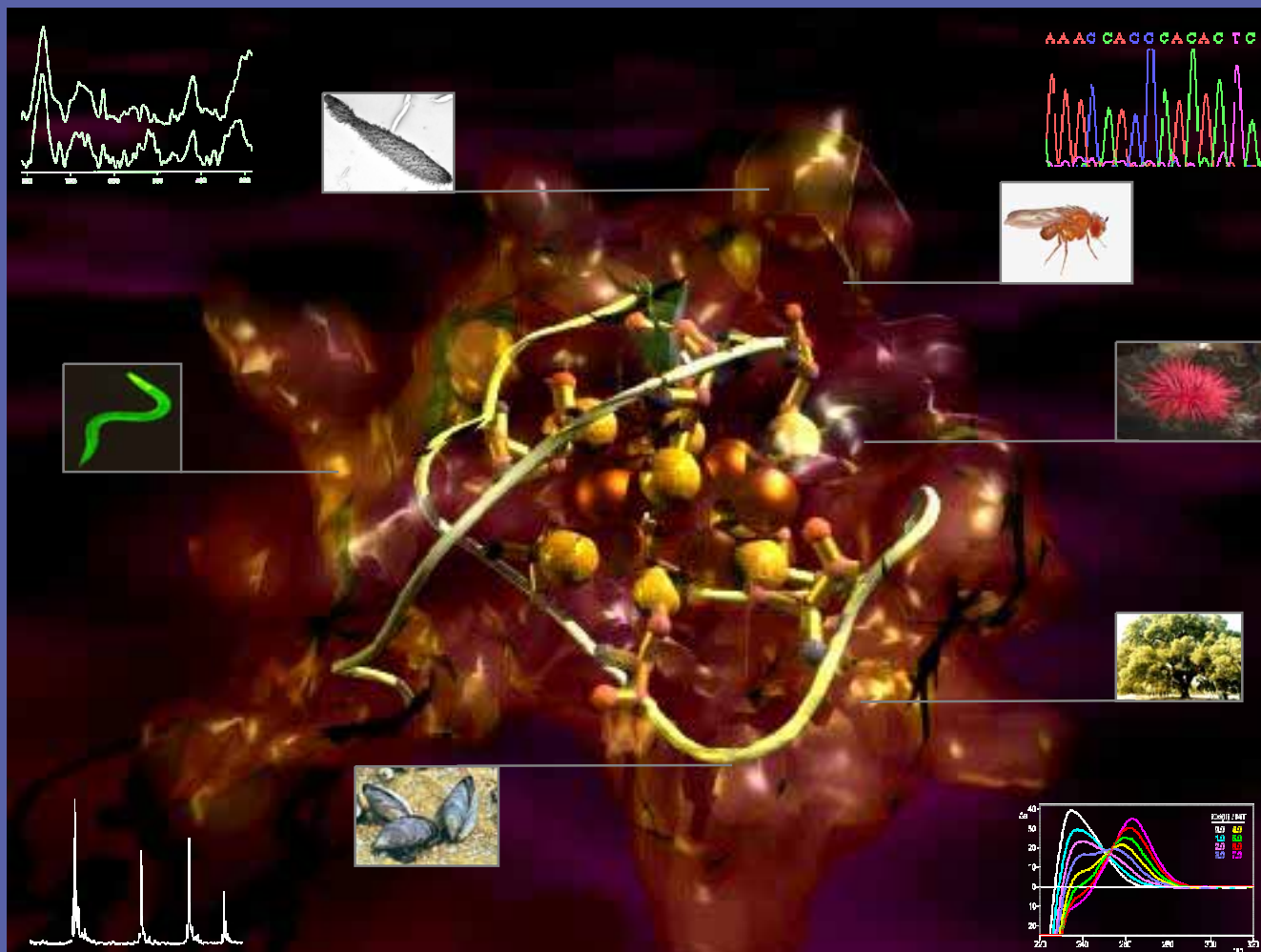


Estudi de la relació estructura/funció en Metal·lotioneïnes d'Invertebrats, Protozoous i Plantes

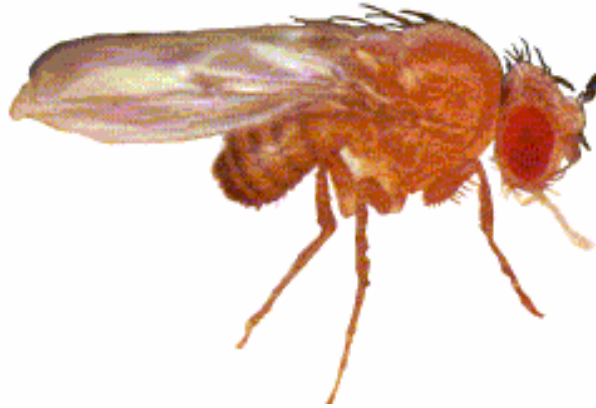


Jordi Domènech Casal

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.

CAPÍTOL 1: EL SISTEMA MT DE *Drosophila melanogaster*



Tant els patrons d'expressió com les capacitats detoxificants, suggereixen una possible especialització funcional de les 4 isoformes del sistema MT de *D.melanogaster*. Es pot determinar aquesta especialització funcional? Quines són les aptituds de cadascuna de les isoformes per a la unió de metalls? Es corresponen amb el seu paper en detoxificació metàl·lica específica o un paper homeostàtic en *D.melanogaster*?

Per respondre aquestes qüestions, i tot prosseguint els treballs realitzats en aquest grup de recerca per M.Valls *et al.* (2000) en estudiar les propietats coordinants de l'isoforma MtnA amb Zn i Cu, en aquesta tesi s'ha dut a terme la síntesi heteròloga i caracterització de MtnA, MtnB, MtnC i MtnD com a complexos amb Zn, Cu o Cd, i s'han analitzat les propietats dels agregats obtinguts en cada cas, en relació amb les seves aptituds detoxificadoras en *D.melanogaster*.

Aquests estudis s'han dut a terme en col·laboració amb els grups de recerca dirigits per la Dra. Mercè Capdevila, del Departament de Química de la Universitat Autònoma de Barcelona, i el grup de recerca del Prof. Walter Schaffner, de l'Institut de Biologia Molecular de la Universitat de Zurich (Suïssa).

Article 1- Domènech J, Palacios O, Villarreal L, Gonzalez-Duarte P, Capdevila M, Atrian S
MTO: the second member of a *Drosophila* dual copper-thionein system.
FEBS Lett (2003), 533(1-3): 72-8

Presentació:

En aquest article s'aborda la caracterització de les propietats funcionals de la isoforma MtnB (també anomenada Mto) de *Drosophila melanogaster* mitjançant la síntesi heteròloga i l'estudi de les propietats dels agregats Zn-MtnB i Cu-MtnB. El cDNA de *MtnB* fou amablement cedit pel Dr. Maurice Wegnez, de la Universitat Paris XI. El clonatge, síntesi i l'estudi de la capacitat quelatant global dels agregats Zn-MTNB i Cu-MTNB obtinguts *in vivo* s'han realitzat com a part d'aquesta tesi. L'aprofundiment en les propietats coordinants i estructurals d'aquesta MT i l'estudi del seu comportament al llarg de valoracions *in vitro* ha estat dut a terme per Òscar Palacios i Laura Villarreal, sota la direcció respectiva de les Dres. Pilar González i Mercè Capdevila, de la Universitat Autònoma de Barcelona.

Resum:

Les propietats en la unió de metalls de la MtnB (MTO) de *Drosophila* s'han estudiat en comparació amb les de la seva paràloga MtnA, per tal de clarificar el caràcter de Zn- o Cu-tioneïna de MtnB. Aquest estudi s'ha dut a terme mitjançant una combinació de metodologies d'estudi *in vivo*, *in vitro* i *in silico*. Els resultats obtinguts permeten classificar inequívocament MtnB com una segona Cu-tioneïna de *Drosophila*, organisme que queda definit com l'únic metazou en què no s'han descrit Zn-tioneïnes. Així mateix, es demostra que les diferències en el comportament coordinant de les dues MT són molt petites, però suggereixen un cert grau d'especialització de MtnB cap a la detoxificació de Cd, enfront de MtnA, que restaria més relacionada amb l'homeòstasi i/o el metabolisme del Cu.

L'ARTICLE ÉS INCLÒS A LA VERSIÓ IMPRESA DE LA TESI, PERÒ PER TAL DE RESPECTAR ELS DRETS DE L'EDITOR, NO S'HA INCLÒS EN LA VERSIÓ DE LA TESI DISPONIBLE EN XARXA. PER AIXÒ S'HA AFEGIT LA CITA DE L'ARTICLE PUBLICAT.

Article 2- Egli D, Domènech J, Selvaraj A, Balamurugan K, Hua H, Capdevila M, Oleg Georgiev, Schaffner W., Atrian S. The four members of the *Drosophila* metallothionein family exhibit distinct yet overlapping roles in heavy metal homeostasis and detoxification. **Genes to Cells.** (2006). 11, 647-658

Presentació:

Aquest article presenta els resultats obtinguts en l'estudi de les propietats coordinants i detoxificadoras *in vivo* de les 4 isoformes que conformen el sistema MT en *D.melanogaster*.

Els cDNA codificants de les isoformes MtnC i MtnD varen ser aïllats i cedits pel Prof. Schaffner, de la Universitat de Zurich. Els clons recombinants MtnA i MtnB usats en aquest estudi provenen d'estudis anteriors en el mateix grup (Valls *et al.*, 2000 i Article 1 d'aquesta tesi). Com a part d'aquesta tesi, s'ha dut a terme la síntesi recombinant de MtnC i MtnD com agregats de Zn, Cu i Cd i la seva caracterització. L'anàlisi comparativa de les dades obtingudes per a les 4 isoformes MT, es discuteix en aquest article en relació a l'estudi de les propietats detoxificants que presenten aquestes en l'organisme viu caracteritzades pel grup de recerca del Dr. Schaffner, gràcies a la construcció de soques de *D.melanogaster* defectives per a cadascuna d'elles, per a diferents combinacions de 2 o 3 formes, o mutants *knock-out* totals.

Resum:

Els gens de les 4 isoformes MT presents a *Drosophila* són induïts transcripcionalment per metalls pesants a través del mateix factor de transcripció, dMTF-1. Mitjançant construcció de *knock-outs* es demostra en aquest estudi que les 4 MT presenten papers diferents en la homeòstasi i la defensa contra la toxicitat per metalls. Les mosques defectives en MtnA són les més sensibles a la toxicitat per Cu, mentre les defectives en MtnB són les més sensibles per enfront a Cd. Pel que fa a la seva regulació, els estudis amb gens *reporters* i per quantificació de mRNA, indiquen que MtnA és preferencialment induït per Cu, mentre MtnB és preferencialment induït per Cd. Aquests resultats es corresponen amb una major estabilitat observada per als agregats Cu-MtnA i Cd-MtnB, que es dedueix de la seva estequiometria i característiques espectromètriques i espectroscòpiques. Finalment, MtnC i MtnD, ambdues molt similars a MtnB, mostren capacitats d'enllaç de Cd i Cu menors que MtnA i MtnB. Els mutants *Drosophila* defectius en MtnC o MtnD mostren només defectes molt lleus en la tolerància a l'excés de metalls, la qual cosa es correspon amb la menor capacitat d'unió de metalls. La sobreexpressió ectòpica de cadascun dels 4 gens en ull mostra que MtnA i MtnB són capaces de rescatar el fenotip de "*rough eye*" causat per exposició al Cu, mentre MtnC i MtnD no ho fan. En conjunt, les capacitats de detoxificació específiques *in vivo* davant el Cu i el Cd de MtnA i MtnB serien, respectivament, el resultat combinat de la regulació dels seus promotors i les seves capacitats d'unió a metalls.

L'ARTICLE ÉS INCLÒS A LA VERSIÓ IMPRESA DE LA TESI, PERÒ PER TAL DE RESPECTAR ELS DRETS DE L'EDITOR, NO S'HA INCLÒS EN LA VERSIÓ DE LA TESI DISPONIBLE EN XARXA. PER AIXÒ S'HA AFEGIT LA CITA DE L'ARTICLE PUBLICAT.

**CAPÍTOL 2: MT D'INVERTEBRATS I PROTOZOU:
QUATRE CASOS MODEL EN L'ESTUDI D'AQUESTES MT**

Article 3- Aprofundiment en el coneixement de les característiques coordinants de la metal·lotioneïna SpMTA de l'equinoderm *S.purpuratus*. (Article en redacció)



Presentació

Les MT d'equinoderm són homòlogues, tant a nivell d'estructura primària com terciària a les MT de mamífer. Les MT d'equinoderm presenten els dos dominis *alfa* i *beta* en disposició invertida respecte les MT de vertebrats. La determinació per NMR de l'estructura 3D de Cd-SpMTA de *S.purpuratus* mostrà que la Phe, un aminoàcid aromàtic que no està present en les MT de mamífer, queda exposada a solvent, i per tant, pot condicionar les propietats d'aquesta MT. S'ha proposat que aquesta Phe mediatitza l'interacció amb altres proteïnes, però no s'ha explorat el seu paper en la formació de dímers MT, observats en Cd-SpMTA.

El sistema MT de *S.purpuratus* inclou dues MT, SpMTA i SpMTB, amb patrons d'expressió regulats molt estrictament, tant tissularment com per la seva resposta a metalls. Donada la seva inducció per baixos nivells de Zn, SpMTA sembla ésser una MT candidata a participar en la homeòstasi de metalls, però el seu comportament coordinant ha estat estudiat només davant de metalls xenobiòtics, com el Cd. L'estudi de les propietats coordinants ha estat clau en altres sistemes MT que presenten patrons d'expressió molt definits (*Drosophila*) per a confirmar una possible especificitat funcional, i la seva base molecular. En els equinoderms aquesta relació està encara per determinar.

Resum:

En aquest article es presenta la caracterització del comportament coordinant de la SpMTA de *S.purpuratus*. El cDNA de SpMTA fou cedit amablement pel Prof. J.H.R. Kägi, de la Universitat de Zurich (Suïssa). En aquesta tesi s'ha obtingut el plasmidi recombinant i s'han fet les síntesis heteròlogues i purificacions dels agregats Zn-, Cd- i Cu-SpMTA, i s'ha caracteritzat el comportament coordinant *in vivo* enfront d'aquests tres metalls.

S'ha estudiat també el comportament *in vitro* de Zn-SpMTA en estudis de valoracions amb Zn o Cu, duts a terme pel Dr. Roger Bofill, del grup de recerca dirigit per la Dra. Mercè Capdevila, a la Universitat Autònoma de Barcelona.

Aprofundiment en el coneixement de les característiques coordinants de la metal·lotioneïna SpMTA de l'equinoderm *S.purpuratus*.

ABSTRACT

Les metal·lotioneïnes (MT) d'equinoderm presenten homologia estructural amb les MT de vertebrat, amb què s'ha proposat que tindrien una relació evolutiva consistent en un fenomen d'*exon-shuffling* entre les regions codificants pels dominis *alfa* i *beta*. En les MT de vertebrat s'ha descrit un certa especialització funcional depenent d'isoforma en la unió a metalls, però no es coneix si aquesta especialització existeix també en equinoderms. Les diferències entre els patrons d'expressió de les dues MT de l'equinoderm *Strongylocentrotus purpuratus*, SpMTA i SpMTB, suggereixen que aquestes isoformes presenten especificitat funcional. En aquest estudi s'ha dut a terme la caracterització de les propietats coordinants de SpMTA mitjançant la seva síntesi heteròloga en *E.coli* en medis rics en Zn, Cd o Cu i la caracterització dels agregats metall-SpMTA resultants per tècniques analítiques (ICP-AES, GC-FPD), espectromètriques (TOF-ESI-MS) i espectroscòpiques (CD, UV-vis). En ésser sintetitzada en medi ric en Zn, SpMTA dona lloc a una mescla atípica d'agregats: Zn₇SpMTA, Zn₃SpMTA, Zn₄SpMTA. La valoració *in vitro* de Zn-SpMTA amb Cd(II) o Cu(I) dona lloc a agregats Cd-SpMTA i Cu-SpMTA diferents als obtinguts *in vivo*. La presència i participació d'ions sulfur en els agregats metall-SpMTA ha estat detectada per als complexos amb Zn, Cd i Cu.

Keywords: *Strongylocentrotus purpuratus*, metallothionein, SpMTA, sulfide, metal coordination, Zn(II) binding, Cu(I) binding, Cd(II) binding, *alpha* domain, *beta* domain.

INTRODUCCIÓ

Les metal·lotioneïnes (MT) són proteïnes de baix pes molecular riques en cisteïna, a través de les quals coordinen metalls pesants (Kägi, 1993). Membres d'aquesta família de proteïnes són presents a animals, plantes, protozous i procariotes, però presenten seqüències molt heterogènies. Les MT estan classificades en 15 famílies en funció de criteris taxonòmics de i la seva estructura primària (Binz & Kägi, 2001). Les MT de vertebrat constitueixen la família 1, i són considerades les MT paradigmàtiques. Presenten homologia entre elles, però no amb la resta de MT. La seva seqüència proteica (60-68 aminoàcids) dona lloc a 2 dominis rics en Cys separats per un espaiador de 2-3 aminoàcids. El domini *alfa*, situat a l'extrem C-term, conté 11 Cys i uneix 4 ions divalents, formant un *cluster* metàl·lic anomenat *cluster* A. El domini *beta*, situat a l'extrem N-term, conté 9 Cys i uneix 3 ions divalents, formant un *cluster* metàl·lic anomenat *cluster* B (Furey *et al.*, 1987). Aquesta distribució en els dos dominis *beta-alfa* és exclusiva de vertebrats, però en determinar l'estructura 3D d'una MT d'equinoderm (SpMTA) per NMR, es va concloure que aquesta donava lloc a dos dominis equivalents, però en posició invertida en la cadena polipeptídica respecte les MT de vertebrat: el domini *alfa* es situa com a N-terminal i el domini *beta* com a C-terminal (Wang *et al.*, 1995; Riek *et al.*, 1999). Aquesta disposició de dominis podria implicar connexions evolutives importants entre les MT de vertebrats i d'equinoderm, suggerint un fenomen d'*exon-shuffling* (Harlow *et al.*, 1989).

Les MT presenten preferències d'unió a metalls que han estat relacionades amb una especialització funcional depenent d'isoforma. Mitjançant l'estudi dels agregats que formen amb diversos metalls (Zn, Cd, Cu,...) s'ha atribuït a les de MT llevat (Bertini *et al.*, 2000; Cobine *et al.*, 2004), i les MT de *Drosophila* MtnA (Valls *et al.*, 2000), MtnB (Domenech *et al.*, 2003), MtnC i MtnD (Egli *et al.*, 2006) una preferència d'enllaç per al Cu(I) (Cu-tioneïnes), mentre la MT de crustaci MTH (Valls *et al.*, 2001), mostra preferència per al Zn(II) i el Cd(II) (Zn-tioneïnes). En mamífers, s'han descrit quatre isoformes homòlogues MT1, MT2, MT3 i MT4, que presenten diferències en les seves seqüències i patrons d'expressió. Estudis de les propietats coordinants de MT1, MT4 i la MT de pollastre indiquen que aquestes MT presenten també un cert grau d'especialització funcional cap a Zn-tioneïna (MT1 o MT de pollastre) o Cu-tioneïna (MT4) (Bofill *et al.*, 2001; Tio *et al.*, 2004; Villarreal *et al.*, 2006).

Les dades referents a especificitat funcional de les MT d'equinoderm es centren principalment en els seus patrons d'inducció i l'estudi dels promotors dels seus gens. L'equinoderm *Strongylocentrotus purpuratus* presenta dues isoformes de MT, SpMTA i SpMTB, que mostren comportaments diferents, tant d'expressió tissular com de resposta a metalls, (Nemer *et al.*, 1984; Wilkinson & Nemer, 1987; Nemer *et al.*, 1991; Nemer *et al.*, 1995), fet que suggereix la possibilitat que duguin a terme tasques específiques. Aquest estudi té per objectiu la caracterització del comportament coordinant de SpMTA de l'equinoderm *S. purpuratus*, mitjançant la síntesi heteròloga en *E.coli* d'agregats Zn-SpMTA, Cd-SpMTA i Cu-SpMTA i la caracterització de les seves propietats coordinants.

MATERIAL I MÈTODES

Clonatge del cDNA SpMTA en el vector d'expressió pGEX4T2

El cDNA codificant per a SpMTA ha estat amablement cedit pel Prof. J.H.R.Kägi, del Departament de Bioquímica de la Universitat de Zurich. Ha estat amplificat per PCR mitjançant els oligonucleòtids 5SUMTA (5'-CCCGGATCCATGCCTGATGTCAAG 3') i 3SUMTA (5'GCGCCCGTCCGACCTAGCATGCACA 3'), que introdueixen una diana de restricció *Bam*HI immediatament a 5' del codó ATG, i una diana de restricció *Sall* immediatament a 3' del codó

STOP. La reacció de PCR s'ha dut a terme en 30 cicles d'amplificació en les condicions següents: 45 s a 95 °C (desnaturalització), 30 s a 59 °C (anellament) i 45 s a 72 °C (elongació).

La mida del producte de PCR resultant ha estat confirmada per electroforesi en gel d'agarosa tenyit amb bromur d'etidi, i el fragment purificat ha estat clonat direccionalment al MCS del vector d'expressió pGEX4T2 (Amersham Pharmacia). El plasmidi *pGEX-SpMTA* resultant ha estat transformat en cèl·lules *E.coli* BL21. La integritat i identitat de l'insert s'ha confirmat mitjançant seqüenciació (ABIPRISM Dye Terminator-Cycle Sequencing Ready reaction kit (Perkin Elmer)).

