten una elevada variabilitat entre elles.

La família 15 és constituïda per les MT de planta, que presenten dominis rics en cisteïna units entre si per dominis sense cisteïnes, que reben el nom d'*espaiador*. Aquest espaiador no té funció coneguda i la seva longitud ha servit com un dels criteris per establir una subclassificació dins d'aquesta família (Cobbett & Goldsbrough, 2002, Taula 1).

La classificació de Binz i Kägi, tot i ser una classificació amb uns criteris més sòlids que la primera, dona lloc a un nombre excessiu de grups, classes i subclasses que tampoc s'associen a criteris funcionals ni lligams evolutius.

10.-Fongs 3 <i>C. glabrata</i>	51	Aquesta família està formada per una sola MT, raó per la qual no consta cap patró. Forma un sol agregat metàl·lic de 16 Cys coordinant 10 Cu. <i>C. glabrata</i> MT2 MPEQVNCQYDCHCSNACENTCNCCAKPACACTNSASNECSCQTCKCQTCKC
11.-Fongs 4 <i>Y. lipolitica</i>	54-55	C-X-K-C-x-C-x(2)-C-K-C. Quatre isoformes que tenen en comú la presència d'un triplet Cys. Tenen His i Phe a N-term. <i>Y. lipolitica</i> MT3 MEFTTAMLGASLISTTSTQSKHNLVNNCCSSSTSESSMPASCACTKCGCKTCKC
12.-Fongs 5 <i>S. cerevisiae</i>	61	Sense patró associat. Formada exclusivament per la CUP1 de llevat. Forma agregats amb 8 Cu en un sol domini. Presència de His i Phe. <i>S. cerevisiae</i> CUP1 MFSELINFQNEGHECQCQCGSCKNNEQCQKSCSCTPGCNSDDKPCPGNKSEETKKSCCSGK
13.-Fongs 6 <i>S. cerevisiae</i>	69	Sense patró associat. Formada exclusivament per la CRS5 de llevat. Possiblement formi dos dominis. Presència de 2 His. <i>S. cerevisiae</i> CRS5 TVKICDCEGECCKDSCHCJGSTCLPSCSGGEKCKCDHSTGSPQCKSCGEKCKETTCTCEKSKCNCEKC
14.Procariotes <i>Synechococcus</i> sp <i>S. vulcanus</i>	53-56	K-C-A-C-x(2)-C-L-C. En aquest grup s'inclouen només les MT d'alguns cianobacteris. Tenen His i Tyr conservades, i s'estructuren en un sol domini que conté una hèlix <i>alfa</i> similar a la dels dits de Zn. Dimeritza per a obtenir la seva activitat biològica. <i>Synechococcus</i> sp SmtA MTTVTQMKCACPHCLCIVSLNDAIMVDGKPYCSEVCANGTCKENSGCGHAGCGCGSA
15.-Plantes		Les MT de planta presenten regions sense Cys en la seva seqüència, anomenades espaiador, o <i>spacer region</i> . Segons la disposició i característiques d'aquestes regions, s'han classificat en 5 subfamílies. No hi ha dades conclouents sobre la seva estructura 3D.
Plantes Tipus 1		C-X-C-X(3)-C-X-C-X(3)-C-X-C-X(3) -espaiador- C-X-C-X(3)- C-X-C-X(3)- C-X-C-X(3) . L'espaiador sol mesurar al voltant de 40 aminoàcids i presentar aminoàcids aromàtics com la Phe o la Tyr. Estudis de coordinació metàl·lica indiquen que l'espaiador podria ser processat post-traduccionament. N'existeix un subtipus (Brassicàcies) que tenen un espaiador més curt. La MT de l'alga <i>F. vesiculosus</i> es classifica provisionalment com a membre d'aquest subtipus. <i>Pisum sativum</i> MT MSGCGCGSSCNCGDSCCKNKRSSGLSYSEMETTETVILGVGPAKIQFEGAEMSAASEDGGCKCGDNCTCDPCNCK
Plantes Tipus 2		C-C-X(3)-C-X-C-X(3)-C-X-C-X(3)-C-X-C-X(3) -espaiador- C-X-C-X(3)- C-X-C-X(3)- C-X-C-X(3) . L'espaiador sol mesurar al voltant de 40 aminoàcids i presentar aminoàcids aromàtics com la Phe o la Tyr. Té una estructura primària similar al tipus 1, excepte un doblet Cys afegit a N-term. <i>L. esculentum</i> MT MSCCGGNCGCGSSCKCGNGCGGCKMYPDMSYTESSTTTETLVLGVGPEKTSFGAMEMGESPVAENGCKCGSDCKCNPCTCSK
Plantes Tipus 3		Un sol representant. Presenta espaiador llarg, al voltant de 40 aminoàcids. Només 4 Cys en el domini N-term, i un doblet Cys en el domini C-term. Presenta aminoàcids aromàtics a l'espaiador. <i>A. thaliana</i> MT3 MSSNCGSCDCADKTQCVKKGTSYTFDIVETQESYKEAMIMDVGAENNANCKCKCGSSCSCVNCTCCPN
Plantes Tipus 4 o Ec		C-x(4)-C-X-C-X(3)-C-X(5)-C-X-C-X(9,11)-HTTCGCGEHC-X-C-X(20)-CSCGAXCNCASC-X(3,5). Les MT d'aquest grup presenten la peculiaritat de tenir dos espaiadors enlloc d'un i l'absència d'aminoàcids aromàtics. <i>T. aestivum</i> MT MGCNDKCGCAVPCPGGTGCRCTARSDDAAAGEHTTCGCGEHCXCNPCACGREGTPSGRANRRANCSCGAACNCASCSTTA

Taula 1.- Classificació de les MT en funció de la seva estructura primària, segons Binz & Kägi, 2001. (<http://www.biochem.unizh.ch/mtpage/classif.html>). Es detallen alguns aspectes estructurals i funcionals de cada família. Els patrons de seqüència de les famílies 1, 3 i 4 estan compostos per unitats similars que es corresponen amb les estructures terciàries *alfa* i *beta* comentades en el text. La classificació interna de la família 15 en 4 tipus no és la original de Binz i Kägi i ha estat substituïda per una classificació més recent de Cobbet i Goldsbrough, 2002. Els aminoàcid aromàtics (Y,W,F) i les Cys i His apareixen marcats en les seqüències.

3.2- Estructura secundària

Molts autors afirmen de manera genèrica que les MT estan mancades d'elements d'estructura secundària (Zhu *et al.*, 1994; Cobine *et al.*, 2004; Bilecen *et al.*, 2005; Calderone *et al.*, 2005). No obstant això, estudis estructurals demostren que en algunes MT es poden trobar hèlixs 3^{10} , β -turns de tipus I i II, β -sheets i α -helixs, tot i que la presència d'aquests elements no es pot generalitzar al llarg de la taxonomia.

La formació d'elements d'estructura secundària podria ser un pas important per a la disposició correcta dels residus coordinants, i afavorir l'intercanvi de metalls, tot i que també s'ha proposat que podria existir un efecte plantilla dels metalls, de manera que la coordinació d'uns primers ions metàl·lics afavoriria la formació de les estructures secundàries, que al seu lloc afavoririen la coordinació global (Rigby & Stillman, 2004; Rigby *et al.*, 2006). En proteïnes que uneixen metalls, en general, les estructures secundàries estan conformades per espaiadors entre aminoàcids que uneixen metalls. Així, en MT, el patró de Cys, i, per tant la mida de l'espaiador entre Cys, condicionarien el tipus d'elements d'estructura secundària (Auld, 2001).

Els mamífers i equinoderms presenten MT amb hèlixs 3^{10} i β -turns tipus II però no α -helixs ni β -sheets

Les MT de mamífer i equinoderm estan constituïdes per dos dominis, anomenats *alfa* i *beta*. Estudis de NMR amb les MT de mamífer *O.cuniculus* MT2 (conill), *M.musculus* MT1 i MT3 (ratolí) i la MT de l'equinoderm *S.purpuratus* SpMTA coordinant metalls divalents (Zn(II), Cd(II)) demostraren que al domini *alfa* d'aquestes isoformes s'hi generen hèlixs del tipus 3^{10} (Wagner *et al.*, 1987; Riek *et al.*, 1999; Oz *et al.*, 2001), acompanyades en algun cas de *half-turns*. Al domini *beta*, tant en mamífers (*M.musculus*) com equinoderms (*S.purpuratus*), alguns autors hi han observat β -turns, principalment de tipus II (Pande *et al.*, 1986; Wagner *et al.*, 1987; Riek *et al.*, 1999). Les estructures tipus α -helix, β -

sheet i β -turns de tipus I es troben absents o poc representades en mamífers i equinoderms, i només en MT3 s'ha descrit l'exceptual presència d'un curt segment d' α -helix, que podria tenir importància funcional (Oz *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2006). En mamífers i equinoderms, doncs, de forma general es distribuïrien dos tipus d'estructures secundàries: hèlix 3^{10} en els dominis *alfa* i β -turns de tipus II en els dominis *beta*.

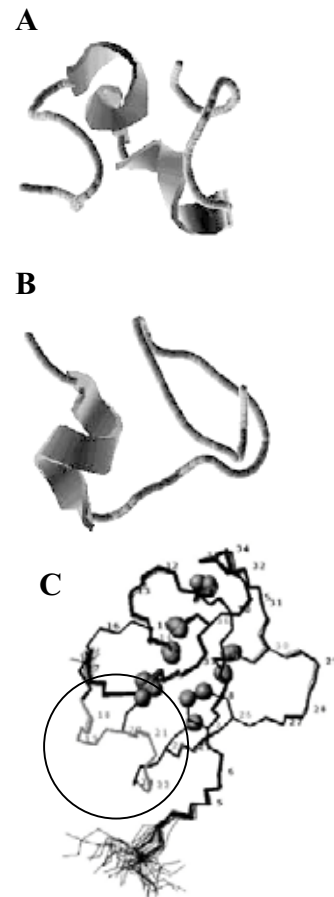


Fig. 8-A i B: Estructura 3D de la cadena peptídica en els dominis *alfa* (A) i *beta* (B) de la MT de peix *N.coriiceps*, tal i com es descriu a Scudeiro *et al.*, 2005. Se n'aprecien clarament les estructures secundàries. C: estructura 3D de la MT CUP1 de *S.cerevisiae.*, segons Bertini *et al.*, 2000. Encerclada, la zona amb estructura α -hèlix.

La resta d'organismes estudiats presenten almenys una α -helix i β -turns del tipus I

L' α -helix tan poc abundant en les MT de mamífers i equinoderms, és present en la resta de MT d'estructura coneguda. Se'n detecta en MT dels crustacis *H.americanus*

(llamàntol) (Muñoz *et al.*, 2002) i *C.sapidus* (Narula *et al.*, 1995) i el peix *N.coriiceps* (Scudiero *et al.*, 2005) quan formen agregats amb metalls divalents (Zn(II), Cd(II)) (Fig. 8). Les MT de peixos i crustacis presenten α -hèlixs i hèlixs 3^{10} , i sempre situades a l'extrem *C-term*. A l'extrem *N-term*, en canvi, solen presentar β -turns, majoritàriament de tipus I, que es poden presentar també en l'extrem *C-term*.

Pel que fa als llevats, tot i que s'ha proposat que la MT de *S.cerevisiae* CUP1 estaria mancada d'elements d'estructura secundària (Calderone *et al.*, 2005), s'ha descrit per NMR la presència de α -hèlix entre els aminoàcids 18-22 (Bertini *et al.*, 2000).

Cianobacteri: l'única MT amb β -sheet

Tot i que alguns autors afirmen que algunes MT de mamífer i planta podrien tenir β -sheets (Elgren & Wilcox, 1989; Zhu, 2000), els estudis d'estructura per NMR i raigs X només en confirmen la presència en el cas de les MT del bacteri *Synechococcus sp.* SmtA i SmtB presenten α -hèlixs i β -sheets, elements que tenen una gran importància funcional en aquesta MT (Cook *et al.*, 1998; Blindauer *et al.*, 2001).

3.3- Estructura terciària

Les MT adquireixen la seva estructura terciària com a conseqüència de la coordinació de metalls. Quan una MT es troba en forma lliure de metalls (forma apo), presenta una estructura 3D desordenada (*Random coil*), i és la coordinació metàl·lica i la formació de *clusters* metall-tiolat el que li proporciona una estructura terciària. Per tant, una mateixa MT pot presentar estructures 3D diferents en funció del metall que té unit. Actualment, les dades d'estructura terciària de què es disposa es limiten només a les MT d'alguns grups taxonòmics, i coordinant un metall determinat. L'elevada flexibilitat de les MT dificulta la determinació de la seva estructura tridimensional, tot i que aquesta sol romandre molt similar quan la MT coordina ions metàl·lics de volum molt

diferent, com el Zn(II) i el Cd(II) (estructures isomorfs).

Les Metal·lotioneïnes de vertebrat: un cas paradigmàtic

Els estudis realitzats amb MT2 (una de les quatre isoformes de mamífer) per difracció de raigs X de cristalls de Cd₅Zn₂-MT2 nativa i per NMR de Cd₇-MT2 reconstituïda mostraren que aquesta MT uneix 7 àtoms divalents repartits en dos dominis globulars independents (Furey *et al.*, 1987; Wagner *et al.*, 1987; Robbins *et al.*, 1991). El domini *alfa*, format pels aminoàcids 31 a 61 (corresponent a la meitat *C-term*), uneix 4 ions divalents, formant el *cluster* metàl·lic A. El domini *beta*, format pels aminoàcids 1 a 30 (corresponent a la meitat *N-term*), uneix 3 ions divalents formant el *cluster* metàl·lic B. Estructures equivalents s'obtingueren per a MT1 i MT3 de mamífer (Zangger *et al.*, 1999; Oz *et al.*, 2001) (Fig. 9). Una estructuració similar ha estat descrita per a la MT del peix *N.coriiceps*, estudiada per NMR (Capasso *et al.*, 2003).

No es disposa de dades estructurals pels agregats homonuclears de Cu si bé dades espectroscòpiques dutes a terme amb la MT1 de mamífer suggereixen que l'estructuració en dos dominis (que es manté mentre hi ha un ió Zn²⁺ enllaçat a la proteïna) es perd quan els darrers ions Zn²⁺ són substituïts per Cu (Bofill *et al.*, 2001). Donada la homologia que existeix entre les MT de vertebrats, s'assumeix que totes elles queden definides de forma general per l'existència de dos dominis globulars independents en disposició i tipus *beta-alfa*, que configuraran *clusters* metall-proteïna del tipus B i A, respectivament.

Tot i això, treball realitzats amb les MT de mamífer indicarien que existeix una lleugera interacció entre els dos dominis, que s'intercanviarien metalls (Otvos *et al.*, 1993) i no serien completament independents l'un de l'altre (Rhee *et al.*, 1990; Capdevila *et al.*, 1997).

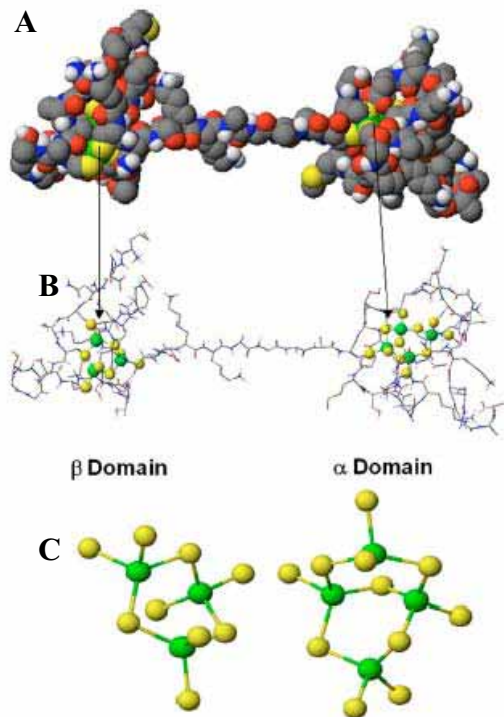


Fig. 9- La MT1 humana, estructurada en dos *clusters* de metalls divalents. A i B) Gràfic representant l'estructuració en dos dominis. C) Detalls dels dos *clusters* metàl·lics corresponents a cada domini. En verd, els ions Zn^{2+} ; en groc, els àtoms de S de les Cys. Imatge modificada de Rigby *et al.*, 2004.

Les Metal·lotioneïnes de crustaci i d'equinoderm: una proposta evolutiva?

Les dades obtingudes per NMR a partir de formes reconstituïdes amb Cd de les MT dels crustacis *H.americanus* (Zhu *et al.*, 1994; Muñoz *et al.*, 2002), *S.serrata* (Otvos *et al.*, 1982) i *C.sapidus* (Narula *et al.*, 1995), determinaren que aquestes MT s'estructuren també en dos dominis globulars quan coordinen ions divalents. Els dos dominis contenen 3 àtoms de Cd cadascun i s'estructuren en forma de *cluster* B. Donada l'elevada homologia de seqüència dins aquest grup, les MT de crustaci queden definides de forma general per l'existència de dos dominis globulars independents en disposició i tipus *beta-beta*. Malgrat que el domini *beta* es defineix en vertebrats i equinoderms com el domini que no té doblats Cys-Cys, la semblança estructural a nivell d'estructura terciària ha fet que els dos dominis de crustaci (que sí

presenten doblats Cys-Cys) siguin comunament anomenats dominis *beta*.

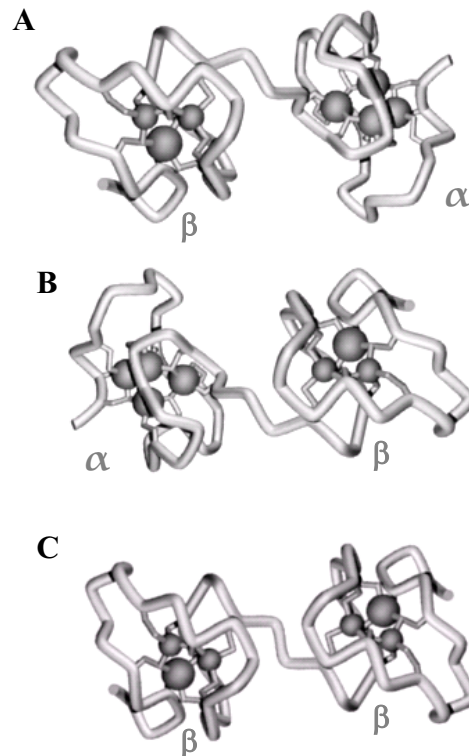


Fig. 10- Representació esquemàtica de les disposicions dels dominis *alfa* i *beta* en les MT de mamífer (A), equinoderm (B) i crustaci (C). En destaca la inversió en l'ordre dels dominis *beta* i *alfa* entre equinoderm i mamífer.

La SpMTA de l'equinoderm *S.purpuratus* fou estudiada per NMR (Riek *et al.*, 1999), i els resultats demostraren que quan uneix Cd s'estructura en dos dominis globulars independents que formen respectivament *clusters* A i B similars als de vertebrats, però amb dues particularitats:

1) l'ordenació dels *clusters* sobre la seqüència de la proteïna és la inversa que en mamífer, de manera que el domini *beta* (corresponent al *cluster* B) es situa a la zona *C-term*, mentre el domini *alfa* (corresponent al *cluster* A) es situa a la zona *N-term* (Fig. 10).

2) SpMTA inclou un aminoàcid aromàtic, fet que no s'observa en cap MT de vertebrat i que es dona més freqüentment en les MT de planta i organismes de llinatges evolutius inferiors.

La semblança que s'observa entre les respectives estructures primàries i terciàries va portar a proposar que els dominis *beta* i

alfa de les MT d'equinoderm, crustaci i vertebrats poden tenir un origen evolutiu comú, suposant que a partir d'un domini *beta* primitiu s'hagués originat un domini *alfa* més modern. Les duplicacions i la transposició d'aquest domini de *N-term* a *C-term* és el que hauria donat lloc a l'estructura que observem en vertebrats (Nemer *et al.*, 1985; Harlow *et al.*, 1989).

Les MT de *Drosophila*, petites i presumptament monodominials, podrien ser un cas especial, amb connexions funcionals amb les MT de l'insecte *O.cincta* (Hensbergen *et al.*, 1999), l'equinoderm *A.crassispina* (Ohtake *et al.*, 1983) i l'anèl·lid *E.foetida* (Gruber *et al.*, 2000), i CUP1 de *S.cerevisiae* (Bertini *et al.*, 2000), totes elles pèptids de mida similar, també presumptament monodominials.

SmtA i SmtB, del procariota

Synechococcus. Al límit de la definició de MT

Els resultats de Blindauer *et al.* (2001) mostren que les dues histidines d'aquestes MT prenen part en la formació d'un únic agregat metàl·lic que conté 4 ions de Zn^{2+} i que presenta una estructura molt similar a la del domini *alfa* de mamífer, però molt propera també a l'estructura dels agregats anomenats "*dits de Zn*" pel que fa a l'entorn de coordinació d'alguns d'aquests ions Zn^{2+} . La peculiaritat de les característiques estructurals i funcionals d'aquestes MT fa que es puguin considerar al límit de la definició de MT (Olafson *et al.*, 1988; Cook *et al.*, 1998).

Les MT de fong CUP1 i NcMT, les seves estructures amb Cu són monodominials

CUP1 és una MT de *S.cerevisiae* que s'indueix en resposta a altes concentracions de Cu. Els estudis per difracció de raigs X amb CUP1 contenint únicament ions de Cu monovalent mostraren que es formava un sol domini al voltant d'un *cluster* metàl·lic que contenia els ions de Cu amb entorns de coordinació digonals i trigonals (Calderone *et al.*, 2005). Estudis per NMR demostraren que la MT de *N.crassa* uneix 6 ions Cu(I)

també en un sol domini (Cobine *et al.*, 2004) (Fig. 11).

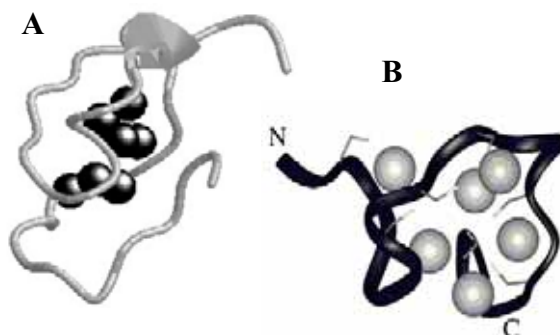


Fig. 11- Estructura tridimensional de CUP1 de *S.cerevisiae* (A) i NcMT de *N.crassa* (B), gràfics extrets de Calderone *et al.*, 2005 i Cobine *et al.*, 2004.

Les MT de planta, dos dominis en un *cluster*?

Els estudis sobre l'estructura terciària de les MT de planta estan encara en fases molt primerenques i han aportat només resultats indirectes i conclusions contradictòries usant diversos casos model.

Els primers estudis foren realitzats en la MT de *P.sativum* sintetitzada heteròlogament (Kille *et al.*, 1991), i indicaven que els dos dominis cisteínics que es troben en les MT de planta separats entre sí per un domini "*espaiador*" formaven un sol *cluster* metàl·lic en coordinar Cd, que podem anomenar estructura en forma de "*pinça*" (Fig. 12A). Aquests resultats foren recolzats posteriorment per (Tommey *et al.*, 1991). Estudis realitzats posteriorment en les MT de *F.vesiculosus* (alga), *T.durum* (blat) i *A.chinensis* (Kiwi), en canvi, recolzen un model en què cada domini cisteínic forma un *cluster* metàl·lic independent (Zhu, 2000; Bilecen *et al.*, 2005; Merrifield *et al.*, 2006), en forma de "*pesa*" (Fig. 12B).