Síntesi in vivo i purificació dels agregats metall-SpMTA recombinant

El pèptid recombinant SpMTA ha estat sintetitzat en cultius de LB de 3 l, inoculats amb 300 ml de pre-cultiu de cèl·lules d'*E.coli* portadores del plasmidi *pGEX-SpMTA* crescuts a 37 °C durant 12 h. La síntesi s'ha induït amb IPTG quan el cultiu ha assolit una OD₆₀₀ de 0.8 i els cultius han continuat en creixement durant 3 h més, amb un suplement de metalls a una concentració final de 300 µM CdCl₂, 500 µM CuSO₄ o 300 µM ZnCl₂. Per centrifugació (Sorvall RC5C, 15 min a 9600 x g) s'han recuperat les cèl·lules bacterianes, que han estat ressuspeses en PBSx1, 0.5% β-mercaptoetanol. A partir d'aquest pas, tots els processos s'han dut a terme utilitzant solucions saturades amb argó i minimitzant el contacte amb l'aire, per a evitar l'oxidació dels pèptids. La solució obtinguda ha estat sonicada (Branson sonifier 250) a 0.6 Hz durant 12 min, i s'han separat les restes cel·lulars per centrifugació (20 min a 20000 x g). Els pèptids de fusió GST-SpMTA han estat purificats del sobrenedant mitjançant cromatografia d'afinitat amb Glutathione-Sepharose 4B (Amersham Pharmacia). Els agregats metall-SpMTA han estat separats de la fracció GST mitjançant digestió amb trombina i una nova ronda de cromatografia d'afinitat. La solució obtinguda s'ha concentrat amb Centriprep Microcon 3 (Amicon) i els agregats metall-SpMTA han estat finalment purificats per FPLC en una columna Superdex75 (Amersham Pharmacia Biotech) equilibrada amb Tris-HCl 50 mM a pH 7.0. S'han recollit les fraccions que presentaven absorbància a 254 nm. En tots els casos, les fraccions seleccionades s'han conservat a -80 °C fins al moment de la determinació de les seves propietats.

Anàlisi i caracterització dels agregats metall-SpMTA

Per a cada preparació de SpMTA obtinguda en medis rics en Zn, Cd o Cu, s'ha analitzat el contingut de S, Zn, Cu i Cd per ICP-AES (Espectroscòpia d'Emissió Atòmica de Plasma Acoblat per Inducció). S'ha usat un espectropolarímetre Polyscan 61E (Thermo Jarrell Ash), detectant el S a 182.040 nm, el Zn a 213.856 nm, el Cu a 324.803 nm i el Cd a 228.802 nm. Les mostres han estat preparades seguint el mètode descrit per Bongers *et al.* (1988). Alternativament, s'ha aplicat una modificació del mètode, consistent en la incubació de les mostres en 1M HCl durant 5 min a 65 °C, tal com es descriu a Capdevila *et al.* (2005). Aquesta modificació té per objectiu l'alliberament dels possibles ions de sulfur (S²⁻) presents a la mostra, i és anomenada ICP_{àcid} en aquest article. La concentració de proteïna s'ha calculat a partir del contingut de S en la mostra mesurat per ICP_{àcid}, assumint que tots els àtoms de S provenien de les metionines i cisteïnes contingudes en el pèptid recombinant SpMTA, per tant, 21 àtoms de S per molècula (20 residus Cys i 1 residu Met). El contingut mitjà d'ions sulfur per pèptid s'ha mesurat per GC-FPD (Cromatografia de Gasos acoblada a un Detector Fotomètric de Flama), tal com es descriu a Capdevila *et al.* (2005).

Anàlisi espectroscòpica i espectromètrica dels agregats metall-SpMTA

Les mesures de CD (Dicroisme Circular) dels agregats metall-MT recombinants de Zn, Cd i Cu i dels obtinguts en les valoracions amb Cd i Cu han estat obtingudes tal com es descriu a Bofill *et al.* (1999). S'ha usat un espectropolarímetre Jasco J715, controlat pel software J700. Les mesures d'absorció UV-vis s'han dut a terme en un espectrofotòmetre HP-8453. Tots els

espectres han estat mesurats en cubetes de quars (1 cm) i processats mitjançant el programa GRAMS32. La temperatura s'ha mantingut a 25 °C mitjançant un aparell Peltier PTC-351S.

La massa molecular dels agregats de Zn, Cu i Cd ha estat determinada per TOF-ESI-MS (Espectrometria de Masses amb Ionització per ElectroSpray i un detector de Temps de Vol), en un aparell *Ultima Micromass Instrument*, controlat pel programari *Masslynx Software* i calibrat amb NaI (0.2 g de NaI dissolts en 100 ml de mescla 50:50 H₂O:isopropanol). S'han injectat 5 µl de mostra a 40 µl/min en les següents condicions d'anàlisi: temperatura de la sonda: 150 °C; Voltatge del capil·lar: 3.0 kV; 1.5 kV; Potencial del con: 30 V. S'han registrat els espectres en un rang m/z entre 950 i 2150 a 2 s/espectre, amb un interval de 0.1s. L'eluent utilitzat ha estat una mescla 10:90 d'acetonitril amb acetat d'amoni 5 mM a pH 7. Per a l'anàlisi de les formes apo, els metalopèptids han estat demetalats per acidificació amb HCl a pH 1.5 i s'ha usat com a eluent una mescla 10:90 de metanol i formiat d'amoni a pH 1.5. Per a les mesures per TOF-ESI-MS a pH 2.5 (anomenat acidTOF-ESI-MS en aquest article), s'han usat les condicions corresponents a la forma apo, però amb el pH ajustat a 2.5. En tots els casos, les masses moleculars han estat calculades com es descriu a Fabris *et al.* (1996).

Estudis d'unió a metalls in vitro

Els estudis de desplaçament metàl·lic Zn/Cd i Zn/Cu del Zn enllaçat a Zn-SpMTA s'han dut a terme seguint les metodologies prèviament descrites per aquest grup (Tío *et al.*, 2004) i han estat monitoritzats Per CD, UV-vis i TOF-ESI-MS. Tots els assajos s'han dut a terme en atmosfera saturada d'argó.

RESULTATS I DISCUSSIÓ

La seqüència de pGEX-SpMTA ha estat confirmada per seqüenciació de DNA i el plasmidi ha estat transformat en cèl·lules d'*E.coli* per a l'expressió de la proteïna recombinant. A partir dels agregats Zn-MT obtinguts s'ha obtingut la forma apo mitjançant la seva acidificació fins a pH 1.5, i se n'ha mesurat la seva massa molecular per TOF-ESI-MS. Els resultats obtinguts (6532.4 ± 2.5 Da) es corresponen amb els esperats (6532.5 Da) per al pèptid recombinant SpMTA (que inclou la seqüència de SpMTA més dos residus addicionals -Gly i Ser- afegits a l'extrem *N-term* per l'estratègia d'expressió). Aquest resultat ha confirmat la integritat i identitat de SpMTA recombinant, i la puresa de la mostra.

Caracterització dels agregats Zn-SpMTA sintetitzats in vivo

El procés de síntesi i purificació de Zn-SpMTA es repetí diverses vegades, aconseguint resultats equivalents que indiquen que la proteïna s'elueix de la columna de Superdex75 en forma de dos pics àmpliament solapats. Els resultats obtinguts per ICP-AES i TOF-ESI-MS (Taula 1) en l'anàlisi d'aquests dos pics indiquen que en sintetitzar SpMTA en medi ric en Zn poden purificar-se dos tipus de mostres que a partir d'aquest moment anomenarem Zn-SpMTAc (completa) i Zn-SpMTAp (parcial). La mostra corresponent al primer pic (Zn-SpMTAp) conté majoritàriament Zn₇-SpMTA, acompanyada d'espècies minoritàries, i no conté les espècies Zn₃-SpMTA i Zn₄-SpMTA, que s'elueixen, juntament amb Zn₇-SpMTA, exclusivament en el segon pic de menor absorbància a 254 nm. En tots dos casos es detecten altres espècies minoritàries que contenen lligands sulfurs com és el cas de Zn₇Si-SpMTA.

Els espectres de diroisme circular (CD) (Fig. 1) de Zn-SpMTAp i Zn-SpMTAc, que són molt propers entre sí i característics de les Zn-MT, presenten absorcions en forma d'*exciton coupling* a ca. 240 nm –associats als cromòfors Zn(Cys)₄– amb petites contribucions per longituds d'ona superiors a 260 nm, i més visibles en Zn-SpMTAp, relacionades amb la presència de lligands sulfurs en aquests agregats (Capdevila *et al.*, 2005).

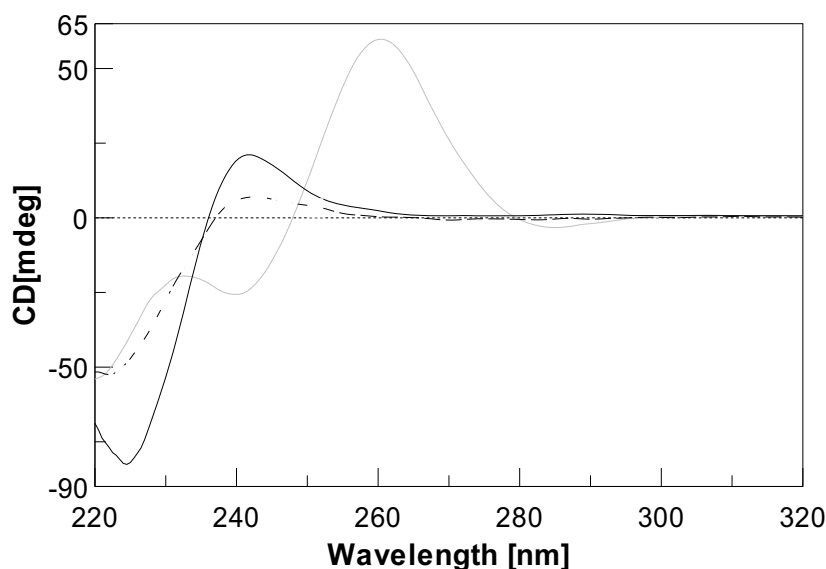


Fig. 1- Espectres de CD de les diferents mostres Zn- i Cd-SpMTA obtingudes per síntesi recombinant de SpMTA en medis rics en Zn i Cd. Zn-SpMTAp (línia negra contínua), Zn-SpMTAc (línia negra discontinua) i Cd-SpMTA (línia grisa).

La presència de Zn₃-SpMTA i Zn₄-SpMTA en les mostres Zn-SpMTAc es correlaciona amb una menor intensitat dels seus espectres de CD (menor quiralitat dels seus agregats) respecte a les preparacions Zn-SpMTAp, suggerint que Zn₃-SpMTA i Zn₄-SpMTA serien espècies menys estructurades que Zn₇-SpMTA. Aquesta observació estaria d'acord amb un cert grau d'oxidació dels complexos Zn₇-SpMTA que podria conduir a l'existència d'espècies de menor contingut

metàl·lic, Zn₃-SpMTA i Zn₄-SpMTA. Així mateix, la major intensitat d'absorció al CD que mostren les preparacions Zn-SpMTAp a longituds d'ona superiors a 260 nm també es correlaciona amb el major contingut en lligands sulfur d'aquestes respecte a Zn-SpMTAc.

	ICP-AES ^a	ICP-AES _{acid} ^b	GC-FPD ^c	ESI-TOF ^d	ESI-TOF _{acid} ^e
	Concentració del pèptid Metalls/pèptid		lons S² /Pèptid	Espècies majoritàries Espècies minoritàries	Espècies majoritàries Espècies minoritàries
Zn-SpMTAp	---	0.33 x 10⁻⁴ 7.8 Zn	1.7	Zn₇-SpMTA Zn ₆ S ₁ -SpMTA Zn ₇ S ₁ -SpMTA Zn ₈ -SpMTA	---
Zn-SpMTAc	4.2 x 10⁻⁴ 5.1 Zn	3.2 x 10⁻⁴ 6.1 Zn	0.45	Zn₇-SpMTA Zn₄-SpMTA Zn₃-SpMTA Zn ₇ S ₁ -SpMTA	---
Cd-SpMTA	1.5 x 10⁻⁴ 4.4 Cd	0.7 x 10⁻⁴ 7.7 Cd	2.0	Cd₇-SpMTA Cd ₇ S ₁ -SpMTA Cd ₆ S ₂ -SpMTA Cd ₈ -SpMTA	---
Cu-SpMTA Tipus 1	0.4 x 10⁻⁴ 2.2 Zn 5.0 Cu	0.4 x 10⁻⁴ 2.2 Zn 5.0 Cu	---	M₈-SpMTA M ₉ -SpMTA M ₄ -SpMTA M ₆ -SpMTA	Cu₈-SpMTA Cu ₄ -SpMTA
Cu-SpMTA Tipus 2	0.6 x 10⁻⁴ 1.5 Zn 8.7 Cu	0.5 x 10⁻⁴ 1.6 Zn 9.5 Cu	0.6	M₈-SpMTA M ₉ -SpMTA M ₁₀ -SpMTA M ₁₁ -SpMTA	Cu₈-SpMTA Cu ₉ -SpMTA Cu ₁₀ -SpMTA Cu ₄ -SpMTA
Cu-SpMTA Tipus 3	0.5 x 10⁻⁴ 7.2 Cu	0.4 x 10⁻⁴ 8.7 Cu	1.0	Cu₈-SpMTA Cu ₄ -SpMTA Cu ₄ S ₁ -SpMTA Cu ₈ S ₁ -SpMTA	---

Taula 1- Concentració del pèptid recombinant SpMTA i estequiometries metall/pèptid i sulfur/pèptid per als agregats obtinguts en medis rics en Zn, Cu i Cd. ^a Concentració de SpMTA i estequiometria metàl·lica calculada a partir de les mesures per ICP. ^b Concentració de SpMTA i estequiometria metall/MT calculada a partir de les mesures de S, Zn, Cd i Cu per ICP-AES_{acid}. ^c Contingut d'ions sulfur (S²⁻) a la mostra, mesurat per GC-FPD. ^d Espècies principals presents a la mostra, mesurat per TOF-ESI-MS. Per a les mostres que contenen ambdós Zn i Cu, "M" indica el nombre total de ions metàl·lics units a SpMTA, ja que degut a la similitud dels seus pesos atòmics, la discriminació entre el Zn i el Cu en un agregat no és possible per espectrometria de masses. ^e Contingut de metalls dels agregats a pH 2.5 (pH a què el Zn, però no el Cu, és alliberat de l'agregat) mesurat per ESI-TOF com en el punt (d). --- No es disposa d'aquestes dades.

Caracterització dels agregats Cd-SpMTA

La caracterització per ICP-AES i TOF-ESI-MS dels agregats Cd-SpMTA sintetitzats *in vivo* suggereix una espècie majoritària Cd-SpMTA acompanyada d'altres espècies minoritàries, amb contingut metàl·lic equiparable al de Zn-SpMTAp (Taula 1). L'espectre de CD de Cd-SpMTA és molt intens (Fig. 1), i presenta un exciton coupling centrat a 250 nm, l'absorció característica dels cromòfors Cd(Cys)₄. Les mesures per GC-FPD de Cd-SpMTA indiquen la presència mitjana de 2 ions sulfur per MT. La participació dels sulfurs en la coordinació a Cd no es detecta clarament en el CD (espectre de tipus A, segons la classificació de Capdevila *et al.* (2005), però la diferència d'intensitat entre la banda positiva a 260 nm i la negativa a 240 nm podria estar-hi relacionada.

La valoració de Zn₇-SpMTA (Zn-SpMTAp) amb Cd(II) ha permès obtenir més informació sobre els agregats Cd₇-SpMTA obtinguts *in vivo*. Per una part, aquest tractament *in vitro* de Zn₇-SpMTA amb Cd(II) ha posat de manifest la resistència que oposen els Zn inicialment coordinats a ser substituïts per Cd. Tal com es mostra a la Fig. 2, les variacions dels espectres de CD amb el temps, es necessiten temps d'estabilització elevats per tal d'aconseguir que els tres primers equivalents de Cd afegits entrin realment a coordinar-se a la proteïna.

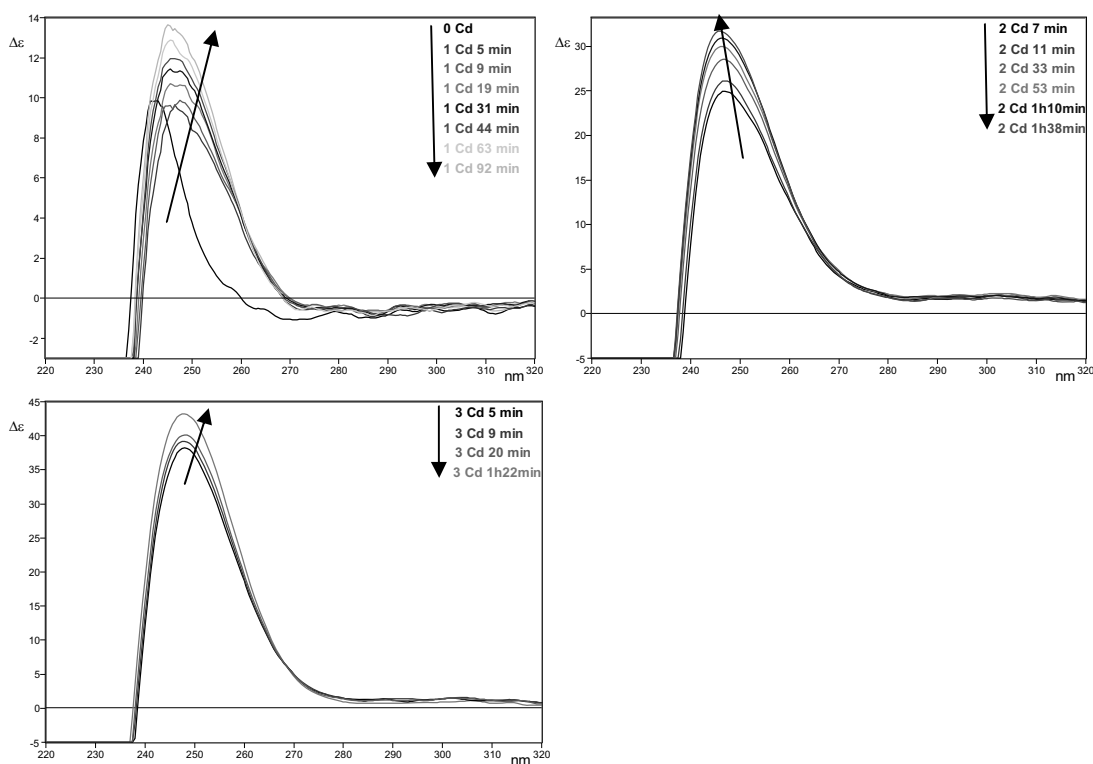


Fig. 2- Variació amb el temps dels espectres de CD enregistrats per a l'addició de 1, 2 i 3 equivalents de Cd(II) a Zn₇-SpMTA

Per altra banda, i amb independència del temps requerit per aconseguir-ho, les dades enregistrades *in vitro* mostren que els ions Cd²⁺ desplacen successivament els ions Zn²⁺ inicialment coordinats donant lloc a una variació monòtona dels espectres de CD i UV-vis fins a 6 equivalents de Cd(II) afegits (Fig. 3). Aquesta evolució dels espectres de CD és la habitual en les valoracions de Zn-MT amb Cd(II) i les dades de ESI-MS (Taula 2) mostren que paulatinament els Cd(II) van substituint els Zn(II) en el *cluster* metàl·lic de SpMTA de tal manera que el nombre d'ions Cd(II) coordinats per la MT equival al nombre d'ions afegit. Curiosament, l'addició del 7^e equivalent de Cd(II) comporta una lleuger desplaçament cap el vermell del màxim d'absorció al CD i les dades de masses mostren només lleugeres modificacions en l'especiació de la mostra de manera que Cd₆Zn₁-SpMTA continua essent l'espècie majoritària en la mostra. A partir de 7 eq de Cd(II) afegits s'observa una lleugera disminució en la intensitat dels espectres de CD fins que el senyal es satura per a 11 equivalents de Cd(II) afegits. Paradoxalment, tot i que l'espècie Cd₇-SpMTA és present en tot moment a la mostra, es passa d'una espècie Cd₆Zn₁-SpMTA majoritària tant per a 7 com 8 eq de Cd(II) afegits a Cd₈- i Cd₉-SpMTA com a les espècies més abundants per a 10 i 11 equivalents de Cd(II) afegits. Aquesta discordança estequiomètrica entre els complexos Cd-SpMTA obtinguts *in vivo* i *in vitro* es veu corroborada per les dades espectroscòpiques ja que cap dels espectres CD obtinguts al llarg de la valoració reproduïx el de l'agregat Cd₇-SpMTA obtingut *in vivo*, tal com es veu a la Fig. 4 on s'ha superposat l'espectre de CD obtingut per a 11 eq de Cd(II) afegits amb l'espectre dels agregats recombinats Cd₇-SpMTA.