Donada la peculiaritat de l'estructura primària de les MT de planta i el coneixement que es té de les altres MT, en molts casos es dona per fet que existiria un sol model estructural que explicaria el conjunt de les MT de planta, i que aquest seria constant, i no variaria en funció de factors fisiològics. Cal tenir present que aquesta suposició no té una base ferma, i que suposant que existeixi un model únic la seva construcció és un tema controvertit i

sobre el qual es disposa de poques dades experimentals. En la descripció dels casos model es comenten amb més profunditat aquestes dades experimentals.

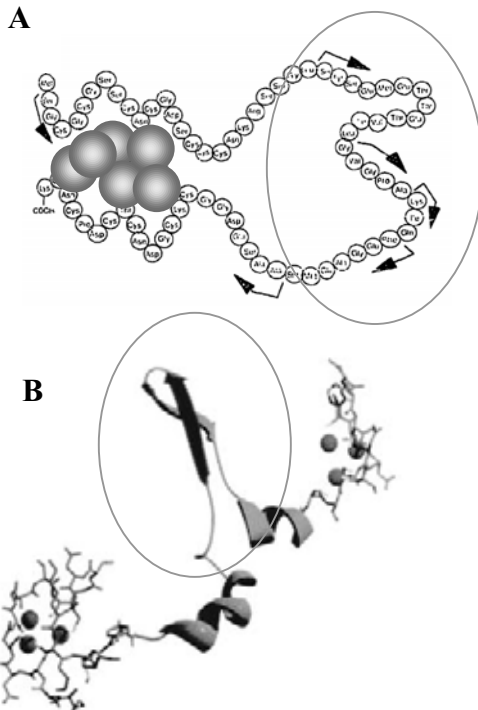


Fig. 12- Estructures de la MT de planta en forma de pinça (A) i en forma de pesa (B), segons les dades publicades per a la MT de *P.sativum* (Kille *et al.*, 1991) i *T.durum* (Bilecen *et al.*, 2005). Les zones corresponents a l'espaiador es mostren encerclades. Els gràfics són adaptacions dels que apareixen en les publicacions citades.

3.4- Estructura quaternària

Moltes proteïnes obtenen propietats funcionals especials gràcies a la formació de dímers o polímers. Encara que les MT són considerades proteïnes essencialment monomèriques, en alguns casos s'ha descrit la formació d'agregats dimèrics o polimèrics, amb efectes en el seu comportament biològic. Per exemple, s'ha proposat que la formació de dímers seria un mecanisme d'intercanvi de metalls entre MT, i de MT amb altres proteïnes (Nettesheim *et al.*, 1985; Hathout *et al.*, 2002), que podria incrementar la capacitat quelatant de la MT (Palumaa *et al.*, 1992); i que la formació d'oligòmers podria alterar el paper detoxificador de les MT (Templeton & Cherian, 1985; Andersen *et*

al., 1989; Kar *et al.*, 1997; Wilhelmsen *et al.*, 2002). El dímers o polímers s'han observat tant en complexos metall-MT purificats directament de teixits nadius (Andersen *et al.*, 1989; Gruber *et al.*, 2000), com expressats heteròlogament (Wang *et al.*, 1994) o reconstituïts químicament (Palumaa *et al.*, 1992), i s'han observat en MT de diversos grups, per exemple mamífer (Zangger & Armitage, 2002), mol·lusc (Serra *et al.*, 1999; Geret & Cosson, 2002), equinoderm (Wang *et al.*, 1994), planta (Bilecen *et al.*, 2005) i cianobacteri (Kar *et al.*, 1997; Cook *et al.*, 1998). S'han proposat dos mecanismes principals d'oligomerització:

Mediada per metall

En aquest cas, el dímer es forma mitjançant la intervenció d'un ió metàl·lic que s'enllaçaria a dues MT simultàniament (Afonso *et al.*, 2004). Aquest tipus de dímers s'han proposat com a mecanisme d'intercanvi metàl·lic i s'han observat principalment en sobrecàrrega *in vitro* de Cd o altes concentracions de MT (Palumaa *et al.*, 1992; Otvos *et al.*, 1993; Palumaa & Vaher, 1996; Zangger & Armitage, 2002).

Aquests dímers es caracteritzen per formar unions reversibles mitjançant la competició amb agents quelatants, com l'EDTA (Wang *et al.*, 1994; Gan *et al.*, 1995; Tang *et al.*, 1999). S'ha proposat també la dimerització a través de metall per a la MT de *G.gallus*. Aquesta MT presenta una histidina a l'extrem C-term que participaria en la formació d'un pont metàl·lic intermolecular (Villarreal *et al.*, 2006).

Mediada per pont disulfur intermolecular

La natura química del grup tiol fa que sigui altament sensible a l'oxidació, que comporta la formació de ponts disulfur. Quan aquests ponts es formen entre dues molècules de MT, es forma un dímer MT-MT mediat per un pont de sulfur intermolecular (Fig. 13) (Suzuki *et al.*, 1983; Fang *et al.*, 1994; Serra *et al.*, 1999; Zangger *et al.*, 2001). Aquests dímers són reversibles mitjançant la reducció dels ponts disulfur a grups tiol per mitjà d'un agent reductor, del

tipus del *beta*-mercaptoetanol (Tang *et al.*, 1999).

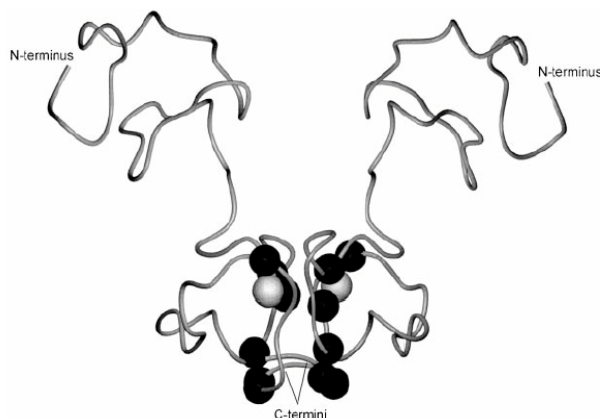


Fig. 13- MT1 de ratolí dimeritzada per ponts disulfur, intermoleculars formats entre Cys dels dominis *alfa* de dues MT, segons Zangger *et al.*, 2001.

Fins i tot s'ha proposat que el mecanisme de formació de dímers en MT podria ésser específic de domini: segons Zangger *et al.*, 2002, la metal·lotioneïna de mamífer dimeritza a través de metalls pel seu domini *beta*, i a través de ponts disulfur pel seu domini *alfa*.

Malgrat les evidències a favor de la possibilitat química de formació de dímers i polímers de MT, i les seves possibilitats a nivell funcional, la seva formació s'ha observat principalment en condicions *in vitro* excepcionals o bé com a resultat d'una oxidació de les cisteïnes, interpretable com a símptoma d'instabilitat o un efecte artefactual (Suzuki *et al.*, 1983; Hathout *et al.*, 2002). L'únic cas en què s'ha demostrat la significació biològica de la dimerització és el cas de SmtB del cianobacteri *Synechococcus*, que forma estructures especials similars als *dits de Zn* (Fig. 14) (Cook *et al.*, 1998; Kar *et al.*, 1997; Kar *et al.*, 2001). En la resta de casos, la significació biològica de les estructures quaternàries de les MT és actualment objecte de controvèrsia.

3.5- Classificació Funcional

En general, les proteïnes es classifiquen segons la seva funció i després es discriminen diferències entre les seves estructures primàries. Així, hi ha definides "fosfatases", "hidrolases" i "quinases" que

es divideixen en sub-grups en funció de criteris estructurals (homologies i/o similituds de seqüència). En aquest apartat de la introducció es descriu la proposta d'una classificació per a les MT que adopti criteris de funció molecular i no estrictament d'estructura.

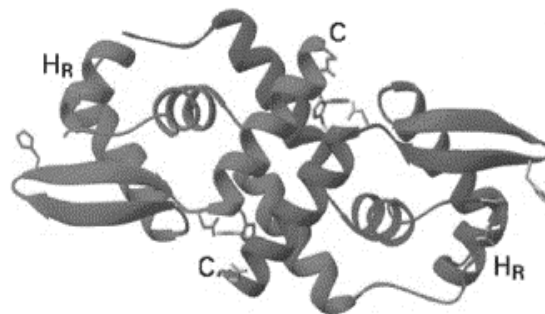


Fig. 14- Representació dels dímers mediats per Zn^{2+} de SmtB, del cianobacteri *Synechococcus*, extreta de Cook *et al.*, 1998.

La preferència pel Cu o el Zn, un caràcter funcional mesurable

Les MT presenten diverses estequiometries i preferències d'unió a metalls, fins i tot entre diverses isoformes MT d'un mateix organisme. Aquestes preferències d'unió poden reflectir especialització funcional relacionada amb les restriccions geomètriques dels metalls amb què hagi d'interaccionar cada isoforma.

Aquesta visió constitueix una aproximació més funcional respecte les MT, i ha estat elaborada i analitzada en el grup de recerca en què s'ha realitzat aquesta tesi doctoral. La síntesi heteròloga en *E.coli* de diverses MT i l'estudi de les propietats dels agregats obtinguts en medis enriquits en Cu(I) o Zn(II), han permès demostrar que determinades MT mostren una preferència coordinant pel Zn(II), mentre d'altres mostren una preferència pel Cu(I), fet que es pot avaluar en l'estabilitat i el grau d'estructuració dels agregats metàl·lics respectius (Valls *et al.*, 2001). Els criteris utilitzats per a aquesta classificació són:

Metal·lotioneïnes de Zn o Zn-tioneïnes:

Es consideren Zn-tioneïnes aquelles MT que en ésser sintetitzades heteròlogament en medis enriquits amb Cu resulten en

agregats heterometàl·lics Zn,Cu-MT, fet que reflecteix que el Zn(II) és un requeriment per a l'estabilitat dels agregats contenint Cu(I) *in vivo*. És el cas de MT1 de *M.musculus* (Bofill *et al.*, 2001) i MTH de *H.americanus* (Valls *et al.*, 2001).

Metal·lotioneïnes de Cu o Cu-tioneïnes:

Es consideren Cu-tioneïnes aquelles MT que en ésser sintetitzades en medis enriquits amb Cu es constitueixen en agregats homometàl·lics Cu-MT, i presenten un alt grau d'estructuració. En són exemples MTNA de *D.melanogaster* (Valls *et al.*, 2000), CUP1 de *S.cerevisiae* (Winge *et al.*, 1985), el domini *beta* isolat de MT1 de *M.musculus* (Bofill *et al.*, 1999) i la isoforma MT4 de mamífer (Tio *et al.*, 2004). Malgrat que els criteris usats en la classificació proposada pel nostre grup de treball es basa en les característiques dels agregats metall-MT recuperats per síntesi recombinant, a la literatura s'atribueix també el caràcter de Cu- o Zn-tioneïna a una MT en funció dels patrons d'inducció dels seus gens (síntesi en resposta a Zn o Cu), les seves capacitats detoxificadoras (de Zn o Cu) o quins metalls enllaça en ésser purificada de teixit natiu. Així s'han classificat pèptids MT de procedència taxonòmica molt diversa, als que s'ha atribuït una especialització funcional envers el Cu -*C.sapidus* CuMT (Brouwer *et al.*, 2002), *T.termophila* MT2 (Boldrin *et al.*, 2002), *H.pomatia* CuMT (Dallinger *et al.*, 2004)- o el Zn/Cd, com és el cas de *C.sapidus* CdMT (Brouwer *et al.*, 2002), *T.termophila* MT1 (Boldrin *et al.*, 2002), *H.pomatia* CdMT (Dallinger *et al.*, 2004).

La preferència davant Cu o Zn, un caràcter atàvic relacionat amb el patró cisteínic?

Inicialment, s'havia atribuït a les MT de Cu monodominials un "caràcter atàvic", mentre la preferència de Zn (més exigent estèricament) i l'estructuració en dos dominis havia estat interpretada com un "caràcter modern" (Nemer *et al.*, 1985). Estudis realitzats en el nostre grup amb anterioritat a aquesta tesi, determinaren que MTNA de *D.melanogaster* manifestava una clara preferència per Cu (Valls *et al.*,

2000), i que el mateix feia el domini *beta* de la MT de vertebrat, estudiat com a pèptid independent (Bofill *et al.*, 1999). Aquest avenç trencava amb la idea que la preferència pel Cu fos un caràcter atàvic, present tan sols en MT d'organismes molt primitius en l'escala evolutiva, com són els fongs i llevats.

El fet que la MT d'*H.americanus* (formada per dos dominis *beta*) presentés preferències de coordinació metàl·lica de Zn (Valls *et al.*, 2001) exclouïa la possibilitat que factors exclusivament d'estructura terciària determinessin el comportament o preferència coordinant. Entre les MT que s'havien estudiat inicialment, les que presentaven motius Cys-X-Cys mostraven una preferència pel Cu, mentre aquelles que mostraven una preferència pel Zn presentaven també motius Cys-Cys en la seva seqüència (Nemer *et al.*, 1985). Malgrat això, posteriorment, en el nostre grup es determinà que la MT4 de mamífer mostra una certa especialització funcional envers Cu, malgrat presentar motius Cys-Cys (Tío *et al.*, 2004). A més, en *H.pomatia*, dues MT amb patrons cisteínics idèntics semblen presentar especialitzacions funcionals diferents (Dallinger *et al.*, 1997; Dallinger *et al.*, 2004). Aquestes dades posen de manifest que la preferència per Zn o Cu no queda determinada únicament pel patró de distribució de cisteïnes, sinó que hi participen també altres determinants de seqüència. La preferència per Zn o Cu, més que un caràcter atàvic o modern, seria una especialització funcional que pot haver aparegut diverses vegades en l'evolució adaptativa de les MT, configurant casos de convergència funcional a partir de seqüències palesament no homòlogues. En conjunt, la classificació de MT entre preferències de coordinació de Zn i per Cu és complementada per altres indicacions d'especificitat metàl·lica i trascendeix les barreres taxonòmiques, permetent establir una classificació funcional de les MT, que es relaciona d'una manera complexa amb la seva estructura primària.

4- REGULACIÓ DE L'EXPRESSIÓ DE LES MT

La síntesi de MT s'indueix en resposta a metalls i determinats estressos

En general, la síntesi de MT es sol induir en condicions d'estrès, principalment amb altes concentracions de metalls pesants (Cd, Zn, Hg, Cu, Au, Ag, Co, Ni, Bi...) o en situacions d'estrès oxidatiu (Cai *et al.*, 1999; Giedroc *et al.*, 2001; Haq *et al.*, 2003; Amiard *et al.*, 2006). Els glucocorticoides, i l'interferó indueixen també la síntesi de MT en mamífers (Cai *et al.*, 1999; Haq *et al.*, 2003). Pot donar-se especificitat pel que fa a la inducció, fins al punt que diferents isoformes MT d'un mateix organisme presenten respostes diferents (Amiard *et al.*, 2006), amb patrons d'expressió diferenciats tissularment i temporalment.

Una de les situacions on la síntesi de MT sembla més universalment rellevant és la proliferació cel·lular (Cai *et al.*, 1999), ja que es detecten nivells molt alts de MT en cèl·lules de teixits en regeneració o en cèl·lules tumorals (Theocharis *et al.*, 2004). Així mateix, en processos de desenvolupament embrionari, s'observen patrons d'expressió de MT específics, ja sigui pels nivells d'expressió, com perquè en alguns casos s'expressen isoformes específiques d'aquestes fases. (Haq *et al.*, 2003; Cherian & Kang, 2006). En la major part dels casos, la regulació de la síntesi de les MT s'efectua a nivell transcripcional. Els seus gens tenen en el promotor diversos elements reguladors, els principals són els ARE (Elements de Resposta Antioxidant), GRE (Elements de Resposta als Glucocorticoides) i MRE (Elements de Resposta a Metalls) (Lichtlen *et al.*, 2001; Haq *et al.*, 2003). Els MRE tenen una seqüència consens tipus CTNTGCRNCGGCC molt conservada i es troben en la pràctica majoria dels gens codificants per MT descrits. D'entre els factors de transcripció que interaccionen amb MRE, en destaca MTF1.

MTF1, un element regulador

MTF1 (*Metallothionein Transcription Factor*) és un factor de transcripció que mostra homologia entre insectes i vertebrats (Andrews, 2001). MTF1 és activat per la

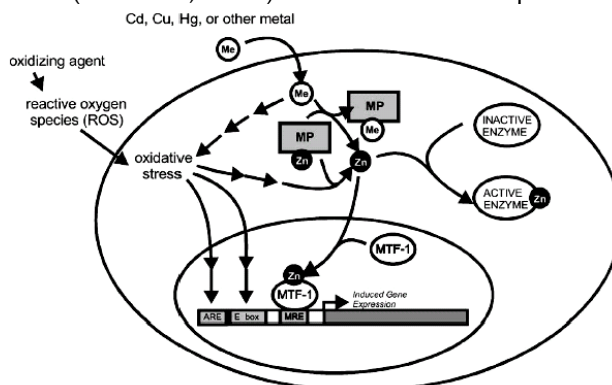


Fig. 15- La MT, com a metal·loproteïna (MP), pren part en la regulació de l'activació de la transcripció del gen que la codifica, participant en la integració de senyals d'estrès oxidatiu (ROS) i de metall (Me). Esquema extret de Haq *et al.*, 2003

A nivell molecular, aquesta activació requereix un canvi conformacional mediatitzat per la unió de Zn, fet que li confereix estructures similars als dits de Zn (Haq *et al.*, 2003). En ésser activat, MTF1 es transloca a nucli, on s'uneix directament a les caixes MRE dels promotors, activant la transcripció dels gens *Mt* (Fig. 15) (Andrews, 2001; Giedroc *et al.*, 2001; Haq *et al.*, 2003). En el cas de SmtB del cianobacteri *Synechococcus*, s'ha proposat que aquesta MT respondria al Zn^{2+} interaccionant directament amb el DNA, regulant la síntesi de MT en aquest organisme, però el mecanisme concret sembla ésser complex (Kar *et al.*, 2001).

La regulació de l'expressió de les MT s'ha relacionat també amb l'estructura de la cromatina, i el desfàs entre els nivells d'mRNA i de proteïna observat en alguns casos indica que pot existir regulació post-transcripcional significativa (Haq *et al.*, 2003).

5- FUNCIÓ DE LES METAL·LOTIONEÏNES

Donat que les MT foren inicialment aïllades en resposta a metalls xenobiòtics, se'ls atribuï inicialment una funció bàsica detoxificadora de metalls. Però l'exposició a metalls xenobiòtics és un fet poc habitual en la natura, i es pot considerar que aquesta hipòtesi està mancada de sentit evolutiu. De fet, la consideració de les propietats químiques de les MT i els estudis funcionals en éssers vius han obert un ventall molt ampli de possibles escenaris on les MT podrien participar. La funció de les MT, donada la seva ubiqüitat en els éssers vius, hauria de ser una funció amb elevada component "house-keeping". Però, al mateix temps, cèl·lules de ratolins amb nivells d'expressió de MT alterada no solen presentar alteracions importants que no estiguin relacionades amb metalls tòxics o situacions d'estrès (Dalton *et al.*, 1996; Klaassen & Liu, 1998). Aquestes dades aparentment contradictòries configuren un panorama funcional complex per a les MT, expressat en el títol de la revisió "The elusive function of metallothioneins" (Palmiter, 1998). Exposem aquí una visió general de les principals funcions proposades fins avui en dia per a les MT.

Les MT col·laboren en l'homeòstasi del Zn i el Cu

Les MT natives es troben en l'organisme en condicions fisiològiques unint Zn i/o Cu (Haq *et al.*, 2003). Aquests metalls juguen papers essencials en el metabolisme, actuant sovint com a cofactors enzimàtics o proteics. Estudis *in vitro* demostren que la MT és capaç d'intercanviar metalls amb altres molècules (Maret *et al.*, 1997; Jacob *et al.*, 1998). Això ha dut a proposar que les MT poden actuar de magatzem de Zn i/o Cu en forma soluble, que cedirien per a la síntesi de diverses metal·loproteïnes (Amiard *et al.*, 2006) o alliberarien en moments clau del desenvolupament i/o diferenciació cel·lular segons els requeriments metabòlics (Nemer *et al.*, 1991; Palmiter, 1998). En tot cas, aquest paper no seria essencial, ja que en ratolins mutants

K.O. per a 3 de les 4 isoformes de MT no s'aprecien fenotips relacionats amb disfuncions associades a aquests metalls (Dalton *et al.*, 1996; Klaassen & Liu, 1998).

Les MT protegeixen de la toxicitat dels metalls pesants xenobiòtics

La toxicitat dels metalls xenobiòtics es deu principalment a la seva interacció amb les estructures cel·lulars i els centres catalítics enzimàtics. Donades les preferències d'unió als metalls dels grups tiol, els metalls xenobiòtics com el Cd i el Hg poden desplaçar el Zn de la MT (Vasak, 1991), que segresta així els metalls tòxics, i impedeix que interfereixin en el metabolisme cel·lular. Com a conseqüència, el Zn^{2+} és alliberat de la MT, i s'ha proposat que passaria a unir-se i activar el factor MTF1, constituint la via d'inducció de síntesi de MT provocada pel primer metall (Fig. 16).

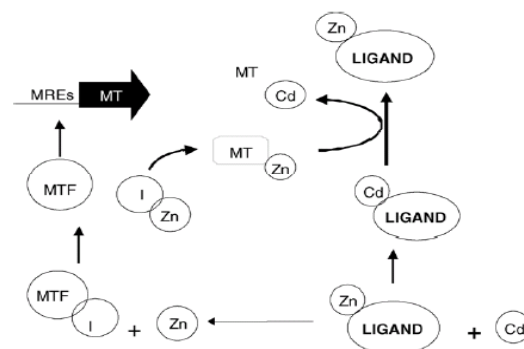


Fig. 16- Esquema del mecanisme d'activació del sistema MT per a la detoxificació metal·lica. La MT captura el Cd que interfereix en l'activitat dels lligands i s'allibera el Zn que activarà la inducció per MTF1. Esquema extret de Amiard *et al.*, 2006.

Segons aquest model, les MT anirien quelatant el metall tòxic i serien posteriorment acumulades als lisosomes, en què s'han detectat grans quantitats de S i metalls (Amiard *et al.*, 2006). s'ha comprovat que la sobreexpressió de MT confereix resistència incrementada a metalls pesants en *S.cerevisiae* i *M.musculus* (Liu *et al.*, 1995b; Pena *et al.*, 1998; Vasak, 2005) i complementàriament, les soques d'aquests organismes defectives en MT presenten fenotips d'alta sensibilitat a la toxicitat per

metalls (Hamer *et al.*, 1985; Masters *et al.*, 1994).

Els patrons d'expressió diferencials d'isoformes d'un mateix organisme observats en mol·luscs, insectes i crustacis indiquen que podria existir una especialització funcional per la qual una isoforma seria responsable de detoxificació mentre l'altra ho seria de l'homeòstasi de metalls (Amiard *et al.*, 2006).

Les MT, una protecció contra l'estrès oxidatiu

Els grups tiol són susceptibles de ser oxidats mitjançant oxidants febles, fet que permetria a les MT absorbir el dany oxidatiu abans que aquest afectés estructures cel·lulars (Thornalley & Vasak, 1985; Coyle *et al.*, 2002). Aquesta hipòtesi s'ha comprovat experimentalment, i s'ha descrit que les MT són capaces de capturar radicals oxidants com el radical hidroxil (Kumari *et al.*, 1998), i de protegir el DNA, els lípids i les proteïnes dels efectes dels radicals oxidants i la radiació UV (Sato & Bremner, 1993; Cai *et al.*, 1999; Viarengo *et al.*, 2000; Vasak, 2005). Conseqüentment amb aquesta proposta, s'ha observat que la manca de MT comporta sensibilitat incrementada a l'estrès oxidatiu (Lazo *et al.*, 1995; Pitt *et al.*, 1997; Liu *et al.*, 1999).