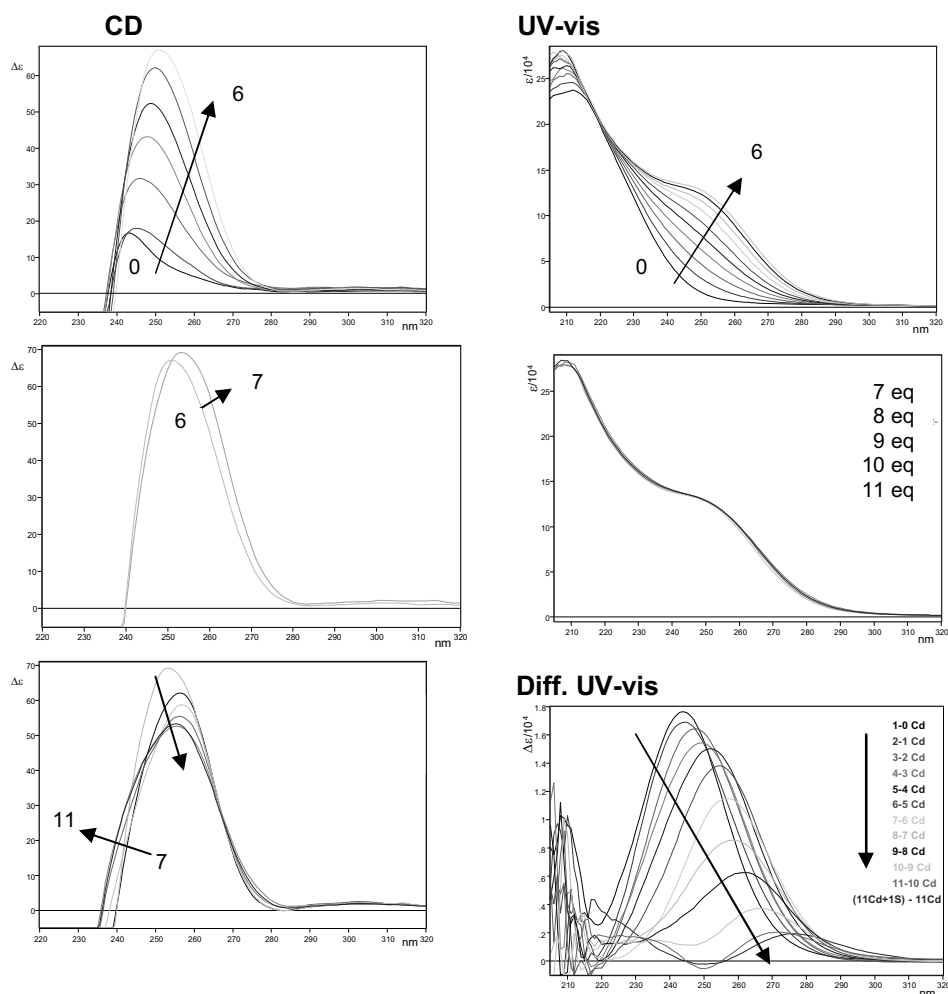


Fig. 3- Espectres CD, UV-vis, i diferència d'UV-vis obtinguts al llarg de la valoració de Zn₇-SpMTA (Zn-SpMTAp) amb Cd(II).

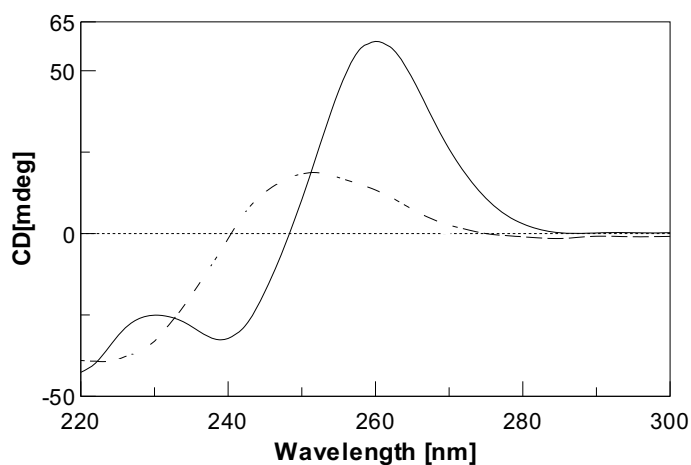


Fig. 4- Comparació de l'espectre de CD obtingut en la valoració de Zn₇-SpMTA amb Cd(II) per a 11 eq de Cd(II) afegits (línia discontinua) amb l'espectre de Cd₇-SpMTA sintetitzada *in vivo*. (línia contínua).

Eq Cd(II)	0	2	4	6	7	8	10	11
Eq S ²⁻								1
Zn ₇ -SpMTA	✓✓	◆						

Zn ₆ S ₁ -SpMTA	♦							
Zn ₇ S ₁ -SpMTA	♦							
Zn ₈ -SpMTA	♦							
Cd ₁ Zn ₆ -SpMTA		X						
Cd ₂ Zn ₅ -SpMTA		✓						
Cd ₃ Zn ₄ -SpMTA		X	X					
Cd ₄ Zn ₃ -SpMTA		♦	✓	X				
Cd ₅ Zn ₂ -SpMTA			X	✓	X	♦		
Cd ₆ Zn ₁ -SpMTA				✓	✓	✓	♦	
Cd ₇ -SpMTA				X	X	X	X	♦
Cd ₇ S ₁ -SpMTA					♦	X	X	
Cd ₇ S ₂ /Cd ₇ Zn ₁ -SpMTA					♦	♦	X	X
Cd ₇ S ₃ /Cd ₇ Zn ₁ S ₁ -SpMTA						♦	✓	✓
Cd ₈ -SpMTA							✓	✓
Cd ₈ S ₁ -SpMTA							X	✓
Cd ₈ S ₂ /Cd ₈ Zn ₁ -SpMTA							♦	X
Cd ₉ -SpMTA							♦	X
Cd ₉ S ₁ -SpMTA							♦	X

Taula 2- Espècies principals detectades per TOF-ESI-MS durant la valoració de Zn-SpMTA amb Cd(II). ✓✓=Clarament predominant; ✓=majoritari; X= intermèdia; ♦= minoritària.

Per provar la possibilitat que els lligands sulfur presents en els agregats Zn-SpMTA (1.7 S²/MT) fossin insuficients per reproduir l'estructuració de Cd-SpMTA (2.0 S²/MT), s'ha dut a terme l'addició de ions sulfur després d'haver afegit 11 eq de Cd(II) en la valoració de Zn-SpMTA. Tant les dades espectroscòpiques, (Fig. 3), com espectromètriques (Taula 2), suggereixen que l'addició d'un equivalent de sulfur de sodi pràcticament no té cap repercussió ni en l'especiació ni en les característiques espectroscòpiques de la mescla, cosa que tampoc condueix a l'obtenció de l'empremta de CD característica dels agregats Cd₇-SpMTA sintetitzats *in vivo*. Aquests resultats indiquen que la possible manca d'ions sulfur no és responsable de les diferències observades en SpMTA en la coordinació del Cd *in vivo* i *in vitro*.

Caracterització dels agregats Cu-SpMTA

En les síntesis de SpMTA en medis rics en Cu s'han obtingut resultats variables, que s'han catalogat en tres tipus diferents (Taula 1). Les preparacions de tipus 1 i de tipus 2 són heterometal·liques (Zn i Cu), però difereixen en el seu contingut metàl·lic (7 metalls/MT en les de tipus 1 enfront els 11 de les de tipus 2) essent molt més alt el contingut en Cu en les de tipus 2 (2.2 Zn : 5.0 Cu envers 1.6 Zn : 9.5 Cu). Independent d'aquesta divergència en contingut metàl·lic les dades de TOF-ESI-MS mostren que tant les de tipus 1 com les de tipus 2 contenen espècies M₈-SpMTA com a espècies majoritàries. Les mostres de tipus 3 són homometal·liques de Cu, i contenen Cu₈-SpMTA i Cu₄-SpMTA com a espècies més abundants seguides les mateixes espècies amb un lligand sulfur adicional, Cu₈S₁-SpMTA i Cu₄ S₁-SpMTA. El contingut d'ions sulfur també varia entre els diferents tipus de mostra.

És conegut que l'acidificació fins a pH 2.5 dels agregats heterometal·lics Zn,Cu-MT provoca l'alliberament del Zn, mentre el Cu resta enllaçat a la proteïna donada la major afinitat d'aquest metall pels tiolats cisteïnics. Les preparacions Cu-SpMTA de tipus 1 i 2 s'han acidificat fins a aquest pH observant-se en tots dos casos una espècie majoritària d'estequiometria Cu₈-SpMTA que suggereix que aquesta espècie homometal·lica es sintetitza en els tres tipus de produccions.

Els espectres de CD dels tres tipus de mostra (Fig. 5), es corresponen amb el seu contingut metàl·lic en quant que les dues heterometal·liques (Tipus 1 i 2) presenten unes absorcions en la zona dels 240 nm -corresponent als cromòfors Zn(SCys)₄- que són absents en la homometal·lica (Tipus 3). Per sobre d'aquesta longitud d'ona les absorcions són les característiques de les MT que contenen Cu.

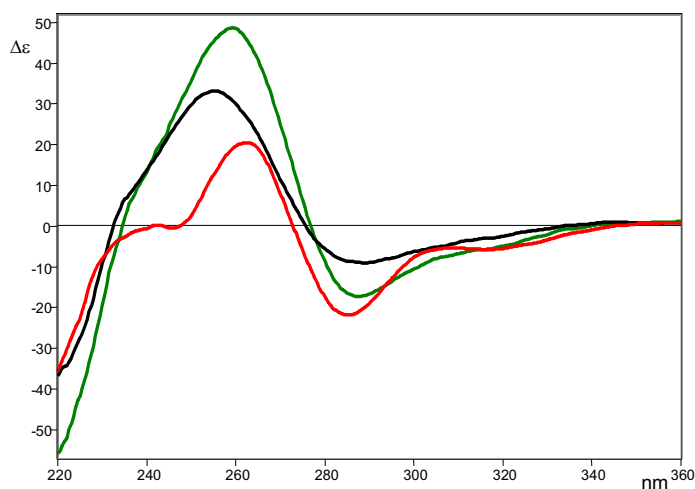
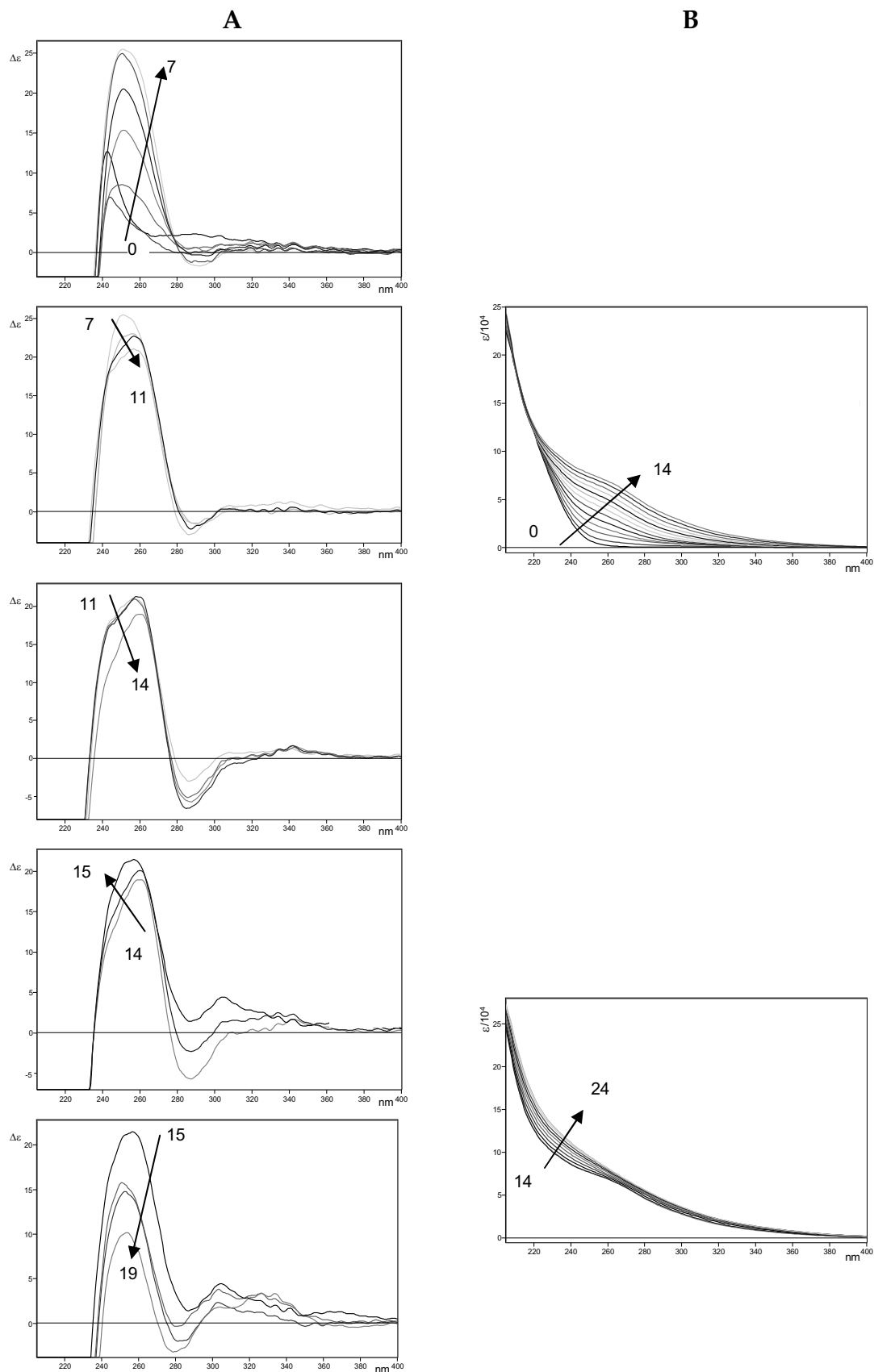


Fig. 5- Espectres CD de les mostres de Cu-SpMTA obtingudes en l'expressió de SpMTA en medis rics en Cu: Cu-SpMTA de tipus 1 (línia negra), de tipus 2 (línia verda), i de tipus 3 (línia vermella).

L'obtenció d'agregats homometal·lics i heterometal·lics per a una mateixa MT sintetitzada en medis rics en Cu ja ha estat observat prèviament (Tio *et al.*, 2004), i, més recentment, aquest grup de recerca ha proposat la seva relació amb els nivells d'oxigenació del cultiu (Pagani *et al.*, 2006). Tot i això, cal destacar que en aquest treball les condicions d'agitació i oxigenació del cultiu s'han mantingut idèntiques en totes les síntesis, i els resultats de TOF-ESI-MSàcid indiquen que en una mateixa mostra existeixen al mateix temps espècies homo- i heterometal·liques, per la qual cosa, la diversitat de comportament davant el Cu es pot considerar una característica pròpia de SpMTA, que es definiria com una Cu-tioneïna gràcies a la seva capacitat de donar lloc a agregats que continguin únicament Cu en ésser sintetitzada en medis rics en Cu (Bofill *et al.*, 2001).

Un cop més el treball realitzat *in vitro* han permès aprofundir en el coneixement dels complexos Cu-SpMTA. S'han fet dos tipus d'assajos: a) addició de Cu(I) a les mostres heterometal·liques de tipus 1 i 2 per veure si les de tipus 1 esdevenien de tipus 2 o qualsevol d'elles dues acabaven donant mostres del tipus 3, i b) addició de Cu(I) a la Zn-SpMTA per tal d'estudiar les reaccions de desplaçament de Zn per Cu i analitzar si era possible obtenir *in vitro* mostres de composició i característiques espectroscòpiques comparables a les obtingudes *in vivo*. Per motius d'extensió, només es mostren aquí les dades de CD, UV-vis (Fig. 6) i ESI-MS (Taula 3) de la valoració de Zn-SpMTA amb Cu(I). Els resultats obtinguts en tots dos tipus d'assajos permeten afirmar de manera genèrica que el desplaçament *in vitro* del Zn pel Cu en preparacions del tipus Zn-SpMTA o Zn,Cu-SpMTA no permet generar mostres que reproduïxin les característiques de les mostres Cu-SpMTA sintetitzades *in vivo*, ja que tant els espectres de CD com l'especiació de les mostres són diferents.

Fig. 6- Espectres CD (A) i UV-vis (B) de la valoració de Zn-SpMTA amb Cu(I). Al llarg de la valoració es van afegir fins a 24 eq de Cu(I) però les dades de CD només mostren l'addició fins a 19 ja que a partir d'aquest punt no es varen registrar variacions de l'empremta de CD.



Eq de Cu	4	5	6	8	14	18
M ₅ -SpMTA		♦		♦		♦
M ₆ -SpMTA				♦		♦
M ₇ -SpMTA				♦		♦
M ₈ -SpMTA	X	X		♦	♦	♦
M ₈ S ₁ -SpMTA	♦		♦			
M ₉ -SpMTA	X					♦
M ₁₀ -SpMTA	X				♦	♦
M ₁₀ S ₁ -SpMTA	X	X	X	X		
M ₁₁ -SpMTA	X	✓		✓	♦	X
M ₁₂ -SpMTA	✓	✓	✓	✓	X	X
M ₁₂ S ₁ -SpMTA			✓	✓		
M ₁₃ -SpMTA	✓				X	X
M ₁₃ S ₁ -SpMTA	X	X	✓	X		
M ₁₄ -SpMTA	✓		✓		✓	✓
M ₁₄ S ₁ -SpMTA	✓					
M ₁₅ -SpMTA	X		X		✓	✓
M ₁₅ S ₁ -SpMTA	X		♦			
M ₁₆ -SpMTA					✓	X
M ₁₇ -SpMTA					✓	✓
M ₁₈ -SpMTA					X	♦
M ₁₉ -SpMTA						♦

Taula 3.- Espècies detectades per TOF-ESI-MS durant la valoració de Zn_n-SpMTA amb Cu(I). ✓✓=Clarament predominant; ✓=majoritari; X= intermèdia; ♦= minoritària.

CONCLUSIONS

SpMTA en ésser sintetitzada en medis rics en Zn i Cd dona lloc majoritàriament a agregats amb 7 metalls divalents. En Zn-SpMTA, la presència de formes inframetalades (Zn₃-SpMTA, Zn₄-SpMTA) s'ha associat a l'oxidació parcial de la mostra cosa que sembla suggerir una certa inestabilitat d'aquesta MT quan es troba enllaçada a Zn.

Amb el Cd, SpMTA enllaça 7 ions Cd(II) i 2 ions sulfur. El contingut metàl·lic i l'espectre de CD mesurats reproduïen les dades obtingudes per altres autors (Wang *et al.*, 1994; Wang *et al.*, 1995). Cd-SpMTA mostra un contingut metàl·lic similar al descrit per a Cd-MT1, Cd-MT2 i Cd-MT3 (Bogumil *et al.*, 1996) de mamífer i peix (Vergani *et al.*, 2005), però divergent del de Cd-MT4 de mamífer (Tio *et al.*, 2004) i la MT de pollastre (Villarreal *et al.*, 2006).

En canvi, en ésser sintetitzada en medi ric en Cu, SpMTA mostra un caràcter de Cu-tioneïna similar a l'observat per a MT4, ja que MT4 és la única MT de vertebrat en què s'ha descrit la capacitat de generar dos tipus d'agregats, heterometàl·lics i homometàl·lics de Cu, en ésser sintetitzada en medis rics en Cu (Tio *et al.*, 2004).

El complexos metall-MT aconseguits amb les valoracions de Zn-SpMTA, ja sigui amb Cd(II) o amb Cu(I), difereix en tots els casos dels obtingut en les produccions *in vivo*. Aquestes diferències no semblen poder ser atribuïdes a la manca de lligands sulfur en l'agregat Zn-SpMTA inicial.

La síntesi de SpMTA en els eriçons de mar s'indueix com a resposta a baixes concentracions de Zn (Wilkinson & Nemer, 1987), suggerint un rol homeostàtic. En canvi, l'altra MT de *S.purpuratus*, SpMTB, s'indueix a altes concentracions de Zn (Wilkinson & Nemer, 1987), suggerint un rol detoxificador. La tendència de SpMTA envers la coordinació de Cu podria indicar un rol homeostàtic de Cu per a aquesta MT.

El fet que en la síntesi de tipus 3 de Cu-SpMTA s'obtinguin dos conjunts d'espècies, les d'estequiometria 4 i les d'estequiometria 8, relaciona SpMTA amb MT3 de mamífer ja que l'existència de complexos formats per coordinació de 4 i 8 Cu(I) a un pèptid MT ha estat extensament descrita per a la isoforma MT3 de mamífer (Bogumil *et al.*, 1996; Bogumil *et al.*, 1996; Roschitzi & Vasak, 2002).

És de destacar que el cas de SpMTA és el primer on hem determinat que la síntesi recombinant d'una MT en medis rics en Cu resulta en agregats de 4 o 8 Cu(I), fet que indica un comportament comparable, al menys amb MT3 de mamífer. Aquest fet, conjuntament amb la classificació de SpMTA com a Cu-tioneïna (comportament que comparteix amb MT4 de mamífer) fa que hi hagi una semblança de SpMTA amb les formes més primitives de mamífer.

REFERÈNCIES

- Bertini, I., Hartmann, H. J., Klein, T., Liu, G., Luchinat, C. & Weser, U. (2000). High resolution solution structure of the protein part of Cu₇ metallothionein. *Eur J Biochem* 267(4), 1008-18.
- Binz, P. A., Kägi, J.H.R. (2001). <http://www.biochem.unizh.ch/mtpage/MT.html>.
- Bofill, R., Capdevila, M., Cols, N., Atrian, S. & Gonzalez-Duarte, P. (2001). Zinc(II) is required for the *in vivo* and *in vitro* folding of mouse copper metallothionein in two domains. *J Biol Inorg Chem* 6(4), 405-17.
- Bofill, R., Palacios, O., Capdevila, M., Cols, N., Gonzalez-Duarte, R., Atrian, S. & Gonzalez-Duarte, P. (1999). A new insight into the Ag⁺ and Cu⁺ binding sites in the metallothionein beta domain. *J Inorg Biochem* 73(1-2), 57-64.
- Bogumil, R., Faller, P., Binz, P. A., Vasak, M., Charnock, J. M. & Garner, C. D. (1998). Structural characterization of Cu(I) and Zn(II) sites in neuronal-growth-inhibitory factor by extended X-ray absorption fine structure (EXAFS). *Eur J Biochem* 255(1), 172-7.
- Bogumil, R., Faller, P., Pountney, D. L. & Vasak, M. (1996). Evidence for Cu(I) clusters and Zn(II) clusters in neuronal growth-inhibitory factor isolated from bovine brain. *Eur J Biochem* 238(3), 698-705.
- Bongers, J., Walton, C. D., Richardson, D. E. & Bell, J. U. (1988). Micromolar protein concentrations and metalloprotein stoichiometries obtained by inductively coupled plasma atomic emission spectrometric determination of sulfur. *Anal Chem* 60(24), 2683-6.
- Capdevila, M., Cols, N., Romero-Isart, N., Gonzalez-Duarte, R., Atrian, S. & Gonzalez-Duarte, P. (1997). Recombinant synthesis of mouse Zn₃-beta and Zn₄-alpha metallothionein 1 domains and characterization of their cadmium(II) binding capacity. *Cell Mol Life Sci* 53(8), 681-8.
- Capdevila, M., Domenech, J., Pagani, A., Tio, L., Villarreal, L. & Atrian, S. (2005). Zn- and Cd-metallothionein recombinant species from the most diverse phyla may contain sulfide (S²⁻) ligands. *Angew Chem Int Ed Engl* 44(29), 4618-22.
- Cobine, P. A., McKay, R. T., Zangger, K., Dameron, C. T. & Armitage, I. M. (2004). Solution structure of Cu₆ metallothionein from the fungus *Neurospora crassa*. *Eur J Biochem* 271(21), 4213-21.
- Cols, N., Romero-Isart, N., Capdevila, M., Oliva, B., Gonzalez-Duarte, P., Gonzalez-Duarte, R. & Atrian, S. (1997). Binding of excess cadmium(II) to Cd7-metallothionein from recombinant mouse Zn-metallothionein 1. UV-VIS absorption and circular dichroism studies and theoretical location approach by surface accessibility analysis. *J Inorg Biochem* 68(3), 157-66.
- Domenech, J., Mir, G., Huguet, G., Capdevila, M., Molinas, M. & Atrian, S. (2006). Plant metallothionein domains: functional insight into physiological metal binding and protein folding. *Biochimie* 88(6), 583-93.
- Domenech, J., Palacios, O., Villarreal, L., Gonzalez-Duarte, P., Capdevila, M. & Atrian, S. (2003). MTO: the second member of a *Drosophila* dual copper-thionein system. *FEBS Lett* 533(1-3), 72-8.
- Egli, D., Domenech, J., Selvaraj, A., Balamurugan, K., Hua, H., Capdevila, M., Georgiev, O., Schaffer, W. & Atrian, S. (2006). The four members of the *Drosophila* Metallothionein family exhibit distinct yet overlapping in heavy metal homeostasis and detoxification. *Genes to Cells* 11(6), 647-58.
- Fabris, D., Zaia, J., Hathout, Y., Fenselau, C. (1996). Retention of thiol protons in two classes of protein zinc coordination centers. *J Am Chem Soc* 118, 12242-3.
- Faller, P., Hasler, D. W., Zerbe, O., Klauser, S., Winge, D. R. & Vasak, M. (1999). Evidence for a dynamic structure of human neuronal growth inhibitory factor and for major rearrangements of its metal-thiolate clusters. *Biochemistry* 38(31), 10158-67.

- Furey, W. F., Robbins, A. H., Clancy, L. L., Winge, D. R., Wang, B. C. & Stout, C. D. (1987). Crystal structure of Cd,Zn metallothionein. *Experientia Suppl* 52, 139-48.
- Harlow, P., Watkins, E., Thornton, R. D. & Nemer, M. (1989). Structure of an ectodermally expressed sea urchin metallothionein gene and characterization of its metal-responsive region. *Mol Cell Biol* 9(12), 5445-55.
- Hasler, D. W., Faller, P. & Vasak, M. (1998). Metal-thiolate clusters in the C-terminal domain of human neuronal growth inhibitory factor (GIF). *Biochemistry* 37(42), 14966-73.
- Kägi, J. H. R. (1993). Evolution, structure and chemical activity of class I metallothioneins: An overview. In Suzuki KT, I.N.a.K.M. (Ed.) *Metallothionein III, Biological Roles and Implications*. pp. 29-55. Birkhauser Verlag, Basel.
- Nemer, M., Stuebing, E. W., Bai, G. & Parker, H. R. (1995). Spatial regulation of SpMTA metallothionein gene expression in sea urchin embryos by a regulatory cassette in intron 1. *Mech Dev* 50(2-3), 131-7.
- Nemer, M., Thornton, R. D., Stuebing, E. W. & Harlow, P. (1991). Structure, spatial, and temporal expression of two sea urchin metallothionein genes, SpMTB1 and SpMTA. *J Biol Chem* 266(10), 6586-93.
- Nemer, M., Travaglini, E. C., Rondinelli, E. & D'Alonzo, J. (1984). Developmental regulation, induction, and embryonic tissue specificity of sea urchin metallothionein gene expression. *Dev Biol* 102(2), 471-82.
- Pagani, A., Villarreal, L., Capdevila, M. & Atrian, S. (2006). Manuscript in preparation.
- Pountney, D. L., Fundel, S. M., Faller, P., Birchler, N. E., Hunziker, P. & Vasak, M. (1994). Isolation, primary structures and metal binding properties of neuronal growth inhibitory factor (GIF) from bovine and equine brain. *FEBS Lett* 345(2-3), 193-7.
- Riek, R., Precheur, B., Wang, Y., Mackay, E. A., Wider, G., Guntert, P., Liu, A., Kägi, J. H. & Wuthrich, K. (1999). NMR structure of the sea urchin (*Strongylocentrotus purpuratus*) metallothionein MTA. *J Mol Biol* 291(2), 417-28.
- Roschitzki B., Vasak M. (2002). A distinct Cu(4)-thiolate cluster of human metallothionein-3 is located in the N-terminal domain. *J Biol Inorg Chem*. 7(6):611-6.
- Tio, L., Villarreal, L., Atrian, S. & Capdevila, M. (2004). Functional differentiation in the mammalian metallothionein gene family: metal binding features of mouse MT4 and comparison with its paralog MT1. *J Biol Chem* 279(23), 24403-13.
- Uchida, Y., Takio, K., Titani, K., Ihara, Y. & Tomonaga, M. (1991). The growth inhibitory factor that is deficient in the Alzheimer's disease brain is a 68 amino acid metallothionein-like protein. *Neuron* 7(2), 337-47.
- Valls, M., Bofill, R., Gonzalez-Duarte, R., Gonzalez-Duarte, P., Capdevila, M. & Atrian, S. (2001). A new insight into metallothionein (MT) classification and evolution. The *in vivo* and *in vitro* metal binding features of *Homarus americanus* recombinant MT. *J Biol Chem* 276(35), 32835-43.
- Valls, M., Bofill, R., Romero-Isart, N., Gonzalez-Duarte, R., Abian, J., Carrascal, M., Gonzalez-Duarte, P., Capdevila, M. & Atrian, S. (2000). Drosophila MTN: a metazoan copper-thionein related to fungal forms. *FEBS Lett* 467(2-3), 189-94.
- Vasak, M., Hasler, D. W. & Faller, P. (2000). Metal-thiolate clusters in neuronal growth inhibitory factor (GIF). *J Inorg Biochem* 79(1-4), 7-10.
- Vergani, L., Grattarola, M., Borghi, C., Dondero, F. & Viarengo, A. (2005). Fish and molluscan metallothioneins. *FEBS J* 272(23), 6014-23.
- Villarreal, L., Tio, L., Capdevila, M. & Atrian, S. (2006). Comparative metal binding and genomic analysis of the avian (chicken) and mammalian metallothionein. *FEBS J* 273(3), 523-35.
- Wang, Y., Hess, D., Hunziker, P. E. & Kägi, J. H. (1996). Separation and characterization of the metal-thiolate-cluster domains of recombinant sea urchin metallothionein. *Eur J Biochem* 241(3), 835-9.
- Wang, Y., Mackay, E. A., Kurasaki, M. & Kägi, J. H. (1994). Purification and characterisation of recombinant sea urchin metallothionein expressed in *Escherichia coli*. *Eur J Biochem* 225(1), 449-57.
- Wang, Y., Mackay, E. A., Zerbe, O., Hess, D., Hunziker, P. E., Vasak, M. & Kägi, J. H. (1995). Characterization and sequential localization of the metal clusters in sea urchin metallothionein. *Biochemistry* 34(22), 7460-7.
- Wilkinson, D. G. & Nemer, M. (1987). Metallothionein genes MTa and MTb expressed under distinct quantitative and tissue-specific regulation in sea urchin embryos. *Mol Cell Biol* 7(1), 48-58.

Article 4- Orihuela R, Domènech J, Bofill R, You C, Mackay E, Kägi J, Capdevila M, Atrian S. Metal-binding features of the mussel *M.edulis* MT-10-IV recombinant metallothionein: a polyvalent role in Zn, Cu and Cd housekeeping. **Arch. Biochem. Biophys.** Submitted.



Presentació

La proposta evolutiva de Nemer *et al.* (1985) relaciona les estructures primàries de les MT de vertebrats, i invertebrats, postulant un origen evolutiu comú de les diferents MT, però no inclou en aquesta proposta les MT de mol·lusc. Malgrat que les úniques MT d'invertebrat que formen part de la Classe I són les de crustacis i mol·luscs, l'estudi de les propietats coordinants i estructurals de les MT de mol·luscs es troba encara en un estat molt incipient, i centrat principalment en la coordinació de Cd i en formes terrestres. Les MT de mol·lusc presenten diverses estructures primàries, essent les més estudiades les del sistema MT del bivalve *M.edulis*. El estudis publicats semblen indicar que dels dos tipus MT que configuren el sistema MT de *M.edulis*, les Mt20 estarien relacionades amb el metabolisme del Cd i les MT10 amb el del Zn o Cu. Els estudis de coordinació metàl·lica es centren en Mt10 (de *Mytilus galloprovincialis*) en relació amb el Cd, però no hi ha estudis sobre les característiques coordinants i estructurals d'aquesta MT amb Zn o Cu, els metalls que n'indueixen la síntesi. A més, l'absència de dobles Cys en la seva seqüència allunya estructuralment aquesta MT de les de la resta de metazous. En aquest article es presenta la caracterització del comportament coordinants de la MT-10-IV de *M.edulis*, que a partir d'ara serà denominada MeMT. El cDNA corresponent fou cedit amablement pel Prof. Jeremias H.R. Kägi, del departament de Bioquímica de la Universitat de Zurich. Com a part d'aquesta tesi, s'ha obtingut el clon recombinant i s'han fet les síntesis heteròlogues i purificacions dels agregats Zn-, Cd- i Cu-MT. L'estudi dels agregats conformats *in vitro* ha estat realitzat per Rubén Orihuela i el Dr. Roger Bofill, del grup de recerca de la Dra. Mercè Capdevila, de la Universitat Autònoma de Barcelona.

Resum

Per tal d'estudiar les especificitats funcionals suggerides pels patrons d'expressió de les MT de *M.edulis*, s'ha sintetitzat heteròlogament MeMT de *M.edulis*, en medis rics en Zn, Cd o Cu. Els resultats obtinguts de l'anàlisi d'aquests agregats indiquen que MeMT uneix 7 ions divalents en ésser sintetitzada en medis rics en Zn o Cd, i que s'obtenen dos tipus d'agregats heterometàl·lics en sintetitzar-la en medis rics en Cu. Les valoracions amb Cd(II) o Cu(I) dels agregats Zn-MeMT revelen una resistència a la substitució del Zn per Cd(II) o Cu(I), en correspondència amb l'especificitat funcional pel Zn que suggereix la resposta a inducció per metalls d'aquesta isoforma. Les dades indiquen que en els agregats metàl·lics de MeMT hi participen ions sulfur i clorur. Les dades són discutides en relació a la seqüència i l'especificitat funcional de les MT de mol·lusc i mamífer.

L'ARTICLE ÉS INCLÒS A LA VERSIÓ IMPRESA DE LA TESI, PERÒ PER TAL DE RESPECTAR ELS DRETS DE L'EDITOR, NO S'HA INCLÒS EN LA VERSIÓ DE LA TESI DISPONIBLE EN XARXA. PER AIXÒ S'HA AFEGIT LA CITA DE L'ARTICLE EN PUBLICACIÓ.

Article 5- La histidina C-terminal de la metal·lotioneïna CeMT2 de *C.elegans* juga un paper determinant en el seu comportament coordinant envers Zn, Cd i Cu. Estudi del model bidominal per a CeMT2. (Article en redacció)



Presentació

El sistema de detoxificació i resposta enfront de metalls en *C.elegans* presenta com a particularitat el fet de mostrar els indicis clars de l'acció de fitoquelatines (PC) (primer cas descrit en metazous) i de presentar una de regulació de l'expressió dels gens Mt molt més àmplia que la inducció per metalls.

La presència de residus d'histidina en MT és un fet poc habitual, i *C.elegans* és l'únic metazou totes les MT del qual presenten His. El fet que una de les dues isoformes MT de *C.elegans* compti amb 4 His suggereix una significativa importància funcional d'aquest aminoàcid, però no s'han estudiat quines propietats coordinants són atribuïdes a aquestes His.

Els estudis d'agregats metall-MT realitzats fins ara amb MT d'aquest organisme han estat orientats únicament al Cd. S'ha proposat que aquestes MT s'estructurarien en dos dominis, deixant una Tyr lliure en la regió frontissa que els uniria. S'obren, doncs, tres qüestions importants: 1) actualment no es coneix el comportament d'aquestes MT davant metalls fisiològics com el Zn i el Cu; 2) no es tenen dades experimentals sobre la seva possible estructuració tridimensional; 3) no es coneix l'aportació de les His en aquests agregats metall-MT. Determinar les propietats funcionals de les MT de *C.elegans* respecte aquests tres aspectes pot aportar molta informació útil a l'hora de definir la distribució dels rols de les PC i les MT en la detoxificació i homeòstasi de metalls.

Resum

En el treball següent es presenten els resultats de la caracterització de les propietats coordinants de CeMT2, de dues formes mutants corresponent als seus dos hipotètics dominis per separat (CeC i CeN), i un mutant amb una deleció de la His C-terminal (Ce Δ His).

El cDNA codificant per CeMT2 fou cedit amablement per el Dr. Jeremias H.R. Kägi, de la Universitat de Zurich. Com a part d'aquesta tesi s'han generat diversos clons recombinants aptes per a la síntesi heteròloga, que contenen cDNAs codificants per diverses formes, silvestre i mutants, del cDNA de CeMT2. Els diversos clons han estat expressats heteròlogament en medis enriquits amb Zn, Cd o Cu, i s'han estudiat les propietats coordinants i estructurals dels agregats obtinguts. Com a part d'aquest treball, per a la forma silvestre i el mutant Ce Δ His, s'ha dut a terme també la valoració de la forma Zn-MT amb Cd.

La histidina C-terminal de la metal·lotioneïna CeMT2 de *C.elegans* juga un paper determinant en el seu comportament coordinant envers Zn, Cd i Cu. Estudi del model bidominal per a CeMT2.

ABSTRACT

El nematode *C.elegans* sintetitza dues metal·lotioneïnes, CeMT1 i CeMT2, ben conegudes des del punt de vista d'estructura gènica i regulació de l'expressió. En contrast, el coneixement sobre les seves propietats funcionals i estructurals és escàs. CeMT1 i CeMT2 són homòlogues, contenen 18 Cys i una His al seu extrem C-terminal. En aquest estudi es presenta la caracterització del comportament coordinant de CeMT2. S'ha sintetitzat CeMT2 en *E.coli* en medis rics en Zn, Cd i Cu. Els agregats metall·pèptid resultants han estat estudiats per ESI-MS, ICP-AES, GC-FPD i CD. Els resultats indiquen que CeMT2, en ésser sintetitzada en medis rics en Zn o Cd captura 6 ions de Zn o Cd, respectivament. En ésser sintetitzada en medi ric en Cu dóna lloc a agregats heterometàl·lics amb 8 metalls, determinant el caràcter de Zn-tioneïna d'aquesta MT. Per a estudiar la suposada analogia estructural d'aquesta MT amb altres MT d'invertebrats (amb dos dominis) i el possible paper de la His en la coordinació metàl·lica, s'han construït formes mutants corresponents a la deleció de la His (Ce Δ His), i dues formes truncades corresponents als putatius dominis funcionals aïllats, CeN (que inclou les 9 Cys a N-term) i CeC (que comprèn les 9 Cys a C-term). Les tres formes mutants han estat sintetitzades i analitzades pels mateixos processos que la forma silvestre, i els resultats han estat comparats amb els obtinguts per a CeMT2, evidenciant-se que l'estructuració dels dos putatius dominis no és independent amb cap dels 3 metalls Zn, Cd i Cu, i que la His terminal determina la capacitat de formar espècies dimèriques en metalls divalents i la preferència metàl·lica pel Zn. Els resultats han estat complementats i discutits conjuntament amb les valoracions *in vitro* amb Cd dels agregats Zn-CeMT2 i Zn-Ce Δ His.

Keywords: Metal·lotioneïna, *Caenorhabditis elegans*, dominis funcionals, dímer MT, histidina, CeMT2, sulfur.

INTRODUCCIÓ

Les Metal·lotioneïnes (MT) són proteïnes de baix pes molecular riques en cisteïnes, residus a través dels quals coordinen metalls pesants. Són presents en animals, plantes, protozous i procariotes, i presenten seqüències molt heterogènies. Estan classificades en 15 famílies en base a criteris taxonòmics i la seva estructura primària (Binz & Kägi, 2001). Les MT de mamífer (Família 1) són considerades les MT paradigmàtiques, i contenen 2 dominis rics en Cys (amb 9 i 11 Cys, respectivament) que en coordinar metalls divalents formen dos *clusters* metàl·lics units per un espaiador de 2 o 3 aminoàcids. La distribució dels metalls en dos *clusters* es manté en altres famílies de MT, com les MT de crustaci -dos dominis amb 9 Cys cadascun (Armitage *et al.*, 1982)- i les d'equinoderm -amb distribució anàloga a la de mamífer (Riek *et al.*, 1999)-. En contrast amb aquestes MT bidomini, existeixen també MT monodomini, com CUP1 de llevat, en què una sola regió proteica amb 12 Cys forma un únic *cluster* metàl·lic (Peterson, *et al.*, 1996), i s'ha proposat també l'existència d'estructures codomini en les MT de planta, en què dues regions proteiques formarien un únic *cluster* metàl·lic (Kille *et al.*, 1991; Tommey *et al.*, 1991; Domenech *et al.*, 2005).

La capacitat d'enllaç metàl·lic envers metalls tant fisiològics (Zn, Cu) com xenobiòtics (Cd, Hg, Ag,...) i la capacitat que tenen aquests d'induir la síntesi de MT ha fet que es relacionin aquestes proteïnes amb el metabolisme cel·lular de metalls essencials, i la defensa davant de la toxicitat per metalls (Kägi, 1993). Els diferents patrons d'expressió de cada isoforma suggereixen que les diferents MT d'un mateix organisme poden presentar una especialització funcional, que podria estar relacionada amb diferents habilitats coordinants dels pèptids, tal com s'ha proposat per a les MT de llevat (Bertini *et al.*, 2000; Cobine *et al.*, 2004), les MT MtnA (Valls *et al.*, 2000), MtnB (Domenech *et al.*, 2003), MtnC i MtnD (Egli *et al.*, 2006) de *Drosophila* i la MT4 de mamífer (Tio *et al.*, 2004), que *in vivo* mostren preferència per enllaçar el Cu(I) (Cu-tioneïnes), mentre les MT de mamífer (Nielsen & Winge, 1985) i crustaci (Valls *et al.*, 2001) prefereixen coordinar-se a Zn(II) (Zn-tioneïnes). Malgrat les dades que es tenen respecte l'estructura i la funcionalitat de les MT de vertebrats, entre les MT d'invertebrat, que presenten seqüències molt divergents, les dades es centren principalment en els patrons d'inducció i l'estructura dels gens codificants per a les MT. Aquest és el cas del nematode *C.elegans*, les dues MT del qual constitueixen la família 6 de la classificació de Binz i Kägi. Les isoformes MT d'aquest organisme, MTL1 (CeMT1) i MTL2 (CeMT2), presenten homologia (Imagawa *et al.*, 1990), tenen 18 Cys cadascuna i difereixen principalment en una inserció de 12 aminoàcids en la zona *C-terminal* de CeMT1 (Fig. 1).