Al mateix temps, les MT jugarien un paper indirecte en el control de l'estrès oxidatiu, tant per la captura de Cu (evitant la participació del Cu en la reacció de Fenton-Fig. 17), com per l'emmagatzematge d'ions de Zn i Cu, necessaris per a la Zn,Cu-SOD (superòxid dismutasa) (Meneghini, 1997; Viarengo *et al.*, 2000; Bertinato & L'Abbe, 2004), un enzim clau en la prevenció cel·lular i extracel·lular de lesions provocades per estrès oxidatiu.

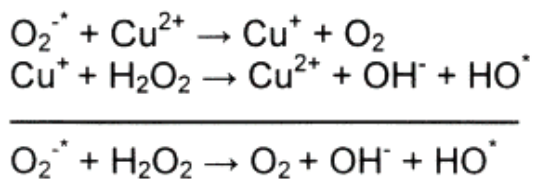


Fig. 17- Reacció de Fenton/Haber-Weiis, per la qual el Cu és capaç de transformar radicals oxidants com l'ió superòxid i el peròxid d'hidrogen en radicals hidroxil, més agressius per a l'entorn cel·lular.

A més, en absorbir el dany oxidant, l'oxidació dels grups tiol provoca l'alliberació dels ions Zn de la Zn-MT, donant així lloc a una activació dels processos de resposta a estrès oxidatiu. Com succeeix amb la captura de metalls pesants, la MT actuaria a dos nivells: com a detector de situacions d'estrès i com a mecanisme de contenció dels seus efectes tòxics.

Algunes MT presenten funcions fisiològiques molt concretes, específiques d'isoforma

Determinades isoformes de MT presenten activitats biològiques que es relacionen amb processos molt concrets. Se'n coneixen pocs exemples, però cal esmentar la MT3 de mamífer, que té una capacitat inhibidora del creixement neuronal (Uchida *et al.*, 1991), raó per la qual és també anomenada GIF (*growth inhibitor factor*). La MT4 de mamífer s'expressa específicament a epiteli estratificat escamós, i s'ha proposat que podria regular processos de diferenciació cel·lular (Quaife *et al.*, 1994).

6- DESCRIPCIÓ DE CASOS MODEL

Entre les MT, les més ben conegudes són les MT de vertebrat. El 2006, una cerca a la base de dades *PubMed* amb el terme "*metallothionein*" ha donat lloc a 7517 documents. Fent una cerca combinada amb els termes "*metallothionein*" i "*vertebrate*", es recuperen 6270 documents, mentre s'obtenen molts menys documents en fer la mateixa cerca combinada amb termes d'altres rangs taxonòmics com "*invertebrate*" (489), "*plant*" (246) o "*fungi*" (405), tot i que aquests grups taxonòmics inclouen moltes més espècies i representen en conjunt una diversitat biològica molt més elevada. Aquesta aproximació, encara que no representa directament la quantitat de coneixements que es tenen per a les respectives MT, és significativa pel que fa a l'esforç i interès que s'ha dedicat a cadascun d'aquests casos. La manca de dades en els rangs filogenètics diferents a vertebrats es supleix sovint amb

extrapolacions a partir del coneixement obtingut en vertebrats. Com hem vist al llarg de la introducció, la diversitat a nivell d'estructura primària és molt gran, fet que invalida pràcticament qualsevol deducció/inducció que es vulgui aplicar. Això fa que es necessitin dades directes sobre la funcionalitat i el comportament coordinant de cada MT que es vulgui estudiar, a qualsevol nivell de coneixement. En aquest apartat, es presenten només els casos model que han estat objecte d'estudi en aquesta tesi, i s'exposa el sistema MT en què estan ubicat.

6.1- El sistema MT en l'insecte *Drosophila melanogaster* està format per 4 gens MT, anomenats: *MtnA* (*Mtn*), *MtnB* (*Mto*), *MtnC* i *MtnD* (Lastowski-Perry *et al.*, 1985; Maroni *et al.*, 1987; Mokdad *et al.*, 1987; Egli *et al.*, 2003). La proteïna *MtnA* té 40 aminoàcids, dels que 10 són Cys, distribuïdes en motius del tipus Cys-X-Cys, i és lleugerament més petita que les altres tres isoformes (*MtnB*, *MtnC*, *MtnD*), que estan codificades per gens agrupats en un mateix *cluster* gènic i són molt similars entre si. Les proteïnes *MtnB*, *MtnC* i *MtnD* tenen 43-44 aminoàcids i 12 Cys, de les quals dues formen un doblet Cys-Cys (Fig. 18). L'homologia que s'observa entre *MtnB*, *MtnC* i *MtnD* suggereix que aquestes tres MT provenen d'una duplicació recent. Evolutivament, es considera que les MT de *D.melanogaster* podrien provenir d'una MT ancestral monodominial, com les de *N.crassa* i *S.cerevisiae* (Nemer *et al.*, 1985). La majoria d'estudis d'expressió i funció s'han dut a terme amb *MtnA* i *MtnB*, les primeres que varen ésser identificades.

Les MT de *D.melanogaster* s'expressen en resposta a metalls i estrès oxidatiu

Tant *MtnA* com *MtnB* foren descobertes a partir de l'anàlisi de gens que s'expressen per la inducció amb metalls pesants (Lastowski-Perry *et al.*, 1985; Maroni *et al.*,

1987; Mokdad *et al.*, 1987). El gen *MtnA* fou aïllat a partir de mRNAs de larves subjectes a exposició a Cu (Lastowski-Perry *et al.*, 1985), mentre que *MtnB* fou aïllat a partir de mRNAs expressats davant l'exposició a Cd (Mokdad *et al.*, 1987). Tot i que les MT de *D.melanogaster* es sintetitzen com a resposta a diversos metalls (Cd, Cu, Hg i Ag), d'altres (Zn, Rb, Co, Ni i Mn) gairebé no n'indueixen la síntesi (Mokdad *et al.*, 1987; Silar *et al.*, 1990; Durliat *et al.*, 1995).

La inducció per Cu és lleu per a *MtnB* (Mokdad *et al.*, 1987), mentre és molt forta per a *MtnA* (Lastowski-Perry *et al.*, 1985). L'expressió té lloc principalment en el sistema digestiu (Durliat *et al.*, 1995), on es formen complexos luminescents Cu-MT (McNulty *et al.*, 2001), que es localitzen en els lisosomes de cèl·lules intestinals (Lauverjat *et al.*, 1989; Silar *et al.*, 1990) i cèl·lules secretores d'àcid (McNulty *et al.*, 2001). *MtnB* s'expressa constitutivament en estadis molt primerencs, i *MtnA* en larva i adult (Silar *et al.*, 1990; Silar & Wegnez, 1990). Ambdues MT es sintetitzen també en resposta a estrès oxidatiu (Bonneton *et al.*, 1996).

Les seqüències codificants de *MtnC* i *MtnD* foren identificades *in silico* per homologia amb *MtnA* i *MtnB* (Egli *et al.*, 2003). Els estudis d'inducció de l'expressió de *MtnC* i *MtnD* en resposta a metalls demostren que ambdós s'indueixen més eficaçment per Cd que per Cu (Egli *et al.*, 2003).

Els promotors dels quatre gens *Mt* de *D.melanogaster* presenten elements MRE (Maroni *et al.*, 1987; Silar *et al.*, 1990; Durliat *et al.*, 1995; Egli *et al.*, 2003), i s'ha demostrat que la seva expressió és regulada a través del factor dMTF1 (Zhang *et al.*, 2001; Egli *et al.*, 2003), homòleg a MTF1 de mamífer, i que respon també a situacions d'estrès oxidatiu (Egli *et al.*, 2003). Altres elements de tipus GATA podrien participar en la regulació tissular (Durliat *et al.*, 1995; Bonneton *et al.*, 1996;) de l'expressió.

```

Mtn A 1 MPCP-CGSGCKCASQATKGSNCNCGSDCKCGG-DK-KSACGCSE 40
Mtn B 1 MVCKGCGTNCOCSAQKCGDNCACNKDCQCVCKNGPKDQC-CSNK 43
Mtn C 1 MVCKGCGTNCCKQDTKCGDNCACNQCQCVCKNGPKDQC-CKSK 43
Mtn D 1 MGCKACGTNCOCSATKCGDNCACSQQCQCSCKNGPKDKC-CSTKN 44

```

Fig. 18- Alineament de les seqüències de MTNA, MTNB, MTNC i MTND de *D.melanogaster*

Les MT de *D.melanogaster* confereixen resistència a metalls

Les duplicacions gèniques i l'increment de l'expressió és un mecanisme general de resistència als metalls en insectes (Timmermans *et al.*, 2005) que també s'ha observat en el sistema MT de *D.melanogaster*, en què l'amplificació del nombre de còpies gèniques de *MtnB* i *MtnA* confereixen una major resistència als metalls Cd i Cu, respectivament (Maroni *et al.*, 1987; Mokdad *et al.*, 1987). S'ha demostrat també que mutants de *D.melanogaster* defectius per a totes les MT tenen augmentada la sensibilitat al Cd i al Cu (Egli *et al.*, 2003). L'efecte detoxificador de les MT en *Drosophila* podria ésser el resultat d'especialització d'isoformes, ja que mentre *MtnB* sembla tenir un efecte molt important en la detoxificació del Cd, *MtnA* té un efecte molt important en la detoxificació del Cu. Tot i això, tant *MtnB* com *MtnA* mostren capacitat detoxificadora de Cu en llevat (Silar & Wegnez, 1990). *MtnC* i *MtnD* tenen capacitats detoxificadoras molt més lleus per als dos metalls (Egli *et al.*, 2006b).

Aparentment, en *D.melanogaster* han d'existir altres sistemes de detoxificació de metalls encarregats de fer front al Zn, ja que si bé mosques *D.melanogaster* defectives en MT no presenten un fenotip de sensibilitat al Zn, sí que ho fan les defectives en dMTF1 (Egli *et al.*, 2003; Southon *et al.*, 2004; Egli *et al.*, 2006b). Per tant, dMTF1 controlaria diversos gens del sistema de defensa de metalls pesants, ja que la seva manca provoca sensibilitat combinada al Zn, Cu i Cd (Egli *et al.*, 2003; Southon *et al.*, 2004).

Les MT de *D.melanogaster* poden presentar comportaments coordinants dependents d'isoforma

Estudis realitzats anteriorment en aquest grup demostraren que *MtnA* mostra una

preferència de coordinació pel Cu, i, per tant, funcionalment pertany al grup de les Cu-tioneïnes (Valls *et al.*, 2000). Des d'un punt de vista estructural, no es tenen dades sobre l'estructura terciària dels seus agregats, però el fet que d'altres MT amb nombre similar de Cys es pleguin en un sol domini recolzaria una estructura d'aquest tipus. Els estudis realitzats amb anterioritat a aquesta tesi, ja suggerien que els agregats metall-*MtnA* podrien contenir ions sulfur com a lligands addicionals (exògens) (Valls *et al.*, 2000).