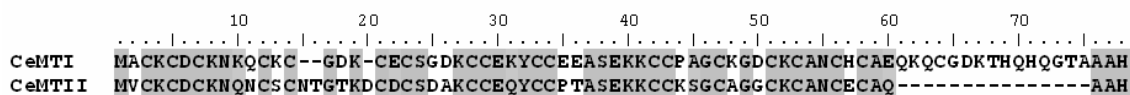


Fig. 1- Alineament de les seqüències aminoacídiques de les MT CeMT1 i CeMT2 de *C.elegans*

La similitud en el nombre de Cys amb la MT de crustaci -la MT amb estructura coneguda més propera filogenèticament- fa que en la bibliografia s'assumeixi per a CeMT1 i CeMT2 una estructura bidominal (Slice, *et al.*, 1990). CeMT1 conté 4 residus His a la meitat *C-terminal*, de les quals només la situada a l'extrem és conservada respecte CeMT2. La His és un residu que pot tenir un paper en la coordinació metàl·lica en MT (Romero-Isart *et al.*, 1999; Blindauer *et al.*, 2001), i fins i tot conferir comportaments coordinants atípics (Villarreal *et al.*, 2006).

Només CeMT1 s'expressa constitutivament, però ambdues isoformes són induïdes per Cd (Freedman *et al.*, 1993), i no ho són per Zn ni Cu (Swain *et al.*, 2004). Les dues isoformes semblen presentar preferències metàl·liques diferenciades, ja que en ésser sintetitzades en medis rics en Cd, CeMT2 uneix exclusivament ions Cd²⁺ (Slice *et al.*, 1990), mentre CeMT1 uneix ions Zn²⁺ i Cd²⁺ (Kondo *et al.*, 1990). Tot i els indicis que suggereixen una estructura en dos dominis, i la possible participació de la His en la coordinació metàl·lica, no es tenen dades concretes en aquest sentit.

Per aprofundir en l'estudi de la relació estructura/funció en les MT de *C.elegans*, es varen construir 3 formes mutants de CeMT2. La forma silvestre de CeMT2 i les 3 formes mutants (Ce Δ His, CeN, CeC) han estat sintetitzades en *E.coli* en medis rics en Zn, Cu o Cd. Les característiques espectroscòpiques i espectromètriques dels agregats obtinguts han estat comparades entre si, permetent una primera aproximació al comportament coordinant de CeMT2.

MATERIAL I MÈTODES

Construcció de mutants CeMT2 i clonatge dels cDNA en pGEX4T2

Els cDNA codificants per les diverses formes mutants de CeMT2 (Taula 1) han estat construïts mitjançant mutagènesi per PCR, usant el cDNA codificant per la forma silvestre de CeMT2 com a motllo. El cDNA de CeMT2 ha estat amablement cedit pel Prof. J.H.R. Kägi, del Departament de Bioquímica de la Universitat de Zurich. En tots els casos, després de l'activació de la polimerasa (5' a 95 °C), s'han dut a terme 30 cicles de PCR amb les condicions següents: desnaturalització 45'' a 95 °C, anellament 30'' entre 55 °C i 60 °C i elongació 45'' a 74 °C.

Pèptid	Seqüència	Pes molecular esperat mesurat
CeMT2	GSMVCKDCCKNQNCSCNTGKDKDCSDAKCCE <u>YCCPTASEKKCKSGCAGGCKANCECAQAAH</u>	6737.6 <u>6737.1±1.2</u>
Ce Δ His	GSMVCKDCCKNQNCSCNTGKDKDCSDAKCCE <u>YCCPTASEKKCKSGCAGGCKANCECAQAA</u>	6600.5 <u>6600.7±1.4</u>
CeN	GSMVCKDCCKNQNCSCNTGKDKDCSDAKCCE	3397.8 <u>3397.3±0.9</u>
CeC	G <u>YCCPTASEKKCKSGCAGGCKANCECAQAAH</u>	3502.0 <u>3502.1±0.8</u>

Taula 1- Seqüències aminoacídiques de la forma silvestre de CeMT2 i dels tres mutants. Al centre de la taula, una línia vertical discontinua delimita els dos putatius dominis de CeMT2. Ce Δ His és el mutant amb la His delecionada. CeC és la regió C-term de CeMT2, i comprèn l'interval Gln31-His63. CeN és la regió N-term de CeMT2, i comprèn l'interval Met1-Glu30. En tots els casos, hi ha una Gly i una Ser (en negreta) afegides a l'extrem N-term dels quatre pèptids, degut a l'estratègia d'expressió recombinant. Per a cada pèptid, es mostra la comparació entre el pes molecular teòric i el pes molecular de la forma Apo mesurat per espectrometria de masses, a partir de la demetalació dels corresponents complexos Zn-MT.

Per al mutant Ce Δ His (deleció de la His terminal), s'han usat l'oligonucleòtid 5CEBAM (5'-CGGGGATCCATGGTCTGCAAG-3') -que introdueix una diana BamHI a l'extrem 5'- i 3CEHIS (5'-ACGCGTCCGACCTAAGCAGCCTG-3'), que introdueix un codó STOP i una diana Sall immediatament a 3' del codó codificant per a Ala62. Per al mutant CeN, que codifica per la regió N-terminal de CeMT2 (interval Met1-Glu30) s'han usat l'oligonucleòtid 5CEBBAM (5'-CGGGGATCCATGGTCTGCAAG-3') -que introdueix una diana BamHI a l'extrem 5'- i 3CENSAL (5'-ACGCGTCCGACCTACTCACAGCACTTG-3'), que introdueix un codó STOP i una diana Sall immediatament a 3' del codó codificant per a Glu30. Per al mutant CeC, que codifica per la regió C-terminal de CeMT2 (incloent l'interval Gln31-His63) s'han usat l'oligonucleòtid 5CECBAM (5'-CGGGGATCCCAGTACTGCTGC-3') -que introdueix una diana BamHI immediatament a 5' del codó codificant per Gln31- i 3CESAL (5'-ACGCGTCCGACCTAATGAGCAGC-3'), que introdueix un codó STOP i una diana Sall immediatament a 3' del codó codificant per His63. Per a CeMT2, codificant per la forma silvestre de CeMT2, s'han usat l'oligonucleòtid 5CEBAM (5'-CGGGGATCCATGGTCTGCAAG-3') que introdueix una diana BamHI a l'extrem 5', i 3CESAL (5'-ACGCGTCCGACCTAATGAGCAGC-3'), que introdueix un codó STOP i una diana Sall

inmediatament a 3' del codó codificant per a His63. Les zones codificant les dianes de restricció apareixen subratllades en les seqüències dels oligonucleòtids.

La mida dels fragments obtinguts en les PCR ha estat confirmada mitjançant gels d'agarosa tenyits amb bromur d'etidi. Els fragments de PCR han estat purificats i digerits amb els enzims de restricció *BamHI* i *Sall* i insertats direccionalment en el vector pGEX-4T2 (Amersham Pharmacia Biotech), per a sintetitzar els pèptids codificats fusionats a l'extrem C-terminal de la Glutatió S-transferasa (GST) tal com es descriu a (Cols *et al.*, 1997). Com a resultat, s'han obtingut els plasmidis *pGEX-CeMT2*, *pGEX-CeΔHis*, *pGEX-CeC* i *pGEX-CeN*, corresponents a cadascuna de les construccions. Després de confirmar les seqüències de DNA (usant el preparat de reaccions ABIPRISM Dye Terminator-Cycle Sequencing Ready reaction kit -Perkin Elmer-, en un seqüenciador automàtic Applied Biosystems ABIPRISM 310 Automatic Sequencer), aquests plasmidis han estat transformats en cèl·lules *E.coli* BL21.

Síntesi, purificació i caracterització dels agregats metall-MT recombinants

Els quatre pèptids recombinants han estat sintetitzats en cultius de LB de 3 l, inoculats amb 300 ml de pre-cultiu (12h) de cèl·lules d'*E.coli* portadores dels plasmidis *pGEX-CeMT2*, *pGEX-CeΔHis*, *pGEX-CeC* o *pGEX-CeN*. La síntesi proteica s'ha induït amb IPTG quan el cultiu assolía una OD₆₀₀ de 0.8 i els cultius han continuat en creixement durant 3h amb un suplement de metalls a una concentració final de 300 μM CdCl₂, 500 μM CuSO₄ o 300μM ZnCl₂. El creixement dels cultius s'ha dut a terme a 250 rpm i 37 °C. La massa cel·lular s'ha recuperat per centrifugació (Sorvall RC5C, 15 min at 9600 × g), i s'ha ressuspenès en PBS 0.5% β-mercaptoethanol. A partir d'aquest pas, tots els processos s'han dut a terme emprant solucions saturades amb argó i minimitzant el contacte amb l'aire, per a evitar l'oxidació de les Cys dels pèptids. La solució obtinguda ha estat sonicada (*Branson sonifier 250*) a 0.6 Hz durant 12 min, i per centrifugació (20 min at 20000 × g) s'han separat les restes cel·lulars. Els pèptids de fusió GST-MT han estat purificats del sobrenedant mitjançant cromatografia d'afinitat amb *Glutathione-Sepharose 4B* (Amersham Pharmacia). Els agregats metall-MT han estat separats de la fracció GST mitjançant el tall amb trombina i cromatografia d'afinitat. La solució obtinguda ha estat concentrada amb Centriprep Microcon 3 (Amicon) i els metal·lopèptids han estat finalment purificats per FPLC en una columna *Superdex75* (Amersham Pharmacia Biotech) equilibrada amb Tris-HCl 50 mM a pH 7.0. Les fraccions seleccionades han estat conservades a -80 °C.

Per a cada pèptid s'ha analitzat el contingut de S, Zn, Cu i Cd per ICP-AES (Espectroscòpia d'Emissió Atòmica de Plasma Acoblat per Inducció), en un espectropolarímetre Polyscan 61E (Thermo Jarrell Ash), detectant el S a 182.040 nm, el Zn a 213.856 nm, el Cu a 324.803 nm i el Cd a 228.802 nm. Per a totes les mostres s'han realitzat mesures per ICP convencional i ICP_{àcid}, tal com es descriu en articles previs (Mir *et al.*, 2004). La concentració de MT ha estat calculada a partir del contingut de S en la mostra mesurat per ICP_{àcid}, assumint que tots els àtoms de S provenen dels residus Met i Cys continguts en els pèptids MT, és a dir, 19 àtoms de S per mol de CeMT2 i CeΔHis, 10 àtoms de S per mol de CeN i 9 àtoms de S per mol de CeC. El contingut mitjà d'ions sulfur per MT s'ha mesurat per GC-FPD (Cromatografia de Gasos acoblada a un Detector Fotomètric de Flama), tal com es descriu a (Capdevila *et al.*, 2005).

Anàlisi espectroscòpica i espectromètrica dels agregats metàl·lics

Les mesures de CD (Dicroisme Circular) han estat dutes a terme tal com es descriu a Bofill et al. (1999), en un espectropolarímetre Jasco J715, controlat pel software J700. Tots els espectres han estat mesurats en cubetes de quars i processats mitjançant el programa J810. La temperatura s'ha mantingut a 25 °C mitjançant un aparell Peltier PTC-351S.

La massa molecular dels agregats de Zn, Cu i Cd s'ha determinat per ESI-MS (Espectrometria de Masses amb Ionització per ElectroSpray), en un Fisons Platform II instrument (VG Biotech) calibrat amb mioglobina de cor de cavall (0.1 mg/ml). S'han injectat 20 µl de mostra a 20 µl/min en les següents condicions d'anàlisi: temperatura de la sonda: 100 °C; Voltatge del capil·lar: 3.5 kV; Voltatge de la Lent: 1.5 kV; Potencial del con: 50 V. S'ha mesurat en un rang m/z entre 750 i 2000 a 2 s/espectre, amb un interval de 0.2 s. L'eluent utilitzat ha estat una mescla 20:80 d'acetonitril amb acetat d'amoni 5 mM a pH 7. Per a l'anàlisi de les formes Apo, els metal·lopeptids han estat demetalats per acidificació amb HCl a pH 1.5 i se n'ha mesurat el pes molecular tal com ja s'ha descrit per a les formes metalades, excepte que s'ha usat com a eluent una mescla 5:95 de metanol i formiat d'amoni a pH 1.5. En tots els casos, les masses moleculars s'han calculat com es descriu a Fabris et al. (1996).

RESULTATS I DISCUSSIÓ

Per a cada un dels 4 pèptids analitzats en aquest treball, l'acidificació a pH 1.5 de les formes metalades ha donat lloc a les formes Apo corresponents, que presentaven masses moleculars d'acord amb les esperades segons la seva composició aminoacídica (Taula 1), confirmant la seva identitat i integritat.

Propietats coordinants dels pèptids enfront a Zn

Els resultats obtinguts per ICP-AES i ESI-MS (Taula 2) indiquen que CeMT2 i CeΔHis, en ésser sintetitzats en un medi ric en Zn, originen una espècie majoritària Zn₆-MT, acompanyada d'altres espècies, entre les que es troben espècies sulfurades minoritàries. Addicionalment, l'aplicació d'un mètode de deconvolució apropiat (Afonso *et al.*, 2002) ha permès detectar en els espectres de Zn-CeMT2 espècies dimèriques amb contingut variable de Zn. La relació 6 Zn/18 Cys és equivalent a la observada per a les MT de crustaci (6 Zn /18 Cys) (Valls *et al.*, 2001).

L'estequiometria Zn/MT presentada per CeC i CeN correspon aproximadament a la meitat de la de la forma sencera, i els resultats de ESI-MS mostren que l'espècie principal difereix en cada cas (Zn₃-CeN i Zn₂-CeC), evidenciant una capacitat quelatant lleugerament menor per al pèptid CeN que es veu confirmada per un menor contingut metàl·lic d'acord amb les dades d'ICP. El lleuger desfàs entre l'ICP convencional i l'ICP_{acid}, i la presència de pics corresponents a espècies sulfurades indiquen una presència discreta de sulfur en els quatre tipus d'agregats, que ha estat confirmada per GC-FPD.

	ICP-AES	ICP-AES _{Acid}	GC-FPD	ESI-MS		
	Concentració del pèptid (M) Estequiometria metall/MT		<i>Ions S²⁻</i> <i>/Pèptid</i>	Espècies majoritàries <i>Espècies minoritàries</i>	<i>Pes molecular esperat</i>	<i>Pes molecular mesurat</i>
Zn						
CeMT2	1.5 x 10⁻⁴ 4.7 Zn	1.3 x 10⁻⁴ 5.7 Zn	0.62	Zn₆-CeMT2 Zn ₅ -CeMT2 Zn ₆ S ₁ -CeMT2 dímers Zn _x S _y -(CeMT2) ₂ *	7117.9 7054.6 7152.0 ---	7117.1 ± 0.9 7053.5.6 ± 0.6 7153.0 ± 1.1 ---
CeΔHis	1.4 x 10⁻⁴ 4.9 Zn	1.1 x 10⁻⁴ 5.4 Zn	0.87	Zn₆-CeΔHis Zn ₅ -CeΔHis Zn ₆ S ₁ -CeΔHis Zn ₄ -CeΔHis	6980.8 6917.5 7014.9 6854.1	6980.5 ± 1.1 6917.4 ± 0.4 7014.3 ± 0.8 6854.0 ± 0.4
CeN	2.0 x 10⁻⁴ 2.4 Zn	1.6 x 10⁻⁴ 2.9 Zn	1.06	Zn₃-CeN Zn ₂ -CeN Zn ₃ S ₁ -CeN	3588.0 3524.6 3622.0	3589.1.0 ± 1.2 3525.1 ± 0.6 3621.7 ± 0.8
CeC	1.6 x 10⁻⁴ 1.5 Zn	1.2 x 10⁻⁴ 2.77 Zn	0.54	Zn₂-CeC Zn ₃ -CeC Zn ₃ S ₁ -CeC	3628.8 3692.2 3726.2	3628.5 ± 0.9 3693.1 ± 1.1 3725.8 ± 1.3

Taula 2- Concentració dels pèptids recombinants i estequiometries metall/MT i sulfur/MT per als pèptids sintetitzats en medis rics en Zn. *Espècies dimèriques en què $x=(7-12)$ i $y=(0,1)$. L'error entre les masses esperades i experimentals no supera en cap cas els 2 Da.

Els espectres de CD de les quatre preparacions presenten un perfil atípic (Fig. 2), ja que l'absorció típica dels agregats Zn-tiolat sol consistir en una gaussiana (+) o un *exciton coupling* al voltant de 240 nm. Les 4 mostres es caracteritzen per mostrar bé gaussianes (-) (CeMT2, Ce Δ His, i CeC) d'intensitat significativa o bé manca d'absorció (CeN) a aquesta longitud d'ona. En aquest darrer cas, aquesta característica espectroscòpica es podria interpretar com a resultat de la superposició d'una gaussiana (-) a 240 nm i la intensa absorció ca. 225 nm, possiblement atribuïble a la presència de clorurs en l'agregat, que també presenten CeMT2 i Ce Δ His. Les absorcions de baixa intensitat que mostren les 4 preparacions per sobre de 260 nm poden ésser atribuïdes a la presència de sulfurs, tal com s'ha proposat en publicacions prèvies (Domenech *et al.*, 2006). L'espectre CD de Zn-CeMT2 està lleugerament desplaçat a longituds d'ona més baixes respecte a Zn-Ce Δ His. Aquest desplaçament s'ha estat associat anteriorment a la participació de His en la coordinació metàl·lica en MT (Romero-Isart *et al.*, 1999), fet que concorda amb la presència de His en CeMT2, i la seva absència en Ce Δ His. L'addició dels espectres CD de Zn-CeC i Zn-CeN dona lloc a una corba que no reproduïx el CD de Zn-CeMT2 ni el de Zn-Ce Δ His (Fig. 2). Complementàriament, les espècies majoritàries detectades per ESI-MS suggereixen una capacitat quelatant de superior per a CeMT2 que per a la suma dels dominis independents.

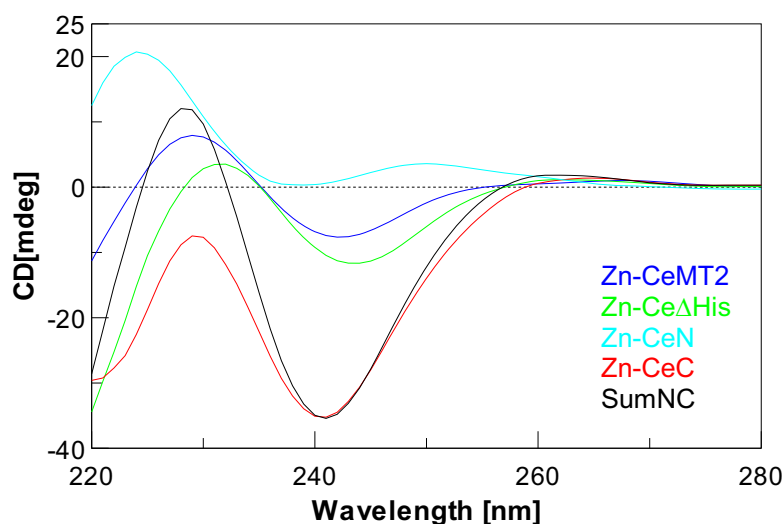


Fig. 2- Espectres de CD dels agregats Zn-MT recombinants obtinguts *in vivo*, comparats entre ells i amb l'espectre resultant de sumar els espectres de Zn-CeC i Zn-CeN (SumNC).

Aquestes dues dades en conjunt suggereixen que en Zn-CeMT2 s'obtenen complexos l'estequiometria i estructura dels quals no s'obtenen en sintetitzar les dues regions Zn-CeN i Zn-CeC per separat, i que per tant, en Zn-CeMT2 existeix algun tipus d'interacció entre aquestes dues regions de la proteïna. Per tant, els nostres resultats indiquen que en Zn-CeMT2 l'agregat adopta una estructura que dona lloc a una empremta de CD atípica per a una Zn-MT, en la qual molt probablement hi participa la His terminal. Així mateix, suggereixen una certa interacció entre els *clusters* metàl·lics de les dues regions de la proteïna.

Propietats coordinants dels pèptids enfront el Cd.

Les dades d'ICP-AES i ESI-MS per a Cd-CeMT2 i Cd-CeΔHis (Taula 3) indiquen que la capacitat coordinant global és similar pels dos agregats i que l'espècie majoritària és en els dos casos Cd₆-MT. Aquests resultats concorden amb els obtinguts per a Cd-CeMT2 per altres autors (You *et al.*, 1999). El contingut en metalls i sulfur per a la segona espècie en abundància és també idèntic en els dos casos (6 Cd i 2 S²⁻ per MT), però CeMT2 arriba a generar dímers -Cd₁₂S₄-(CeMT2)₂- mentre el mutant CeΔHis no mostra aquesta capacitat. La presència de formes dimèriques en CeMT2 però no en CeΔHis concorda amb els resultats abans esmentats per al Zn, però les formes dimèriques són amb Cd més abundants que amb Zn, i tenen una estequiometria més ben definida. Tant les mostres Cd-CeMT2 com Cd-CeΔHis contenen ions sulfur en quantitats importants, i en ambdós casos aquest contingut és superior al de les preparacions corresponents amb Zn. Tot i això, com ja s'ha observat en altres MT (Capdevila *et al.*, 2005), aquest increment en el contingut de lligands sulfur no implica una major capacitat complexant de metall i el contingut metàl·lic mitjà d'ambdós tipus de preparacions es manté en 6 metalls divalents per proteïna.

	ICP-AES	ICP-AES _{Acid}	GC-FPD	ESI-MS		
	Concentració del pèptid (M)		<i>lons S²⁻ /Pèptid</i>	Espècies majoritàries	<i>Pes molecular esperat</i>	<i>Pes molecular mesurat</i>
	<i>Estequiometria metall/MT</i>			<i>Espècies minoritàries</i>		
Cd						
CeMT2	0.7 x 10⁻⁴ 3.0 Cd	0.4 x 10⁻⁴ 5.6 Cd	3.48	Cd₆-CeMT2 dímer Cd ₁₂ S ₄ -(CeMT2) ₂ Cd ₇ -CeMT2 Cd ₆ S ₂ -CeMT2	7400.1 14936.4 7510.5 7468.2	7439.6 ± 0.4 14937.3 ± 1.3 7511.1 ± 0.7 7467.9 ± 0.4
CeΔHis	0.2 x 10⁻⁴ 3.0 Cd	0.1 x 10⁻⁴ 5.5 Cd	2.05	Cd₆-CeΔHis Cd ₆ S ₂ -CeΔHis Cd ₇ -CeΔHis	7263.0 7331.1 7373.4	7263.3 ± 0.6 7331.8 ± 0.5 7372.9 ± 0.7
CeN	2.6 x 10⁻⁴ 2.9 Cd	2.4 x 10⁻⁴ 3.0 Cd	0.41	Cd₃-CeN Cd ₃ S ₁ -CeN	3729.0 3763.1	3728.5 ± 0.9 3763.4 ± 0.7
CeC	1.9 x 10⁻⁴ 2.5 Cd	1.7 x 10⁻⁴ 2.8 Cd	1.60	Cd₃-CeC Cd ₃ S ₁ -CeC	3833.2 3867.3	3832.1 ± 1.1 3867.5 ± 1.0

Taula 3- Concentració dels pèptids recombinants i estequiometries metall/MT i sulfur/MT per als pèptids sintetitzats en medis rics en Zn i Cd.

L'espectre CD de Cd-CeMT2 i Cd-CeΔHis (Fig. 3) mostra una corba típica dels complexes Cd-MT amb un *exciton coupling* centrat a 250 nm, longitud d'ona a la que s'atribueix l'absorció dels enllaços Cd-Cys. Per sobre de 280 nm –longitud d'ona a la que absorbeixen els cromòfors Cd-S²⁻ (Capdevila *et al.*, 2005)- s'aprecien absorcions la intensitat de les quals és major per a Cd-CeMT2, coherentment amb el major contingut de sulfur d'aquesta mostra. Si bé Cd-CeMT2 mostra una major quiralitat que Cd-CeΔHis (que podria indicar una millor estructuració 3D de la primera), no s'observa desplaçament de l'empremta de CD de CeMT2 respecte a la de CeΔHis. Tot i que les dues corbes de CD no són exactament iguals, la similitud de composició d'ambdues preparacions i la presència de cromòfors anàlegs suggereixen que molt probablement aquestes dues proteïnes adopten estructures molt properes quan s'enllacen a Cd(II), i, que la His podria no participar en la coordinació de Cd en Cd-CeMT2.

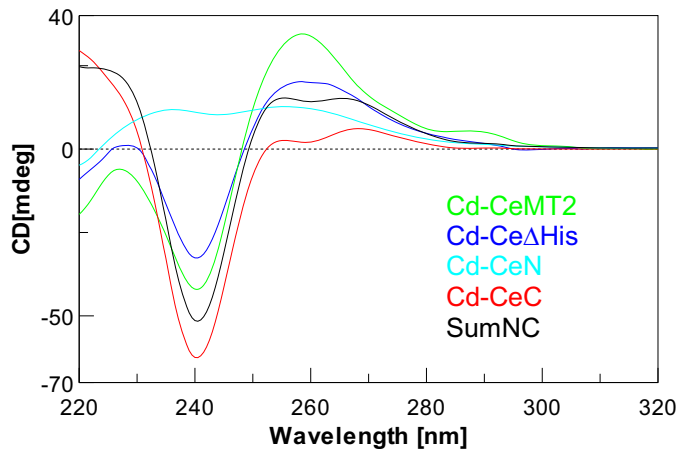
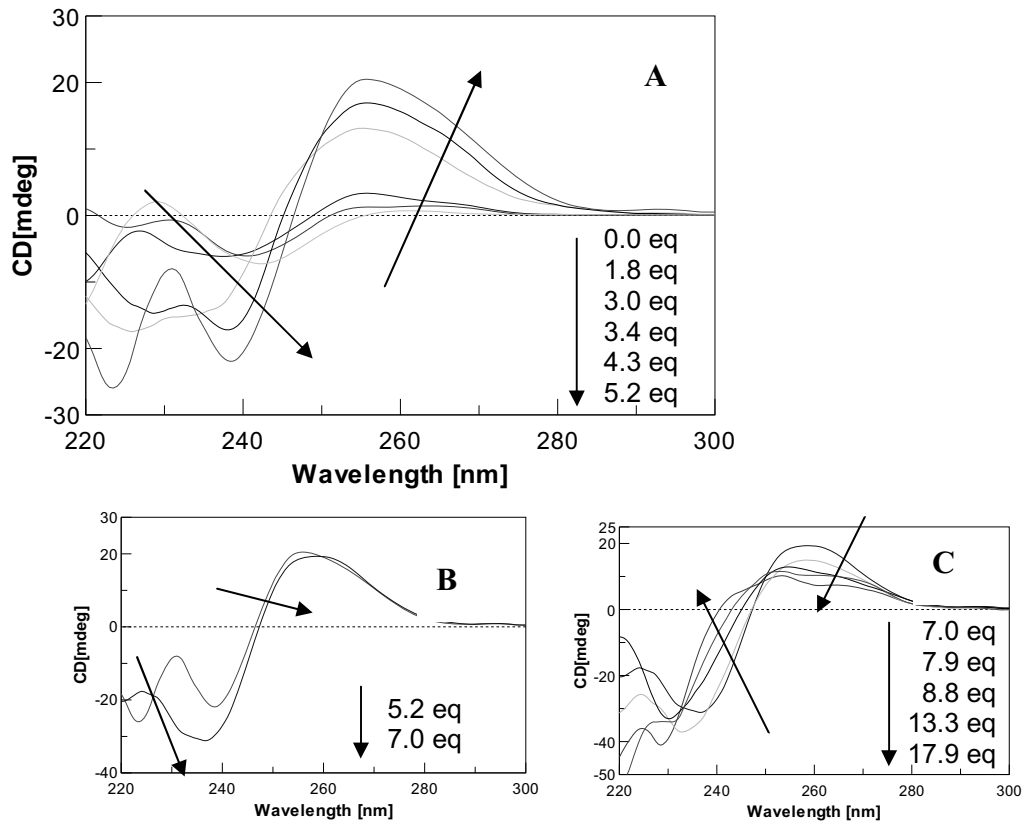


Fig. 3- Espectres de CD dels agregats Cd-MT recombinants obtinguts *in vivo*, comparats entre ells i amb l'espectre resultant de sumar els espectres de Cd-CeC i Cd-CeN (SumNC).

La valoració amb Cd(II) de la mostra Zn-CeMT2 (Fig. 4) ha posat de relleu dues característiques principals d'aquesta mostra: 1) la màxima quiralitat s'obté prop dels 6 eq de Cd (entre 5.2 i 7.0) afegits, punt a partir del qual la mostra perd quiralitat. 2) No s'arriba a reproduir l'espectre CD que s'obté per a Cd-CeMT2 sintetitzat *in vivo*. (Fig. 4D).



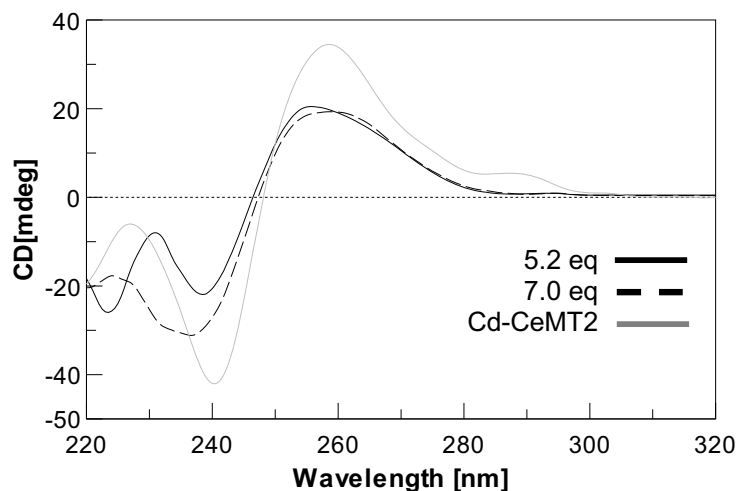


Fig. 4- Espectres de CD corresponents a la valoració Zn-CeMT2 amb Cd. A, B i C: evolució dels espectres de CD durant la valoració. D: Superposició dels espectres CD per a 5.2 i 7.0 eq afegits a Zn-CeMT2 amb l'espectre l'agregat Cd- CeMT2 obtingut *in vivo*.

La valoració de Zn-Ce Δ His amb Cd(II) (Fig. 5) ha revelat que la màxima quiralitat s'obté per a 6.2 equivalents de Cd afegits, i que en aquest punt (6-7 eq) pràcticament es reproduïx l'espectre de Cd-Ce Δ His sintetitzat *in vivo* (Fig. 5C).

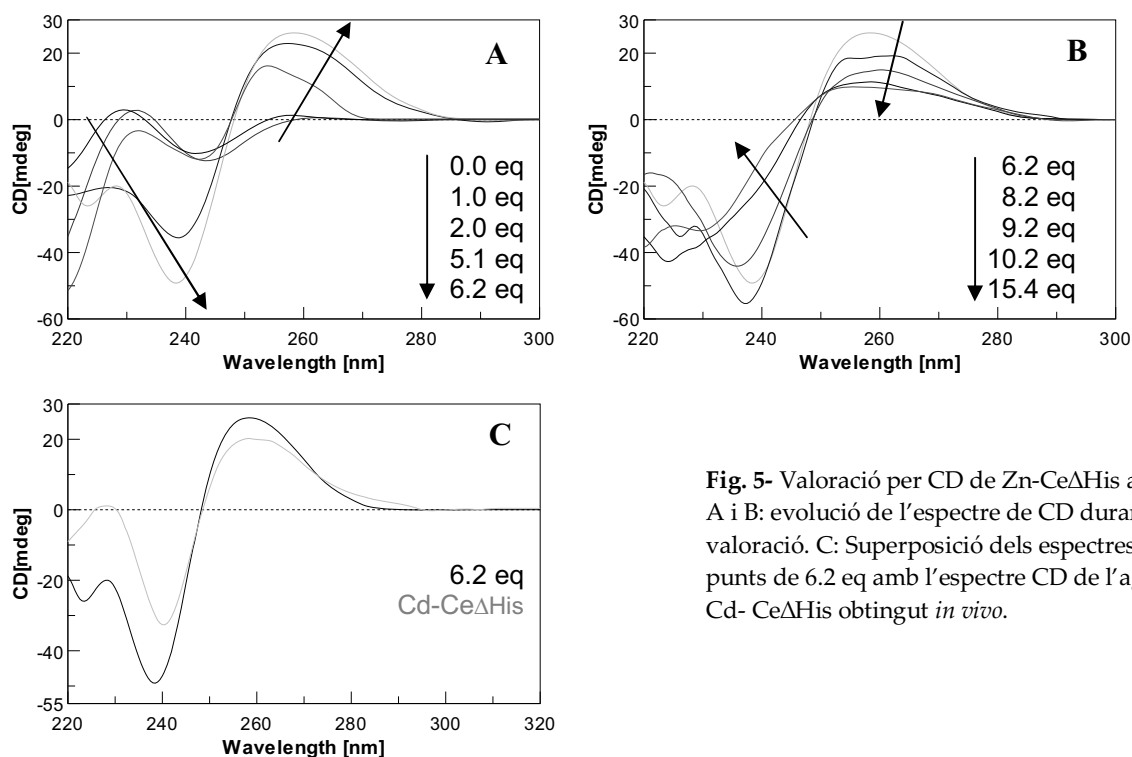


Fig. 5- Valoració per CD de Zn-Ce Δ His amb Cd. A i B: evolució de l'espectre de CD durant la valoració. C: Superposició dels espectres CD al punt de 6.2 eq amb l'espectre CD de l'agregat Cd- Ce Δ His obtingut *in vivo*.

En qualsevol cas, tant per CeMT2 com per Ce Δ His s'observen petites diferències entre els espectres obtinguts de les síntesis *in vivo* i en les valoracions al voltant dels 280 nm, que poden atribuir-se al menor contingut de sulfurs de les espècies de partida (Zn-CeMT2 i Zn-Ce Δ His).

L'ESI-MS de Cd-CeN i Cd-CeC (Taula 2) indica la presència d'exactament les mateixes espècies en les dues mostres, Cd₃ com a espècie majoritària i Cd₃S₁-MT com a espècie minoritària. No s'observen en cap dels dos casos espècies dimèriques. La suma dels espectres de CD dels dos agregats resulta en un espectre similar als de Cd-CeΔHis i Cd-CeMT2 (Fig. 3B), tot suggerint una estructura bidominal per als complexos Cd₆-CeMT2 i Cd₆-CeΔHis, amb dos *clusters* Cd₃-CeN i Cd₃-CeC, que es comportarien de manera pràcticament independent.

Propietats coordinants dels pèptids enfront el Cu.

CeMT2 i CeΔHis generen en medis rics en Cu una espècie principal amb 8 metalls, tot i que les mostres Cu-CeMT2 són heterometal·liques (és a dir, contenen Cu i Zn), mentre que les preparacions Cu-CeΔHis són homometal·liques de Cu. L'ICP-AES i l'ESI-MS indiquen que la quantitat global de metalls units per CeMT2 és inferior a la dels units per CeΔHis (Taula 4).

Els espectres de CD de Cu-CeMT2 i Cu-CeΔHis (Fig. 6A) són força semblants entre si, amb la peculiaritat de que les seves diferències més importants es troben a les regions de ca. 240 i 360 nm. La primera és l'habitualment associada als cromòfors Zn(SCys)₄, però curiosament és CeΔHis –que dona lloc a complexos homometal·lics de Cu– la que presenta absorcions a aquesta longitud d'ona. L'absència de His en aquest pèptid tampoc permet associar l'absorció a 240 nm amb enllaços Cu-His. Conseqüentment, únicament queda per considerar que CeΔHis proporciona als ions Cu(I) un entorn de coordinació particular que genera absorcions a aquesta longitud d'ona. Aquest fet no deixa de ser una deducció lògica després d'haver observat repetides vegades com al final de les valoracions amb Cu(I) amb altres proteïnes (Tío *et al.*, 2004), quan resten únicament complexos homonuclears de Cu, creixen les absorcions a ca. 240 nm. Així mateix és interessant observar també que CeMT2, que conté un promig de 2.5 Zn i 4.3 Cu per proteïna, no mostra absorcions de CD a aquesta longitud d'ona. Contràriament, mostra absorcions en el rang 320-400 nm, característiques de les MT que contenen només Cu amb entorns de coordinació també molt peculiars (Tío *et al.*, 2004). Aquestes diferències entre CeMT2 i CeΔHis juntament amb totes les seves diferències en composició suggereixen estructures força divergents. Addicionalment, tot i que la participació de la His en la coordinació a Cu(I) no s'observa en les dades espectroscòpiques, els resultats suggereixen que la manca de la His en Cu-CeΔHis provoca un canvi en les preferències de coordinació metal·lica. CeMT2 no sembla formar agregats estructurats i estables únicament amb Cu, el que li confereix un caràcter de Zn-tioneïna.

	ICP-AES	ICP-AES _{Acid}	GC-FPD	ESI-MS*		
	Concentració del pèptid (M) Estequiometria metall/MT		<i>Ions S²⁻</i> <i>/Pèptid</i>	Espècies majoritàries Espècies minoritàries	<i>Pes molecular</i> <i>esperat</i>	<i>Pes molecular</i> <i>mesurat</i>
CeMT2	0.7 x 10⁻⁴ 2.2 Zn 3.9 Cu	0.6 x 10⁻⁴ 2,5 Zn 4.3 Cu	0.5	M₈-CeMT2 M₉-CeMT2 M ₈ S ₁ -CeMT2 M ₇ -CeMT2 M ₆ -CeMT2	7241.4 ± 3.3 7304.3 ± 3.7 7275.4 ± 3.4 7178.4 ± 2.9 7115.4 ± 2.5	7241.2 ± 1.4 7303.8 ± 1.2 7275.0 ± 0.9 7177.8 ± 0.3 7115.9 ± 1.0
CeΔHis	0.4 x 10⁻⁴ 6.0 Cu	0.3 x 10⁻⁴ 7.9 Cu	0.3	Cu₈-CeΔHis Cu₈S₁-CeΔHis Cu ₉ -CeΔHis Cu ₉ S ₁ -CeΔHis Cu ₁₀ -CeΔHis	7100.9 7135.0 7163.5 7197.5 7226.0	7100.4 ± 0.8 7135.4 ± 0.5 7163.8 ± 0.7 7196.9 ± 1.0 7225.8 ± 0.4
CeN	1 x 10⁻⁴ 4.2 Cu	1 x 10⁻⁴ 4.4 Cu	---	Cu₅-CeN	3710.6	3710.1 ± 1.1
CeC (1)	1.8 x 10⁻⁴ 1.1 Zn 2.5 Cu	1.8 x 10⁻⁴ 1.1 Zn 2.6 Cu	---	M₄-CeC M₅-CeC	3753.9 ± 1.7 3816.9 ± 2.1	3753.0 ± 0.8 3816.3 ± 0.6
CeC (2)	0.8 x 10⁻⁴ 0.3 Zn 3.4 Cu	0.8 x 10⁻⁴ 0.5 Zn 3.5 Cu	---	M₈-(CeC)₂ M₉-(CeC)₂	7507.8 ± 3.4 7570.7 ± 3.8	7506.6 ± 0.9 7568.9 ± 0.8

Taula 4- Concentració dels 4 pèptids recombinants i estequiometries metall/MT i sulfur/MT per als pèptids sintetitzats en medi ric en Cu. * En els agregats de mostres heterometàl·liques, la massa molecular calculada és la mitjana entre les masses calculades per a l'agregat contenint únicament Zn i l'agregat contenint únicament Cu. L'error expressat en les masses moleculars esperades expressa la variació que pot donar-se en la massa esperada depenent de la proporció d'ions de Cu i Zn.

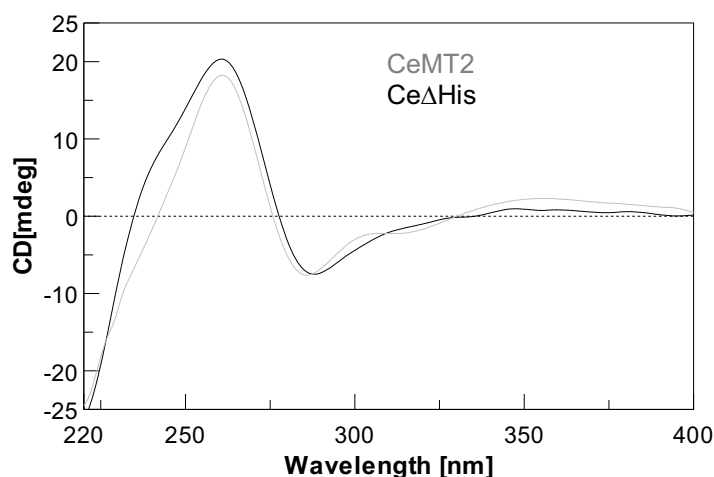


Fig. 6- Superposició dels espectres de CD de les preparacions metall-MT obtingudes en síntesis en medis enriquits amb Cu.

El pèptid CeN dona lloc a un únic agregat homometàl·lic Cu_5-CeN , amb un espectre de CD clarament diferent al dels altres pèptids sintetitzats en medis rics en Cu, si bé per sobre de 300 nm pràcticament coincideix amb el de CeMT2, indicant així que les espècies Cu_5-CeN també contenen ions Cu en aquests entorns de coordinació peculiars proposats per a MT4 (Tío *et al.*, 2004). Per al pèptid CeC, s'han obtingut 2 resultats possibles (Taula 3), CeC (1) i CeC (2). Els agregats obtinguts contenen en els dos casos 4-5 ions metàl·lics, però la proporció d'ions de Zn és diferent. La formació de dímers en Cu-CeC no s'observa en Zn-CeC ni Cd-CeC, per tant, més que una propietat per part d'aquest pèptid, podria ser una estratègia d'estabilització d'agregats poc estructurats, ja que la formació de dímers es dona en aquells agregats amb menor proporció de Zn.

Els ions sulfur semblen estar presents exclusivament en els agregats Cu-CeMT2 i Cu-CeΔHis. Cu-CeC i Cu-CeN no presenten nivells de sulfur observables, tot i presentar-los en els seus agregats amb Zn i Cd. La pèrdua de la capacitat d'unió d'ions sulfur en formar agregats de Cu ha estat ja observada en altres dominis aïllats MT amb poques Cys, com és el cas dels dominis independents N25 i C18 de la MT QsMT de *Quercus suber* (Domenech *et al.*, 2005).

Tant la comparació dels continguts globals de metall com la comparació dels CD indiquen que els dominis CeN i CeC mostren comportaments no additius respecte a CeMT2, suggerint, per tant, que els dos dominis no són independents en CeMT2.