6.2- El sistema MT en l'equinoderm

Strongylocentrotus purpuratus

Les MT d'equinoderm manifesten homologia i estructura tridimensional similars a les MT de mamífer

Les MT d'equinoderm descrites fins al moment són homòlogues entre elles i constitueixen la família 4 segons la classificació de Binz i Kägi, amb una mida d'aproximadament 70 aminoàcids, dels qual 20 són Cys. Mentre a l'extrem *C-term*, el patró de distribució de les Cys és Cys-X-Cys, a l'extrem *N-term* el motiu majoritari és el doblet Cys-Cys (Nemer *et al.*, 1985; Harlow *et al.*, 1989). L'estudi de l'estructura tridimensional de l'agregat Cd²⁺-SpMTA de l'erició de mar *S.purpuratus* (Wang *et al.*, 1995; Riek *et al.*, 1999) ha demostrat que les MT d'equinoderm es pleguen en dos dominis d'estructura homòloga als dominis *alfa* i *beta* de vertebrat, però situats en ordre invers en la cadena polipeptídica, tal com suggerien les similituds en l'estructura primària (Nemer *et al.*, 1985; Harlow *et al.*, 1989).

Malgrat l'elevada similitud de seqüència i estructura que presenten per separat els dominis *alfa* i *beta*, el seu l'ordre invers fa que les seqüències de les MT d'equinoderm i vertebrat no s'alineïn correctament, i per

Les MT d'equinoderm s'associen a l'homeòstasi de Zn (Scudiero *et al.*, 1997) però estudis realitzats en 6 espècies diferents mostren que no en són les úniques responsables (Scudiero *et al.*, 1994). A més, algunes seqüències genòmiques d'equinoderm (GenBank, XM_775501.1) codificarien per una proteïna homòloga a la fitoquelatin-sintasa., per tant és possible la presència d'aquests pèptids de síntesi enzimàtica, que podrien jugar un paper important en la detoxificació metàl·lica també en animals (Clemens, 2006; Vatamaniuk *et al.*, 2001).

6.3- El sistema MT en el mol·lusc *Mytilus edulis*

Les MT de mol·lusc són similars a les MT de mamífer, i presenten homologia entre elles

Les MT de mol·lusc són les MT d'invertebrat més similars a les de vertebrat (Dallinger *et al.*, 1993; Dallinger, 1996). Configuren la família 3 segons la classificació de Binz i Kägi, i per la homologia amb les MT de vertebrat, formaven part de la Classe I. Són pèptids d'entre 60 i 70 aminoàcids i presenten una distribució de 20 Cys en **patrons del tipus Cys-X-Cys**, molt conservada, especialment entre gasteròpodes (Berger *et al.*, 1997). Partint de la seva semblança a nivell d'estructura primària se n'ha inferit la seva **estructuració en dos dominis** (Dallinger *et al.*, 2001; Vergani *et al.*, 2005), similar a la de mamífer, amb dominis de tipus *beta* o *alfa* combinats de forma diferent segons l'espècie. Per exemple, en *H.pomatia* s'ha proposat la presència de dos dominis de tipus *beta* (Dallinger *et al.*, 2001) i en *C.gigas* s'ha proposat l'estructuració també en dos dominis, en aquest cas, *beta* i *alfa* per a CgMT1 (Tanguy *et al.*, 2002).

Algunes isoformes de MT de Mol·lusc presenten mides anormalment grans, que poden ser degudes a una ampliació del gen per *exon-shuffling* (Lieb *et al.*, 2003), duplicant-se algun domini sencer, com en els casos de *C.virginica* i *C.gigas*, en què les MT es correspondrien, respectivament, a estructures de 4 dominis *alfa* (Jenny *et al.*,

2004) o de dos dominis *beta* i un *alfa* (Tanguy & Moraga, 2000). Malgrat tot, les prediccions d'estructura terciària no han estat comprovades mitjançant estudis estructurals.

Les isoformes MT de mol·lusc presenten especificitat d'inducció per metalls

En la majoria d'espècies de mol·lusc estudiades, s'han aïllat diverses isoformes de MT (Ciocan & Rotchell, 2004), que presenten elements MRE en els promotors dels seus gens (Khoo & Patel, 1999). Els estudis d'expressió mostren patrons característics: mentre algunes isoformes presenten una clara inducció per exposició al Cd, d'altres isoformes presenten inducció més dèbil, o s'indueixen principalment en resposta al Zn o el Cu (Roesijadi *et al.*, 1989; Dallinger *et al.*, 1997; Barsyte *et al.*, 1999; Viarengo *et al.*, 1999; Chabicoovsky *et al.*, 2003;; Dallinger *et al.*, 2004; Jenny *et al.*, 2004; Lecoeur *et al.*, 2004; Dondero *et al.*, 2005). En algun cas, s'ha observat també inducció en resposta a estrès oxidatiu (Cavaletto *et al.*, 2002).

En *M.edulis* s'identificaren 9 isoformes, que es classificaren en dos tipus (Mt10 i Mt20) en funció del seu comportament cromatogràfic en purificar-les de teixit: les isoformes Mt10 i Mt20. Les 5 isoformes Mt20 es recuperaren en un pic cromatogràfic associat a formes dimèriques i les 4 isoformes Mt10 es recuperaren en forma monomèrica en una altre pic cromatogràfic (Mackay *et al.*, 1993). Pel que fa a l'estructura primària, totes elles tenen la mida i la distribució Cys-X-Cys habituals en mol·lusc, però el tipus Mt20 presenta en la seva seqüència un doblet Cys addicional (Fig. 20). Tot i que les MT de tipus Mt10 i Mt20 s'han trobat també en *B.termophilus* (Hardivillier *et al.*, 2004), i *M.galloprovincialis* (Ceratto *et al.*, 2002), l'origen dels dos tipus sembla ser evolutivament recent (Barsyte *et al.*, 1999). La síntesi de les MT de tipus Mt20 és fortament induïda per Cd però no per Cu ni Zn. En canvi, les Mt10 són induïdes per l'exposició a Zn, però no per Cu (Soazig & Marc, 2003). En relació al Cd, la síntesi de

les isoformes Mt10 mostra un patró particular: s'activa a baixes concentracions de Cd, però s'atenua a altes concentracions de Cd (Barsyte *et al.*, 1999; Ferrarello *et al.*, 2000; Lemoine *et al.*, 2000; Soazig & Marc, 2003; Ciocan & Rotchell, 2004).

El tipus Mt20 també s'ha trobat en *M.gallopvialis* (Ceratto *et al.*, 2002), i *B.termophilus* (Hardivillier *et al.*, 2004). En altres MT de mol·lusc, s'han trobat també indicis de dimerització. Comportaments cromatogràfics estranys atribuïbles a dimerització, han estat també detectats en MT de *C.gigas* (Roesijadi *et al.*, 1989), i en *M.crenulata* s'ha identificat el patró de seqüència "KEGEA", associat a la formació d'un loop acídic responsable de la interacció entre proteïnes (Lieb, 2003).

Les MT de *M.edulis* s'han associat tradicionalment a la detoxificació metàl·lica. S'ha descrit que tant a *M.edulis* com a *B.termophilus* existeixen al mateix temps gens funcionals Mt10 i Mt20 amb introns (Hardivillier *et al.*, 2004) i sense introns (Leignel *et al.*, 2005), que podrien estar associats a diferents papers de les MT i a diferents velocitats de reacció davant l'exposició a metalls, aspecte en què també hi intervindria el *turn-over* excepcionalment curt que presenten les MT de *M.edulis* en relació a les MT de vertebrat (Bebianno & Langston, 1993).

Adicionalment, *M.edulis* presenta algunes particularitats en el seu sistema de detoxificació metàl·lica que cal destacar. Per una banda, els metalls estan

majoritàriament immobilitzats en fraccions insolubles (Geffard *et al.*, 2005) o acumulats en lisosomes terciaris, compartiments als que no es sol associar les MT en mol·lusc (George, 1983).

Així doncs, malgrat que les isoformes Mt20 de *M.edulis* tinguin capacitat per a capturar el Cd, sembla que en aquest organisme hi participen també altres sistemes de detoxificació metàl·lica. Per exemple, s'hi ha descrit la presència de metal·loproteïnes riques en His (CdBP) capaces d'unir Cd (Nair & Robinson, 1999).

Estudis precedents sobre *M.gallopvialis* Mt10.

Mt10 de *M.gallopvialis* té una elevada semblança amb Mt10 de *M.edulis*, i se n'ha estudiat el comportament coordinant davant el Cd mitjançant la seva síntesi heteròloga i l'estudi dels agregats obtinguts (Vergani *et al.*, 2005). Els resultats obtinguts mostren que Mt10 enllaça 7 ions de Cd, i -comparada amb SpMTA de *S.purpuratus-*, té una alta estabilitat tèrmica i facilitat per a cedir els metalls en condicions oxidants. S'aprecia la formació de dímers, possiblement mediat per metall i l'espectre DC està desplaçat cap al vermell respecte l'habitual en les Cd-MT, suggerint una estructuració peculiar. Els estudis *in silico* proposen per a Mt10 una flexibilitat menor que la MT de mamífer o peix.

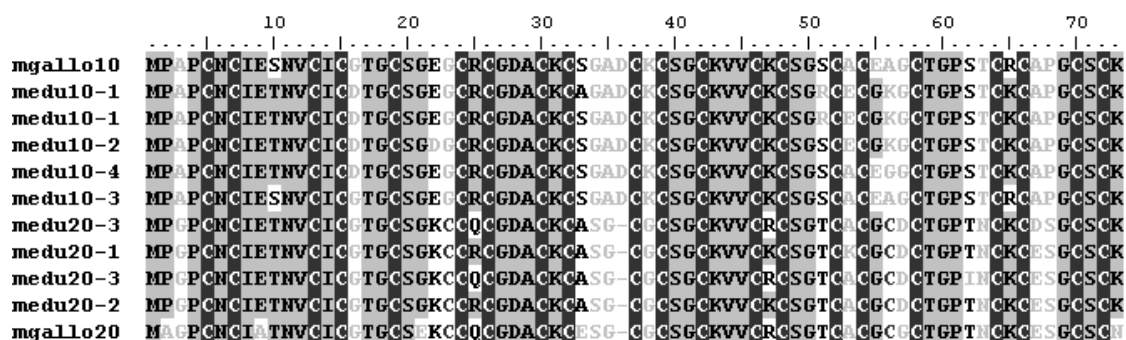


Fig. 20- Alineament de les isoformes MT de *M.edulis* (*medu*), amb alguns isoformes de *M.gallopvialis* (*mgallo*). Les isoformes amb el numero 10 són aquelles que es corresponen al tipus Mt10.

6.4- El sistema MT en el nematode

Caenorhabditis elegans consta de dues isoformes, Mtl1 i Mtl2. MTL2 fou isolada per purificació a partir d'extractes de *C.elegans* que havien estat exposats a Cd (Slice *et al.*, 1990). Posteriorment, en treballs amb mRNAs acumulats en resposta a Cd, s'identificà també una seqüència codificant per MTL1 (Imagawa *et al.*, 1990) i es seqüencià la regió genòmica codificant dels dos gens MT de *C.elegans*, *mtl1* i *mtl2* (Freedman *et al.*, 1993). MTL1 i MTL2 configuren la família 6 de la classificació de Binz i Kägi descrita a l'inici d'aquesta introducció.

Les dues MT de *C.elegans* tenen His en la seva seqüència

Les proteïnes MTL1 i MTL2 són homòlogues entre elles, però no amb les MT de mamífer (Imagawa *et al.*, 1990; Kondo *et al.*, 1990). Les dues MT presenten 18 Cys i una llargada d'entre 63 i 77 aminoàcids, i la peculiaritat de presentar histidines en la seva seqüència, fet poc habitual en MT (Fig. 21). (Imagawa *et al.*, 1990; Slice *et al.*, 1990).

Les isoformes de MT de *C.elegans* presenten diferents patrons d'inducció

Les dues MT de *C.elegans* tenen l'expressió regulada independentment (Swain *et al.*, 2004) i els seus promotors són considerablement diferents entre ells (Slice *et al.*, 1990). *Mtl1* s'expressa constitutivament en farinx (Freedman *et al.*, 1992), i per a les dues MT, s'aprecia una clara inducció per Cd, però no per Cu ni Zn (Imagawa *et al.*, 1990; Liao & Freedman, 1998; Swain *et al.*, 2004). Concretament, en

resposta a Cd, *mtl1* i *mtl2* s'expressen en intestí, en els estadis de larva i adult, respectivament. (Kondo *et al.*, 1990; Freedman *et al.*, 1993).