CONCLUSIONS

CeMT2 uneix 6 ions divalents en ser sintetitzada en medis rics en Zn o Cd, i 8 metalls en ésser sintetitzada en medi ric en Cu. Els resultats per a metalls divalents són similars als obtinguts per a la MT de crustaci, amb el mateix nombre de Cys (Valls *et al.*, 2001) i els obtinguts per a CeMT2 per altres autors (You *et al.*, 1999). La incapacitat de CeMT2 de formar agregats homometàl·lics de Cu indica que aquesta MT té preferència pel Zn, i per tant ha de ser considerada una Zn-tioneïna. En les MT de mamífer (també Zn-tioneïnes) la preferència pel Zn sembla estar determinada per la regió C-terminal (domini *alfa*). CeMT2 es comporta segons un model similar, ja que l'alteració o deleció de la regió C-term ha donat lloc a pèptids amb preferència pel Cu (CeΔHis i CeN), mentre els pèptids que conservaven la regió C-term intacta manifestaven preferència pel Zn (CeMT2 i CeC). Concretament, el caràcter de Cu-tioneïna de CeΔHis indica

que la deleció de la His és suficient per a provocar una inversió del comportament coordinant de Zn-tioneïna a Cu-tioneïna.

Així mateix, la capacitat de dimerització en coordinar metalls divalents es perd en mancar la His terminal. La formació de dímers a través de la His C-terminal ha estat proposada per altres autors en la MT de *Gallus gallus* (Villarreal *et al.*, 2006), i podria ser un mecanisme també present en CeMT2. Tot i que en altres MT, la dimerització implica un increment de la capacitat coordinant (Palumaa *et al.*, 1992), els dímers detectats en Zn-CeMT2 i Cd-CeMT2 no incrementen el contingut metàl·lic global de l'agregat. En els seus agregats amb Cd, CeMT2 conté quantitats d'ions sulfur superiors als agregats amb Zn i Cu, i a la majoria dels agregats amb Cd d'altres MT (Capdevila *et al.*, 2005), que tampoc impliquen un increment en la capacitat quelatant.

La metodologia de treball basada en la dissecció de les aportacions funcionals dels diversos dominis d'una MT ha estat usada amb èxit en altres MT (Capdevila *et al.*, 1997; Tio *et al.*, 2004; Domenech *et al.*, 2005)

L'estudi de la capacitat complexant envers Zn i Cu dels dos putatius dominis evidencia que no es compleixen les regles generals d'additivitat que s'accepten paradigmàticament per les MT de mamífer, ja que l'estequiometria i els espectres CD dels agregats formats per CeMT2 no són reproduïts per la suma d'aquests paràmetres dels dos dominis aïllats, fet que suggereix una estreta interacció entre els dominis, i que aquestes dues regions no es comporten independentment en CeMT2 amb aquests metalls.

Per una altra banda, el CD de Zn-CeMT2 és altament atípic per a un complex Zn-MT i de fet estudis cromatogràfics amb CeMT2 varen dur a suggerir una estructuració global d'aquesta MT molt diferent a la de mamífer (You *et al.*, 1999).

Resultats d'altres autors indiquen que la composició en Cys i les connectivitats Cd-Cys de CeMT2 són similars a les de la MT de crustaci (You *et al.*, 1999), i que la unió del Cd a la forma Apo de CeMT2 és cooperativa, passant pels estadis Cd₃ i Cd₆ (Gehrig *et al.*, 2000). Els valors obtinguts pel mateix experiment en les MT de mamífer (Cd₄ i Cd₇) i del crustaci *Callinectes sapidus* (Cd₃ i Cd₆), coincideixen amb el contingut metàl·lic del domini a C-terminal i la MT sencera, respectivament. Aquestes dades recolzen l'estructuració de Cd-CeMT2 en dos dominis CeN i CeC independents. Els nostres resultats recolzen aquesta proposta, ja que els espectres de CD i el contingut de metalls són additius respecte els de CeMT2 amb el Cd, de manera que la dependència/independència dels dominis dependria del metall coordinat .

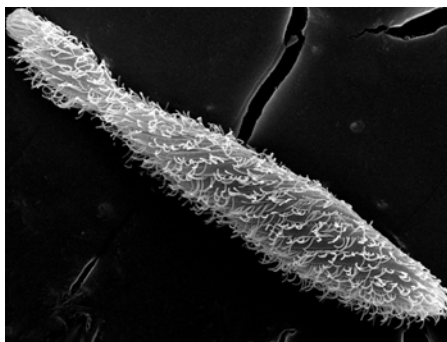
BIBLIOGRAFIA

- Afonso, C., Hathout, Y. & Fenselau, C. (2002). Qualitative characterization of biomolecular zinc complexes by collisionally induced dissociation. *J Mass Spectrom* 37(7), 755-9.
- Armitage, I. M., Otvos, J. D., Briggs, R. W. & Boulanger, Y. (1982). Structure elucidation of the metal-binding sites in metallothionein by ¹¹³Cd NMR. *Fed Proc* 41(13), 2974-80.
- Bertini, I., Hartmann, H. J., Klein, T., Liu, G., Luchinat, C. & Weser, U. (2000). High resolution solution structure of the protein part of Cu₇ metallothionein. *Eur J Biochem* 267(4), 1008-18.
- Binz, P. A., Kägi, J.H.R. (2001). <http://www.biochem.unizh.ch/mtpage/MT.html>.
- Blindauer, C. A., Harrison, M. D., Parkinson, J. A., Robinson, A. K., Cavet, J. S., Robinson, N. J. & Sadler, P. J. (2001). A metallothionein containing a zinc finger within a four-metal cluster protects a bacterium from zinc toxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(17), 9593-8.
- Bofill, R., Palacios, O., Capdevila, M., Cols, N., Gonzalez-Duarte, R., Atrian, S. & Gonzalez-Duarte, P. (1999). A new insight into the Ag⁺ and Cu⁺ binding sites in the metallothionein beta domain. *J Inorg Biochem* 73(1-2), 57-64.
- Capdevila, M., Cols, N., Romero-Isart, N., Gonzalez-Duarte, R., Atrian, S. & Gonzalez-Duarte, P. (1997). Recombinant synthesis of mouse Zn₃-beta and Zn₄-alpha metallothionein 1 domains and characterization of their cadmium(II) binding capacity. *Cell Mol Life Sci* 53(8), 681-8.

- Capdevila, M., Domenech, J., Pagani, A., Tio, L., Villarreal, L. & Atrian, S. (2005). Zn- and Cd-metallothionein recombinant species from the most diverse phyla may contain sulfide (S₂-) ligands. *Angew Chem Int Ed Engl* 44(29), 4618-22.
- Cobine, P. A., McKay, R. T., Zangger, K., Dameron, C. T. & Armitage, I. M. (2004). Solution structure of Cu₆ metallothionein from the fungus *Neurospora crassa*. *Eur J Biochem* 271(21), 4213-21.
- Cols, N., Romero-Isart, N., Capdevila, M., Oliva, B., Gonzalez-Duarte, P., Gonzalez-Duarte, R. & Atrian, S. (1997). Binding of excess cadmium(II) to Cd²⁺-metallothionein from recombinant mouse Zn²⁺-metallothionein 1. UV-vis absorption and circular dichroism studies and theoretical location approach by surface accessibility analysis. *J Inorg Biochem* 68(3), 157-66.
- Domenech, J., Mir, G., Huguet, G., Capdevila, M., Molinas, M. & Atrian, S. (2006). Plant metallothionein domains: functional insight into physiological metal binding and protein folding. *Biochimie* 88(6), 583-93.
- Domenech, J., Palacios, O., Villarreal, L., Gonzalez-Duarte, P., Capdevila, M. & Atrian, S. (2003). MTO: the second member of a *Drosophila* dual copper-thionein system. *FEBS Lett* 533(1-3), 72-8.
- Egli, D., Domenech, J., Selvaraj, A., Balamurugan, K., Hua, H., Capdevila, M., Georgiev, O., Schaffer, W. & Atrian, S. (2006). The four members of the *Drosophila* Metallothionein family exhibit distinct yet overlapping in heavy metal homeostasis and detoxification. *Genes to Cells* 11(6), 647-58.
- Fabris, D., Zaia, J., Hathout, Y., Fenselau, C. (1996). Retention of thiol protons in two classes of protein zinc coordination centers. *J Am Chem Soc* 118, 12242-3.
- Freedman, J. H., Slice, L. W., Dixon, D., Fire, A. & Rubin, C. S. (1993). The novel metallothionein genes of *Caenorhabditis elegans*. Structural organization and inducible, cell-specific expression. *J Biol Chem* 268(4), 2554-64.
- Gehrig, P. M., You, C., Dallinger, R., Gruber, C., Brouwer, M., Kagi, J. H. & Hunziker, P. E. (2000). Electrospray ionization mass spectrometry of zinc, cadmium, and copper metallothioneins: evidence for metal-binding cooperativity. *Protein Sci* 9(2), 395-402.
- Imagawa, M., Onozawa, T., Okumura, K., Osada, S., Nishihara, T. & Kondo, M. (1990). Characterization of metallothionein cDNAs induced by cadmium in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Biochem J* 268(1), 237-40.
- Kägi, J. H. R. (1993). Evolution, structure and chemical activity of class I metallothioneins: An overview. In Suzuki KT, I.N.a.K.M. (Ed.) *Metallothionein III, Biological Roles and Implications*. pp. 29-55). Birkhauser Verlag, Basel.
- Kille, P., Winge, D. R., Harwood, J. L. & Kay, J. (1991). A plant metallothionein produced in *E. coli*. *FEBS Lett* 295(1-3), 171-5.
- Kondo, M., Imagawa, M., Maruyama, K., Okada, Y., Tsunasawa, S. & Nishihara, T. (1990). Biochemical and immunochemical characterization of *Caenorhabditis elegans* metallothioneins I and II induced by cadmium. *Biomed Environ Sci* 3(3), 315-25.
- Mir, G., Domenech, J., Huguet, G., Guo, W. J., Goldsbrough, P., Atrian, S. & Molinas, M. (2004). A plant type 2 metallothionein (MT) from cork tissue responds to oxidative stress. *J Exp Bot* 55(408), 2483-93.
- Nielson, K. B. & Winge, D. R. (1985). Independence of the domains of metallothionein in metal binding. *J Biol Chem* 260(15), 8698-701.
- Pagani, A., Villarreal, L., Capdevila, M. & Atrian, S. (2006). Manuscript in preparation.
- Palumaa, P., Mackay, E. A. & Vasak, M. (1992). Nonoxidative cadmium-dependent dimerization of Cd²⁺-metallothionein from rabbit liver. *Biochemistry* 31(7), 2181-6.
- Peterson, C. W., Narula, S. S. & Armitage, I. M. (1996). 3D solution structure of copper and silver-substituted yeast metallothioneins. *FEBS Lett* 379(1), 85-93.
- Riek, R., Precheur, B., Wang, Y., Mackay, E. A., Wider, G., Guntert, P., Liu, A., Kagi, J. H. & Wuthrich, K. (1999). NMR structure of the sea urchin (*Strongylocentrotus purpuratus*) metallothionein MTA. *J Mol Biol* 291(2), 417-28.
- Romero-Isart, N., Cols, N., Termansen, M. K., Gelpi, J. L., Gonzalez-Duarte, R., Atrian, S., Capdevila, M. & Gonzalez-Duarte, P. (1999). Replacement of terminal cysteine with histidine in the metallothionein alpha and beta domains maintains its binding capacity. *Eur J Biochem* 259(1-2), 519-27.
- Slice, L. W., Freedman, J. H. & Rubin, C. S. (1990). Purification, characterization, and cDNA cloning of a novel metallothionein-like, cadmium-binding protein from *Caenorhabditis elegans*. *J Biol Chem* 265(1), 256-63.

- Swain, S. C., Keusekotten, K., Baumeister, R. & Sturzenbaum, S. R. (2004). *C. elegans* metallothioneins: new insights into the phenotypic effects of cadmium toxicosis. *J Mol Biol* 341(4), 951-59.
- Tio, L., Villarreal, L., Atrian, S. & Capdevila, M. (2004). Functional differentiation in the mammalian metallothionein gene family: metal binding features of mouse MT4 and comparison with its paralog MT1. *J Biol Chem* 279(23), 24403-13.
- Tomney, A. M., Shi, J., Lindsay, W. P., Urwin, P. E. & Robinson, N. J. (1991). Expression of the pea gene PSMTA in *E. coli*. Metal-binding properties of the expressed protein. *FEBS Lett* 292(1-2), 48-52.
- Valls, M., Bofill, R., Gonzalez-Duarte, R., Gonzalez-Duarte, P., Capdevila, M. & Atrian, S. (2001). A new insight into metallothionein (MT) classification and evolution. The *in vivo* and *in vitro* metal binding features of *Homarus americanus* recombinant MT. *J Biol Chem* 276(35), 32835-43.
- Valls, M., Bofill, R., Romero-Isart, N., Gonzalez-Duarte, R., Abian, J., Carrascal, M., Gonzalez-Duarte, P., Capdevila, M. & Atrian, S. (2000). *Drosophila* MTN: a metazoan copper-thionein related to fungal forms. *FEBS Lett* 467(2-3), 189-94.
- Villarreal, L., Tio, L., Capdevila, M. & Atrian, S. (2006). Comparative metal binding and genomic analysis of the avian (chicken) and mammalian metallothionein. *Febs J* 273(3), 523-35.
- You, C., Mackay, E. A., Gehrig, P. M., Hunziker, P. E. & Kagi, J. H. (1999). Purification and characterization of recombinant *Caenorhabditis elegans* metallothionein. *Arch Biochem Biophys* 372(1), 44-52.

Article 6- Insight into the structural and functional properties of protozoan metallothionein: *Tetrahymena pyriformis* TpMT1 Zn(II), Cd(II) and Cu(I)-binding behaviour. (Article en redacció)



Presentació

La peculiar distribució de Cys en les MT de *Tetrahymena* sembla tenir una importància funcional, tant per la seva conservació, com per la seva correspondència amb els patrons d'inducció per Cd o Cu dels corresponents gens. L'estructura primària de les MT de *Tetrahymena* presenta diferències importants amb les altres MT, que podrien tenir conseqüències en l'estructuració dels agregats. Quines peculiaritats a nivell d'estructura presenten aquestes MT? Tenen els triplets Cys algun efecte singular sobre l'estructura i la coordinació metàl·lica?

L'anomenada isoforma MT1 és l'única present en totes les espècies del gènere *Tetrahymena*, i el seu caràcter de MT ancestral en el sistema *Tetrahymena* la converteix en una bona candidata per a l'estudi del comportament coordinant. Per respondre a les qüestions plantejades, en aquesta tesi, a partir del cDNA amablement cedit per la Dra. E. Piccini, de la Universitat de Padova, s'ha dut a terme la síntesi heteròloga de TpMT1 (MT1 de *T.pyriformis*), i l'estudi de les propietats coordinants i estructurals dels seus agregats amb Zn, Cd i Cu.

La caracterització de les propietats coordinants ha estat realitzada en col·laboració amb el Dr. Roger Bofill, del grup de recerca de la Dra. Mercè Capdevila, del Departament de Química de la Universitat Autònoma de Barcelona, que ha dut a terme els estudis *in vitro* que es presenten en aquest article.

Resum

La MT TpMT1 del protozou *T.pyriformis* té 31 Cys, 12 de les quals estan disposades en triplets. En aquest article, presentem la síntesi heteròloga de TpMT1 en medis suplementats en Zn, Cu i Cd, i la caracterització per tècniques espectroscòpiques (CD, UV-vis, ICP-AES, GC-FPD) i espectromètriques (ESI-MS) dels agregats metall-TpMT1 formats *in vivo* i els agregats formats *in vitro* mitjançant substitució Zn/Cu i Zn/Cd.

Les síntesis en medis enriquits en Zn, Cd i Cu resulten, respectivament, en les espècies majoritàries Zn₁₁-TpMT1, Cd₁₁-TpMT1, i Zn_xCu_y-TpMT1 (on x+y= 8-20), i en tots tres casos, els agregats contenen ions sulfur. El CD mostra un elevat grau d'estructuració dels complexos, excepte per als agregats obtinguts en medi ric en Cu. La substitució Zn/Cd i Zn/Cu resulta en agregats de característiques equivalents a les dels obtinguts *in vivo*. D'acord amb aquests resultats, la preferència metàl·lica de TpMT1 seria Cd(II)>Zn(II)> Cu(I) i per tant, TpMT1 es pot classificar com una Zn-tioneïna, en coherència amb el que s'ha proposat en la bibliografia a partir dels seus patrons d'inducció gènica.

Insight into the structural and functional properties of protozoan metallothionein: *Tetrahymena pyriformis* TpMT1 Zn(II), Cd(II) and Cu(I) – binding behavior.

ABSTRACT

Protozoan Metallothioneins (MTs) have been widely studied with respect to their induction patterns and the structure of their coding genes. Nevertheless, little information is available concerning their metal binding preferences and the structure of the metal-thiolate clusters they conform. In this paper we report the heterologous synthesis of a MT from the Ciliate *Tetrahymena pyriformis*, the isoform MT1 or tpMT1, in Zn, Cu or Cd-supplemented media. TpMT1 is a 107-residue long protein with 31 Cys, 12 of them are distributed as 4 Cys triplets. We have characterized by spectroscopic (CD, UV-vis, ICP-OES, GC-FPD) and spectrometric (ESI-MS) techniques their *in vivo*-constituted metal-MT complexes and those formed during the *in vitro* Zn/Cd and Zn/Cu displacement processes. Biosynthesis of tpMT1 in the presence of Zn(II) renders an expected major Zn₁₁-tpMT1 species with a conventional CD fingerprint. This species evolves by *in vitro* Zn/Cd replacement to a major Cd₁₁-tpMT1 complex with identical features to those obtained *in vivo* in Cd-supplemented media. Biosynthesis of tpMT1 in the presence of Cu(I) renders a mixture of Cu_xZn_y-mixed metal species of low folding degree where $x+y=8-20$, and which can also be obtained by Zn/Cu replacement. Furthermore, all the *in vivo* Zn-, Cd- and Cu-tpMT1 recombinant aggregates contain sulfide anions (S²⁻) as additional ligands. According to these results, it is postulated that the preference of tpMT1 for the studied metal ions can be summarized in the Cd(II) > Zn(II) > Cu(I) order, and in consequence tpMT1 may be classified as a Zn-thionein. These preferences are also consistent with the induction patterns of tpMT1 and its postulated role in Cd-detoxification. Furthermore, the absence of Cys triplets in the unique *Tetrahymena* MT induced by Cu (isoform 2) and the results here reported suggest that Cu binding in *Tetrahymena* MTs could be impaired by the presence of the four Cys triplets.

Keywords: *Tetrahymena*, metallothionein, Cys-Cys-Cys, sulfide, metal coordination, Zn(II) binding, Cu(I) binding, Cd(II) binding.

INTRODUCTION

Metallothioneins (MTs) are low molecular weight, cysteine-rich proteins with an increased heavy metal binding capacity. They constitute an heterogeneous protein super-family of non-homologous peptides, ubiquitously distributed amongst all living organisms, such as Eukaryota (animals, plants, fungi and protozoa) together with some prokaryota (Cyanobacteria), (Binz, 2001). Most of the chemical, structural, genetic and physiological information available nowadays for MTs has been gathered from the exhaustive analysis of the mammalian isoforms MT1&MT2 (Kägi & Kojima, 1987; Kägi, 1993), but unfortunately, the lack of homology among most MTs precludes any direct extrapolation of both structure and function features. For this reason, direct characterization of at least one member of each kind of MT subfamily is necessary to render a general overview of how these peptides emerged, evolved and adapted to diverse functional conditions in different taxa.

Ciliate protozoa (*Tetrahymena*) MTs constitute an excellent example of a MT subfamily considerably divergent from the vertebrate paradigm. Since the first description of a MT peptide in *T.pyriformis* as responsible of metal-resistance (Piccinni *et al.*, 1987), several variants and isoforms have been isolated both in this species and in the co-generic *T.pigmentosa* and *T.termophila*, overall yielding a highly complex gene/protein system. Nowadays, the *Tetrahymena* MT family is considered a multi-stress response system that serves as a model for the study of functional specificity among its members. Besides, the corresponding MT gene promoters are used to build new genetic engineering tools (Shang *et al.*, 2002).

Tetrahymena MTs have been studied mainly from a molecular genetics point of view, this including gene isolation and sequencing and promoter characterization in an attempt to deduce putative physiological functions from a particular gene induction patterns (kind of inducer metal ions). Thus, cadmium-induced MTs have been related to stress (heavy metal) defenses and copper-induce MTs rather to physiological functions, in accordance also with a higher constitutive expression level of the latter. This excellent degree of knowledge of *Tetrahymena* MTs at genetic level contrast with the lack of information on the metal-binding properties of the encoded MT proteins, taking into account that functional specialization probably relies both on promoter inducibility and on protein function differentiation. Two MT encoding regions have been identified in all the *Tetrahymena* species so far analyzed (*T.pyriformis*, *T.pigmentosa* and *T.termophila*), a cadmium-induced MT1 and a copper-induced MT2 gene (Piccinni *et al.*, 1999; Santovito *et al.*, 2001; Boldrin *et al.*, 2003). No additional isoforms have been described in *T.pyriformis* and *T.pigmentosa*, but contrarily *T.termophila* encodes up to 6 different MT, with both the Cd- and the Cu-specific MTs duplicated (MTT1 and MTT2/4, respectively), and two other MT (MTT3 and MTT5) apparently also Cd-induced (Shang *et al.*, 2002; Boldrin, 2003; Díaz *et al.*, 2003; Santovito *et al.*, 2005; Fu & Miao, 2006). Furthermore, polymorphism has been reported for some of the *T.termophila* peptides (i.e. MT1a, MT1b forms) (Piccinni *et al.*, 1994).