El sistema de regulació de l'expressió de MT en *C.elegans* és diferent al d'altres organismes

Respecte els altres organismes coneguts:

- 1) Els promotors dels dos gens presenten caixes d'activació per elements GATA i GRE, però només s'ha trobat una caixa MRE en *mtl2*, (Freedman *et al.*, 1993; Kugawa *et al.*, 1994).
- 2) Els promotors dels gens *mtl1* i *mtl2* no són funcionals en cèl·lules de mamífer (Kugawa *et al.*, 1994).
- 3) No s'han localitzat en el genoma de *C.elegans* seqüències codificants per MTF1, el factor que regula l'expressió de MT per metalls en mamífers i *Drosophila* (Swain *et al.*, 2004).

D'aquests fets se'n conclou que, en *C.elegans*, altres mecanismes independents de MRE i MTF1 regulen l'expressió de les MT en resposta a metalls (Swain *et al.*, 2004).

Tant *mtl1* com *mtl2* tenen llocs d'activació per GATA en el seu promotor que són necessaris per a la seva expressió en intestí (Moilanen *et al.*, 1999). Segons el model proposat per altres autors, (Swain *et al.*, 2004), les caixes GATA determinen la síntesi constitutiva en intestí, que seria inhibida per algun factor inhibidor desconegut. Segons Moilanen *et al.* (1999) la presència de metalls inactivaria aquest factor inhibidor, punt clau de la regulació de l'expressió per metalls en aquest organisme.



Fig. 21- Alineament de les seqüències de MTL1 i MTL2 de *C.elegans*

Les MT de *C. elegans* podrien participar en un complex sistema de detoxificació metàl·lica

Les MT de *C. elegans* s'expressen en resposta al Cd, però no a altres metalls. Organismes K.O. per *mtl-1* i *mtl-2* o la inhibició d'aquests gens per RNAi resulten en una sensibilitat incrementada a la toxicitat per Cd (Swain *et al.*, 2004). Totes aquestes dades indiquen que les MT de *C. elegans* podrien constituir un mecanisme específic de defensa contra el Cd. Tot i això, el sistema de defensa contra metalls pesants resultaria en *C. elegans* bastant més complex, per la presència addicional dels següents elements:

- 1) Fitoquelatines: en *C. elegans* s'ha seqüenciat una regió codificant per a la fitoquelatin-sintasa (*Ce-pcs1*). La inhibició de l'expressió de *Ce-pcs1* també origina en *C. elegans* una sensibilitat incrementada al Cd (Vatamaniuk *et al.*, 2001).
- 2) CeHMT-1: és una proteïna homòloga a SpHMT1 (Proteïna de *S. pombe* segrestadora-transportadora d'agregats Cd-PC associada a vacuola) i és capaç de desenvolupar funcions similars en *S. pombe* (Vatamaniuk *et al.*, 2005). Tot i així, estudis amb *C. elegans* mutants defectius per *Cehmt-1* i *Ce-pcs1* demostren que l'acció protectora contra el Cd de *Cehmt-1* no es desenvolupa exclusivament a través de fitoquelatines (Vatamaniuk *et al.*, 2005).
- 3) Les proteïnes CDR: són proteïnes de síntesi induïble per Cd (Dong *et al.*, 2005), que s'associarien a lisosomes de cèl·lules intestinals. Tenen caixes GATA i són transmembrana. La inhibició per RNAi resulta en sensibilitat incrementada al Cd.

En resum, tot i que les MT de *C. elegans* semblen desenvolupar un paper important en la detoxificació de Cd, altres mecanismes més específics semblen ésser presents. El fet que en mutants *daf-2* de *C. elegans* (un mutant en què s'aprecia una resistència incrementada a estrès oxidatiu i metalls) els nivells de MT siguin més elevats respecte el silvestre (Barsyte *et al.*, 2001), suggereix que les MT de *C. elegans* podrien tenir un paper

més general i vies d'activació més àmplies que la inducció per Cd.

Els anèl·lids són un grup filogenèticament i biològicament proper als nematodes. Les MT d'anèl·lid mostren un contingut de Cys i mida similar, i són també induïbles específicament per Cd (Marino *et al.*, 1998). L'expressió de MT està també relacionada amb lisosomes intestinals (Sturzenbaum *et al.*, 2004). De la mateixa manera, aquests organismes presenten també d'altres sistemes de protecció front als metalls (Willuhn *et al.*, 1994) i la resposta a inducció és també diferent a la dels vertebrats (Sturzenbaum *et al.*, 2004).

Donada la semblança biològica entre els anèl·lids i els nematodes, les peculiaritats del sistema MT en *C. elegans* podrien tenir relació amb pressions evolutives comunes als dos grups filogenètics.

Enllaç a metalls i estructura

Els únics estudis realitzats fins al moment sobre els agregats metall-MT que formen les MT de *C. elegans* es centren en MTL2, que en sintetitzar-se heteròlogament en medi enriquit en Cd, resulta en un agregat metàl·lic Cd-MTL2 que conté 6 ions Cd²⁺ enllaçats tetraèdricament. (You *et al.*, 1999). Dades sobre les MT de *C. elegans* purificades de l'organisme sotmès a altes concentracions de Cd indiquen proporcions metall/MT similars, tot i que per a MTL1 es detecta una presència addicional minoritària de Zn (You *et al.*, 1999).

6.5- El sistema MT en el protozou

Tetrahymena

Tot i que s'ha descrit la presència de MT en diversos protozous, l'estudi de les MT en aquest grup es centra en el gènere *Tetrahymena*.

Les MT de *Tetrahymena* i la detoxificació

En els protozous en general, la resposta a condicions d'estrès metàl·lic inclou la formació de corpuscles citoplasmàtics electrodensos en què s'acumularien els complexos metall-MT (Marigómez *et al.*, 2002). Les MT de *Tetrahymena* foren aïllades com a proteïnes que s'expressaven en

resposta al Cd i al Cu, però no al Zn (Piccinni *et al.*, 1999; Santovito *et al.*, 2001; Shang *et al.*, 2002). L'estudi dels promotors dels seus gens mostra que presenten caixes de resposta del tipus MRE (Boldrin *et al.*, 2003). El gènere *Tetrahymena* mostra una capacitat de mantenir els metalls en solució molt més elevada que d'altres protozous (Piccinni, 1996), i que s'ha descrit la presència de regions codificants per fitoquelatin-sintases (Amaro *et al.*, 2005, GenBank Accession number DQ082725.2).

El gènere *Tetrahymena* té diverses isoformes homòlogues de MT

Els estudis realitzats fins al moment amb *Tetrahymena* demostren que aquest gènere presenta una gran quantitat d'isoformes, amb peculiaritats importants en la seva estructura primària. S'han estudiat les MT en tres espècies: *T.pigmentosa* (*TpigMt1* i *TpigMt2*), *T.pyriformis* (*TpyrMt1*, *TpyrMt2*) i *T.termophila* (*TterMt1*, *TterMt2*, *TterMt3*, *TterMtt1*, *TterMtt2*, *TterMtt5*) (Piccinni *et al.*, 1987; Santovito *et al.*, 2001; Shang *et al.*, 2002; Boldrin *et al.*, 2006; Fu & Miao, 2006) (Fig. 22) i tenen en comú una mida inusualment llarga, d'entre 93 i 162 aminoàcids. L'elevada homologia interna

entre regions de cadascuna d'aquestes MT indica que la seva longitud és molt probablement el resultat de duplicacions internes (Piccinni *et al.*, 1987). Existeix un grau elevat de semblança entre les diverses isoformes, i la isoforma *Mt1* és pràcticament idèntica en les tres espècies de *Tetrahymena*. Tot això indica que aquest sistema tan complex hauria estat originat a partir de duplicacions d'una seqüència ancestral, de la qual *Mt1* en seria la més propera (Boldrin *et al.*, 2003).

Les MT de *Tetrahymena* tenen una estructura primària peculiar

En totes elles, excepte en *TpigMT2* i *TterMT2* i *TterMTT2* es repeteix una característica poc comuna en MT: la presència en la seva seqüència de **triplets de Cys**. Els altres organismes que presenten alguna MT amb triplets de Cys són el crustaci *C.sapidus* (Syring *et al.*, 2000), el fong *Y.lipolytica* (Prado-González, GenBank Accession number CAA80801.1), l'anèlid *E.foetida* (Gruber *et al.*, 2000), i el mol·lusc *C.gigas* (Jenny *et al.*, 2004).

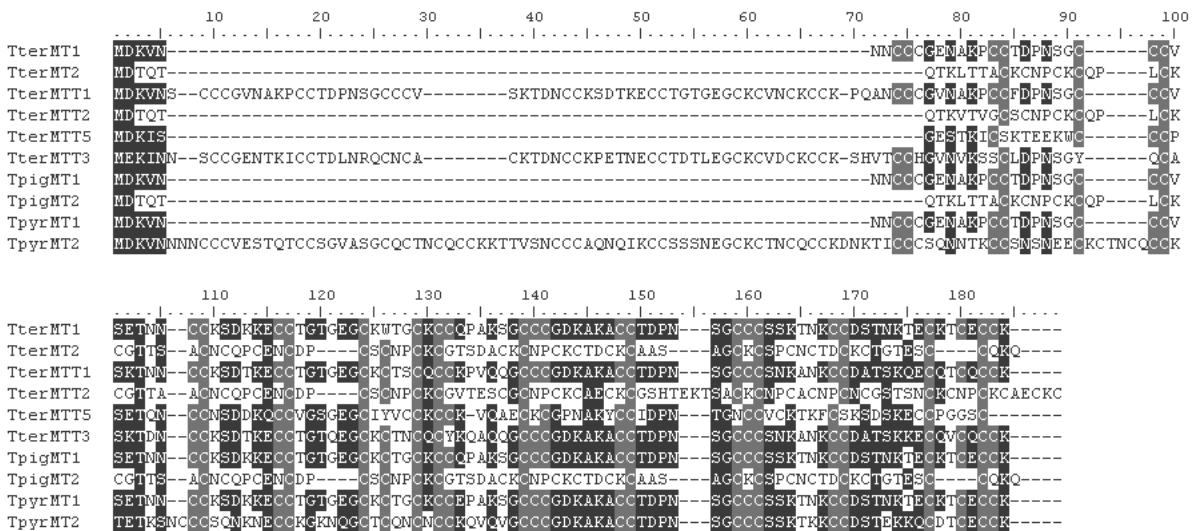


Fig. 22- Alineament de les MT del gènere *Tetrahymena* conegudes el 2006. D'algunes d'elles, només es té constància de la seva codificació en el genoma.

Les MT de *Tetrahymena* són les úniques que presenten triplets i doblets Cys en una mateixa seqüència. En les MT de *Tetrahymena*, a més, aquesta característica sembla associar-se a la seva resposta a inducció: l'expressió de les MT amb triplets Cys sol ésser induïda per Cd, mentre les MT que no en presenten solen ésser induïdes per Cu (Santovito *et al.*, 2001; Shang *et al.*, 2002). Curiosament, en *C.sapidus* s'observa una relació en sentit invers: els triplets Cys estan presents en la MT induïda per Cu, per la qual cosa no sembla que hi hagi relació directa entre aquesta disposició i les preferències de coordinació metàl·lica d'una MT.

Les MT de *Tetrahymena* podrien presentar un comportament coordinant i estructuració especials

Actualment, es disposa de molt poques dades sobre la funcionalitat de les MT de *Tetrahymena*. La disposició de Cys en triplets s'observa molt rarament en les proteïnes i no es tenen dades estructurals associades. Alguns resultats d'estudis cromatogràfics suggereixen que la MT de *Tetrahymena* no adoptaria una forma globular. Respecte la capacitat coordinant, existeixen evidències que *MTT1* i *MT1* de *T.termophila* són capaces de coordinar 16 i 12 ions de Cd, respectivament (Dondero *et al.*, 2004; Piccinni *et al.*, 1994).

6.6- El sistema MT en la planta *Quercus suber*

Les MT de planta tenen dominis sense Cys i diversos patrons de Cys

Les MT de planta no s'alineen amb les MT de mamífer, raó per la qual se les havia inclòs dins la Classe II, i ara formen la família 15 segons la classificació de Binz i Kägi. Aquesta família es caracteritza per la presència d'un domini sense Cys entre els dominis cisteïnics, que rep el nom d'*espaiador*. S'han fet diverses subclassificacions de les MT d'aquesta família en funció de la posició i mida de l'*espaiador* i dels patrons de Cys dels dos dominis cisteïnics. Actualment, la

classificació de les MT de planta proposada per Cobbet i Goldsbrough (Cobbett & Goldsbrough, 2002), completa la classificació general proposada per Binz i Kägi el 2001. Segons aquests primers autors, les MT de planta es divideixen en 4 tipus principals (Fig. 23). Les MT de tipus 1 contenen 6 motius Cys-X-Cys, 3 a cadascun dels extrems de la seqüència. L'espaiador compta amb uns 40 residus i conté aminoàcids aromàtics. Dins d'aquest tipus, s'hi inclouen també les MT de Brassicàcies, amb un espaiador més curt. Les MT de tipus 2 són similars a les de tipus 1, però es caracteritzen per tenir un doblet Cys addicional en el domini cisteïníc N-terminal. Les MT de tipus 3 presenten la particularitat de tenir només 4 Cys en el seu domini cisteïníc N-terminal. Per acabar, les MT de tipus 4 o Ec, enlloc de tenir dos dominis cisteïnics, en tenen 3, separats entre ells per espaiadors d'entre 10 i 15 aminoàcids.

Tot i que inicialment es suposava que en les plantes no hi havia MT i la funció de detoxificació era duta a terme per les fitquelatines, darrerament s'ha demostrat que la presència de MT en les plantes és un fet habitual, i que moltes plantes contenen múltiples isoformes MT que pertanyen a als diversos tipus esmentats anteriorment (Giritch *et al.*, 1998).

Els patrons tissulars i temporals d'expressió suggereixen especialització funcional depenent de tipus

Les MT de tipus 1 es solen aïllar en arrels, i les de tipus 2 en fulles (Cobbett & Goldsbrough, 2002), mentre les MT de tipus 3 s'expressen principalment en fruits madurs (Ledger & Gardner, 1994; Clendennen & May, 1997) i les de tipus 4 es troben principalment en llavors (Kawashima *et al.*, 1992; Liu *et al.*, 1995a). Aquesta associació entre patrons d'expressió i característiques de seqüència de les MT de planta suggereix una relació estructura-funció, relació que no està encara explicada per característiques funcionals concretes.

la síntesi de les MT de planta rarament s'indueix en resposta a Cd, i en canvi sol respondre a Cu o altres factors no relacionats directament amb els metalls (Murphy & Taiz, 1995; García-Hernandez *et al.*, 1998; Cobbett & Goldsbrough, 2002; Brkljacic *et al.*, 2004; Roosens *et al.*, 2004). Així doncs, els nivells alts de MT de planta es correlacionen positivament amb la presència de Cu (Murphy *et al.*, 1997). A més, el Cu és el metall que solen presentar les MT de planta purificades de teixits nadius (Murphy *et al.*, 1997) i front al qual demostren tenir un major poder detoxificant de forma general (Cobbett & Goldsbrough, 2002), poder que exerceixen tant en plantes, com en ésser expressades heteròlogament en llevat (Zhou & Goldsbrough, 1994). De forma complementària, les PC mostren tenir poca capacitat detoxificadora enfront de Cu (Howden *et al.*, 1995).

Per tot això, es considera que les PC tenen per paper la detoxificació de metalls tòxics (Cd), mentre les MT s'ocupen de la homeòstasi de metalls fisiològics (Cu) (Cobbett & Goldsbrough, 2002), i que el paper detoxificador de les MT es desenvoluparia en un pla temporal: les PC constituïrien la resposta ràpida d'acumulació i les MT serien la resposta lenta de redistribució (Morris *et al.*, 1999).

Les MT de planta estan relacionades amb l'estrès oxidatiu

S'ha comprovat també que els nivells de MT de planta estan incrementats en els teixits senescents (Cobbett & Goldsbrough, 2002), tant per processos d'envelliment (Butt *et al.*, 1998) com per processos estacionals (Coupe *et al.*, 1995; Davies & Robinson, 2000). L'estrès oxidatiu juga un paper actiu en la senescència, a través de les espècies reactives d'oxigen (ROS) generats en la cèl·lula senescent. Els ROS activen la síntesi de MT de planta possiblement mitjançant l'activació de les caixes ARE presents en els promotors dels gens que les codifiquen. Aquesta activació permetria que les MT protegissin les estructures cel·lulars de lesions per ROS (Buchanan-

Wollaston, 1994; Coupe *et al.*, 1995; Navabpour *et al.*, 2003) mitjançant mecanismes descrits per a les MT en general en aquesta introducció.

Estudis funcionals i estructurals en MT de planta

El coneixement de les propietats coordinants i estructurals de les MT de planta és encara molt incipient. Els estudis d'unió a metalls s'han realitzat principalment per síntesi heteròloga en medis suplementats amb metalls, ja que els agregats metall-MT resulten molt degradats durant el seu procés de purificació. Els resultats indiquen que l'afinitat cap als metalls seguiria un ordre de preferència del tipus Cd > Cu > Zn > Fe en les MT de *V.fava* (Foley *et al.*, 1997), mentre els pH de dissociació indiquen, en PsMTA de *P.sativum*, una afinitat major pel Cu que pel Cd o el Zn (Tommey *et al.*, 1991).

Una comparació general indica que les mostres analitzades de complexes metall-MT de plantes, tant nadius com recombinants, mostren un contingut global de Cu més elevat que de Cd i Zn (Taula 2, pàg. 30), com és habitual en MTs d'animals.

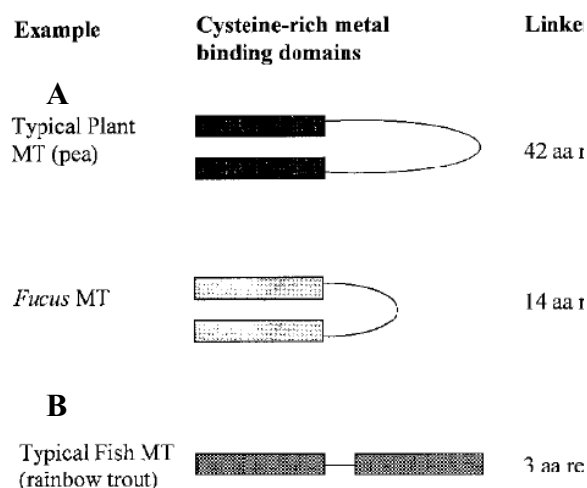


Fig. 25- Les MT de planta, depenent de la interacció entre els seus dominis podrien generar estructures en forma de *pinça* (A) o en forma de *pesa* (B). En aquest esquema, de Morris *et al.*, 1999, es proposa l'estructura en forma de *pinça* per a les MT de planta de *P.sativum* i la MT de *F. vesiculosus*, en comparació amb la MT de peix, que té una estructura en forma de *pesa*.

Tal com s'ha comentat en la secció sobre l'estructura terciària de les MT, per a les MT de planta s'han proposat diversos models de plegament. Els dos models proposats són: el model "de pesa", similar al de les MT de vertebrat, en què els dominis cisteínics formen cadascun d'ells un agregat metàl·lic, o bé el model de "pinça", en què els dos dominis cisteínics col·laboren per a formar un únic *cluster* metàl·lic (Fig. 25).

Des d'un punt de vista experimental, la síntesi heteròloga de la PsMTA de *P.sativum* en *E.coli* resultà en agregats metàl·lics la caracterització dels quals indicava que es formava un únic *cluster* metàl·lic format per la interacció dels dos dominis cisteínics, i que l'espaiador era proteolitzat posteriorment, possiblement durant la purificació (Kille *et al.*, 1991; Tommey *et al.*, 1991). En el model en forma "de pesa" l'espaiador tindria la funció de facilitar la interacció entre els dos dominis. Estudis computacionals prediuen que en la

MT de la planta *A.chinensis*, l'espaiador contindria 2 β -sheet i 3 β -turns que configurarien una forma de U (Zhu, 2000), apropant, més que separant, els dos dominis cisteínics. Els estudis de modelatge molecular per *threading* (predicció per semblança de seqüència/estructura) prediuen en el cas de *M.guttatus*, *T.durum*, *A.chinensis*, *T.caerulescens* i *A.thaliana* (de Miranda *et al.*, 1990; Zhu, 2000; Roosens *et al.*, 2004; Bilecen *et al.*, 2005;) que els dominis cisteínics formarien *clusters* metàl·lics independents, amb una estructura en forma de *pesa*. A més d'aquestes dades de predicció d'estructura, s'ha observat per DC que en l'acidificació de la MT de *F.vesiculosus*, aquesta MT allibera els metalls en dues fases, que els autors interpreten com l'alliberament des de dos dominis independents (Merrifield *et al.*, 2006).

Metall suplementat en el medi	Zn	Cd	Cu	Zn, Cd, Cu, Fe	Refs.	
Tipus	isoforma	Contingut metàl·lic dels agregats				
I	<i>V.fava</i> MT1a	2.6 Zn ³	---	---	1.7 Cd 1 Cu 0.1 Zn	Foley <i>et al.</i> , 1997
	<i>V.fava</i> MT1b	3.25 Zn ³	---	---	2 Cd 0.4 Cu 0.02 Zn	Foley <i>et al.</i> , 1997
	<i>A.thaliana</i> MT1	---	---	7.3 Cu ²	---	Murphy <i>et al.</i> , 1997
	<i>P.sativum</i> MT	6 / 11.5 Zn ¹	4 / 5.7Cd ¹	6.17 Cu ¹	---	Tommey <i>et al.</i> , 1991
		--	6.1 Cd	--	--	Kille <i>et al.</i> , 1991
II	<i>L.esculetum</i> MT	---	5.8 Cd	---	---	Rausser <i>et al.</i> , 1987
	<i>V.fava</i> MT2	3.95 Zn	---	---	2 Cd 0.4 Cu 0.1 Zn	Foley <i>et al.</i> , 1997
	<i>A.thaliana</i> MT2	---	---	5.5 Cu ²	---	Murphy <i>et al.</i> , 1997
III	<i>A.thaliana</i> MT3	---	---	8.45 Cu ²	---	Murphy <i>et al.</i> , 1997
IV/Ec	<i>T.aestivum</i>	5 Zn*	---	---	---	Robinson <i>et al.</i> , 1993
	<i>Zea mays</i>	---	8 Cd*	---	---	Bernhard <i>et al.</i> , 1987
	<i>S.indicum</i>	2 Zn	---	2 Cu	---	Chyan <i>et al.</i> , 2005
? ₃	<i>F.vesiculosus</i> MT	---	7 Cd	13 Cu ²	---	Merrifield <i>et al.</i> , 2006
		6 Zn ²	6 Cd			Merrifield <i>et al.</i> , 2006

Taula 2- Taula general de dades de capacitats quelatants de les MT de planta. Les dades es refereixen a la proporció metall/proteïna dels agregats obtinguts en síntesi heteròloga en medis suplementats en el metall/metalls indicats a la primera fila. *En els casos marcats amb un asterisc, els agregats metall-MT s'obtingueren directament de la planta. ¹Els autors adverteixen de possibles errors en la mesura de l'estequiometria metall/MT. ² Agregats metall-proteïna obtinguts per reconstitució *in vitro* de la proteïna. ³ La MT de *F. vesiculosus* podria pertànyer al tipus I, subtipus brassicàcies, però la seva classificació és controvertida.