Tetrahymena MT protein sequences are rather heterogeneous, both regarding their unusually long peptide length (from 96 to 181 residues), Cys content (24 to 42 Cys) and Cys arrangement (XCX, XCCX, XCCCX motives). Table 1 summarizes the main features of all the known *Tetrahymena* MTs, and Fig. 1 includes their protein sequence alignment and corresponding protein distance tree, showing that the divergence in length is mainly due to the N-term portion of some isoforms, that is thought to have been generated by internal gene duplications (Boldrin *et al.*, 2003). The only metal coordination data of *Tetrahymena* MTs found in the literature refer to their global metal binding capacity. Hence, it has been described that *T.termophila* MTT1 binds at least 16 Cd atoms per molecule (Dondero *et al.*, 2004), whereas *T.pigmentosa* and *T.pyriformis* MT1 have been shown to bind up to 12 Cd *in vitro* (Piccinni *et al.*,

1994). Regarding Cu-binding stoichiometries, native MT1 from *T.pigmentosa* results in a metallic of Cu₇-MT species (Santovito *et al.*, 2001).

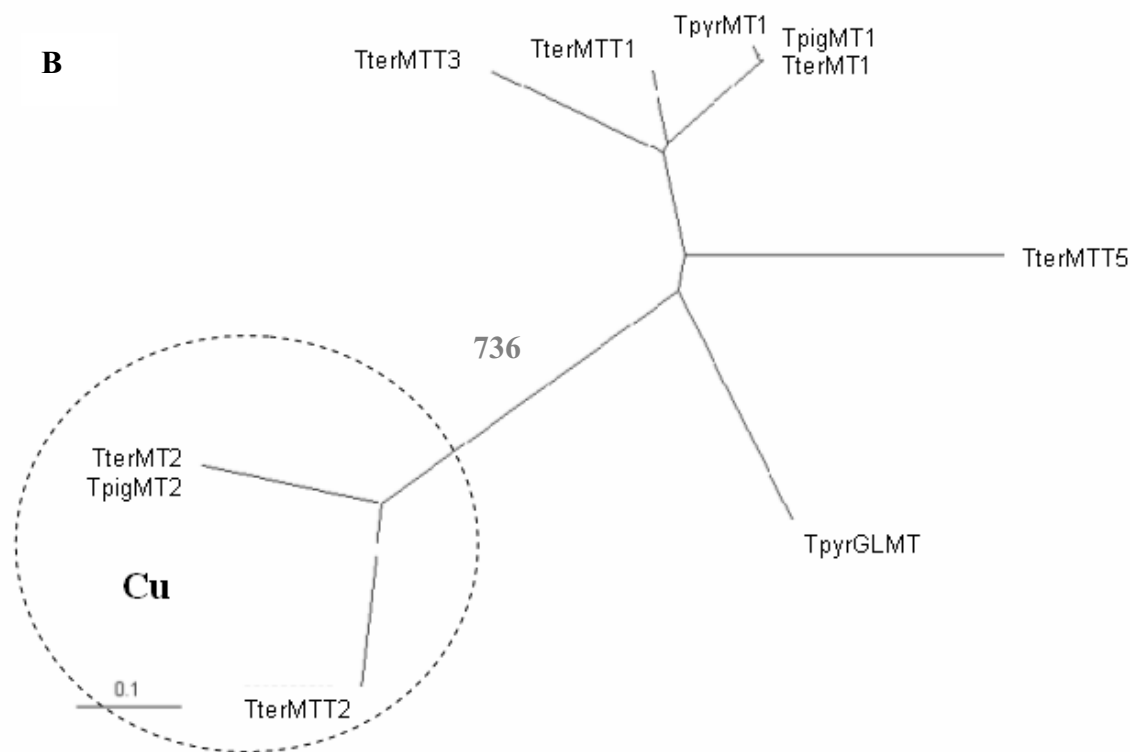
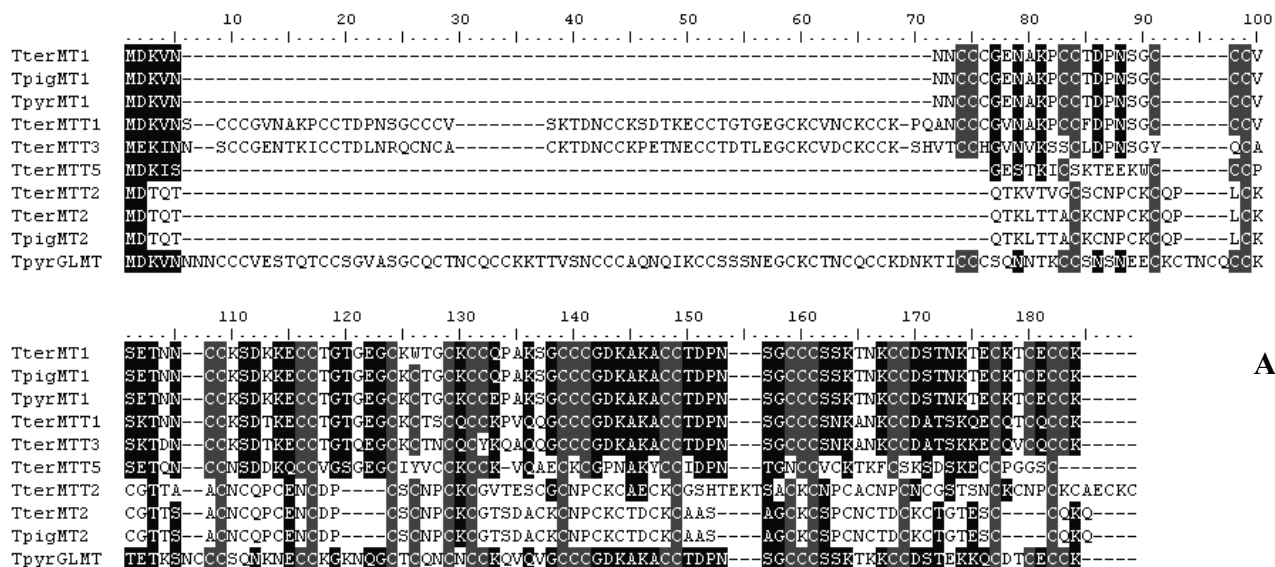


Fig. 1- A) Clustal W output of the multiple alignment of *Tetrahymena* MT sequences, constructed using the Blossum62 weight matrix. The names of the organisms are: Tter (*T.termophila*), Tpig (*T.pigmentosa*) and T.pyr (*T.pyriformis*). **B)** Protein distance tree, constructed by neighbour-joining method from the alignment shown in A. Cu-induced MT isoforms appear grouped together, with a bootstrap value of 736 over 1000 bootstraps.

Tetrahymena sp. MT1 is a 107 residues long Cd-inducible MT including 31 Cys, 12 of which distributed as Cys triplets. In this work, we have performed the heterologous synthesis

of *Tetrahymena pyriformis* MT1 (tpMT1) in Zn, Cu and Cd-supplemented media, and we have characterized by spectroscopic and spectrometric techniques the *in vivo*-constituted metal-tpMT1 complexes, as well as those formed during the *in vitro* Zn/Cd and Zn/Cu exchange reactions. Furthermore, the Zn-tpMT1 species has been analyzed through Raman spectrometry. The combined results of all these methodologies constitute the first detailed metal coordination analysis of a MT peptide longer than 100 residues and including Cys triplets in its sequence. According to our results, tpMT1 exhibits an optimum binding behavior towards divalent metals (Zn-thionein), which is highly consistent with the Cd-inducibility character of its gene.

MATERIALS AND METHODS

Mutagenesis and cloning of Tetrahymena MT1 cDNA

The cDNA coding region for *Tetrahymena pyriformis* TpMT1 cDNA was kindly provided by Dr. E. Piccini (Department of Biology, University of Padova, Italy) and used as a template for the construction of a TpMT1 coding region adapted to *E.coli* codon-usage and flanked by the restriction sites *Bam*HI and *Sal*I for subcloning purposes. The universal TAA translation STOP codon encodes Gln in the peculiar *Tetrahymena* genetic code (Tourancheau *et al.*, 1995). Therefore, in order to express TpMT1 in *E.coli*, the cDNA was mutagenized, so that a CAA triplet substituted for the original 59th TAA Gln codon in TpMT1. To this end, a PCR-mediated site directed mutagenesis strategy (Romero-Isart *et al.*, 1999) was applied, using THRYMUT (5' AAGTGTGCCAACCTGCTAAA 3') as upstream primer and THRY3S (5' CCCCGTCGACTCATTGCAACA 3') as downstream primer, on the TpMT1 cDNA template. The PCR-amplified fragment was a 109-bp region encoding from the Lys56 to the end of TpMT1, with the Gln59 codon already mutagenized. This PCR product (MEGAMUT) was purified from agarose (1%) electrophoresis gel, diluted to a suitable concentration and used in as downstream megaprimer in a second PCR amplification, together with THRY5B (5' CCCCGATCCATGGATAAGGTT 3') as upstream primer, also on the TpMT1 cDNA template. As a result, a DNA fragment encoding the entire TpMT1 peptide, but with CAA codon at the position 59 was obtained. The fragment was flanked by *Bam*HI and *Sal*I restriction sites introduced respectively by the THRY5B and THRY3S oligonucleotides (underlined). All PCR reactions were performed according to the following conditions: after enzyme activation (5 min at 95 °C), 30 cycles of amplification consisting of 30 s at 95 °C (denaturation), 30 s at 55-60 °C (hybridization) and 45 s at 74 °C (elongation). Elongation conditions were maintained during 5 minutes after 30 cycles. PCR amplifications were performed in 100 µl final volume reactions, containing 1 u Vent DNA polymerase (New England Biolabs), 0.2 mM dNTPs, 100 pmols of the required primers at 2 mM MgCl₂, final concentration. The final PCR product was analyzed by agarose gel electrophoresis and ethidium bromide staining and the band with the expected size was excised, digested with *Bam*HI and *Sal*I and subcloned in the vector pGEX-4T2 (GE Healthcare Life Sciences, Amersham Pharmacia Biotech) for its expression of TpMT1 in *E.coli* cells as a fusion with Glutathione-S-Transferase (GST), following the same rationale than for mammalian MT (Capdevila *et al.*, 1997). BL21 cells were transformed with the plasmid, denominated pGEX-TpMT1. The integrity of the pGEX-TpMT1 coding region was reconfirmed by DNA sequencing using the ABIPRISM Dye Terminator-Cycle Sequencing Ready reaction kit (Perkin Elmer) in an Applied Biosystems ABIPRISM 310 Automatic Sequencer.

In vivo-synthesis and purification of recombinant metallothioneins

The recombinant peptide was biosynthesized in 3 liter-Luria Bertani batches, inoculated with 300 ml of an overnight pre-culture *E. coli* BL21 cells transformed with pGEX-TpMT1. Induction with isopropyl β -D-thiogalactopyranoside (IPTG) was performed at $OD_{600} = 0.8$, and cultures were further grown for 3 h in the presence of 500 μ M $CuSO_4$, 300 μ M $ZnCl_2$ or 300 μ M $CdCl_2$. Cells were harvested by centrifugation (Sorvall RC5C, 15 min at 9600 g) and resuspended in phosphate-saline buffer (PBS) x1. Cell lysis was performed by sonication (Branson Sonifier 250, 0.6Hz) in the presence of 0.5% β -mercaptoethanol in order to avoid protein oxidation. From this step on, all procedures were carried out using Ar (pure grade 5.6)-saturated buffers. After sonication, cellular debris were pelleted by centrifugation (20 min at 20000 g) and the GST-TpMT1 fusion proteins isolated from the supernatant by Glutathione-Sepharose 4B (Amersham Pharmacia) affinity chromatography. Metal-TpMT1 complexes were excised from the fusion constructs by thrombin cleavage and batch affinity chromatography. Several concentration rounds were performed by Centriprep Microcon 3 (Amicon), and the metal complexes were finally purified through FPLC in a Superdex75 column (Pharmacia) equilibrated with 50 mM Tris-HCl, pH 7.0. Selected fractions were kept at -80 °C until further use.

Analysis and characterization of the recombinant metal-TpMT1 complexes

For the analysis of all metal.TpMT1 complexes, the S, Zn, Cd, and Cu content was analyzed by means of Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectroscopy (ICP-AES) measurements. A Polyscan 61E (Thermo Jarrell Ash) spectrometer was used, measuring S at 182.040 nm, Zn at 213.856 nm, Cd at 228.802 and Cu at 324.803 nm. Samples were prepared following the method described by Bongers *et al.* (1988) and referred to as 'standard ICP data' throughout the paper. Alternatively the samples were incubated in 1M HCl at 65 °C for 5 min prior to ICP measurements in order to eliminate the acid-labile sulfide ligands putatively present, as otherwise described by Capdevila *et al.* (2005), yielding the so called "acid-ICP" results. MT concentration in the recombinant preparations was calculated from the acid-ICP S measurements, assuming that all the sulfur atoms in the samples contributed by the tpMT1 peptide, that is, 32 S atoms per mol of recombinant tpMT1 (1 Met and 31 Cys residues).

ESI-MS (ElectroSpray Ionization Mass Spectrometry) and TOF ESI-MS (Time-of-Flight ElectroSpray Ionization Mass Spectrometry)

ESI-MS was performed on a Fisons Platform II instrument (VG Biotech) controlled by the MassLynx Software and calibrated with horse heart myoglobin (0.1 mg/ml). 20 μ l of the sample were injected through a PEEK column (1m x 0.007 inch i.d.) at 20 μ l/min at the following conditions: source temperature: 120 °C; capillary-counter-electrode voltage, 3.5 kV; lens-counter-electrode voltage, 1.5 kV; cone potential, 60 V. A m/z range from 750 to 1950 was scanned at 2 s/scan with an interscan delay of 0.2 s. The liquid carrier was a 20:80 mixture of acetonitrile and 5 mM ammonium acetate, pH 7. For apo-form analysis, the metallopeptides were demetalated by acidification with HCl at pH 2.5 and mass spectrometry measures were carried out as explained for the holo-forms, except that the liquid carrier was a 5:95 mixture of methanol and ammonium/formate ammonia at pH 2.5.

ESI-TOF analysis of the metallopeptides was performed on a Q-TOF Ultima Micromass Instrument, controlled by the MassLynx Software and calibrated with NaI (0.2 g of NaI dissolved in 100 ml of a 50:50 H_2O :isopropanol mixture). 5 μ l of the sample were injected at 40 μ l/min at the following conditions: source temperature, 150 °C; desolvation temperature, 250 °C; capillary-counter-electrode voltage, 3.0 kV; cone potential, 80 V. Spectra were collected throughout an m/z range from 950 to 2150 at a 2 s/scan rate with an interscan delay of 0.1 s. The liquid carrier was a 10:90 mixture of acetonitrile and 5 mM ammonium acetate, pH 7. For apo-form analysis, the samples were demetalated by acidification with HCl at pH 1.5 and mass spectrometry measures were carried out as explained for the holo-forms, except that the liquid

carrier was a 10:90 mixture of methanol and ammonium/formate ammonia at pH 1.5. In all cases, molecular masses were calculated according to the method reported in Fabris *et al.*, 1996.

CD and UV-vis Spectroscopies

A Jasco spectropolarimeter (Model J-715) interfaced to a computer (J700 software) was used for circular dichroism (CD) measurements. A Peltier PTC-351S maintained the temperature constant at 25 °C. Electronic absorption measurements were performed on an HP-8453 Diode array UV-visible spectrophotometer. All spectra were recorded with 1 cm capped quartz cuvettes, corrected for the dilution effects and processed using the program GRAMS 32.

GC-FPD (Flame Photometric Detection Gas Chromatography)

The sulfide content of the metal-tpMT1 aggregates was measured by-GC-FPD as described in Capdevila *et al.* (2005).

In vitro metal-binding studies of tpMT1

Titration of Zn-tpMT1 with Cd(II) and Cu(I) at pH 7 were carried out following the procedures described elsewhere (Bofill *et al.*, 1999; Capdevila *et al.*, 1997), and followed by UV-Vis and CD spectroscopies. All assays were performed under Ar atmosphere and the pH for all experiments remained constant throughout, without the addition of any extra buffers.

RESULTS

Expression of tpMT1 in Zn and Cd-enriched media and in vitro Zn/Cd replacement

Recombinant synthesis of tpMT1 in Zn-containing media was performed six times with very reproducible results. The purity of the polypeptidic chain was confirmed by its ESI-MS measurements at pH 3 (Fig. 2), which yields a single species with the expected molecular mass (11239.8 D).

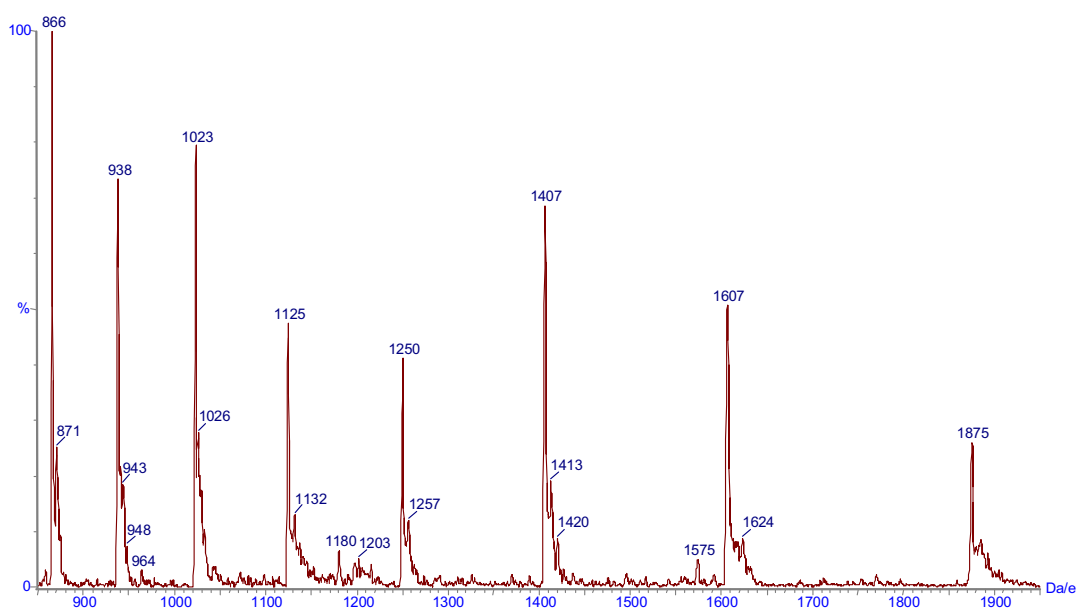


Fig. 2- ESI-MS spectrum corresponding to the apo form of tpMT1 obtained at pH 3.

Acidic ICP-AES measurements showed the presence of an average 10.4 Zn atoms/MT, whereas GC-FPD indicated the presence of 0.89 sulfide ions/MT. These data have been confirmed by TOF-ESI-MS analyses at pH 7, that show the presence of a major Zn₁₁-tpMT1

species in solution, together with the presence of several minor species, some of them containing 1 S^{2-} (Fig. 3, Table 2). CD spectrum shows the conventional Zn-thiolate CD spectrum, typical of most MT (Fig. 4A, line 0).

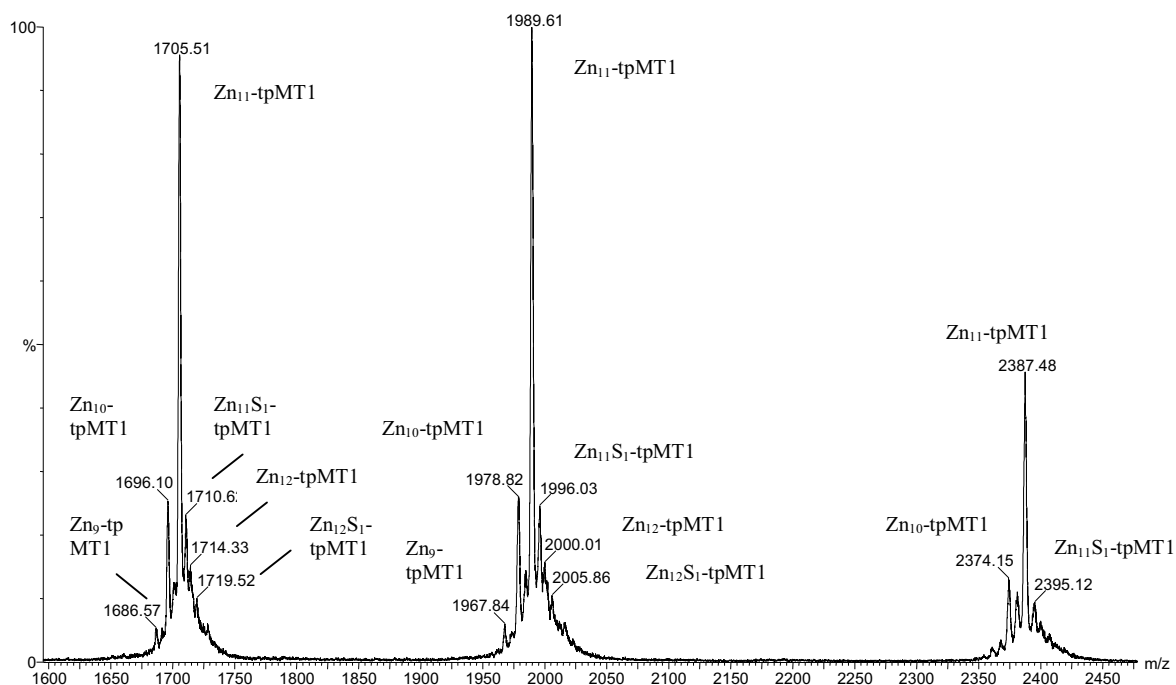


Fig. 3- TOF-ESI-MS spectrum corresponding to the *in vivo*-conformed Zn-tpMT1 species at pH 7.

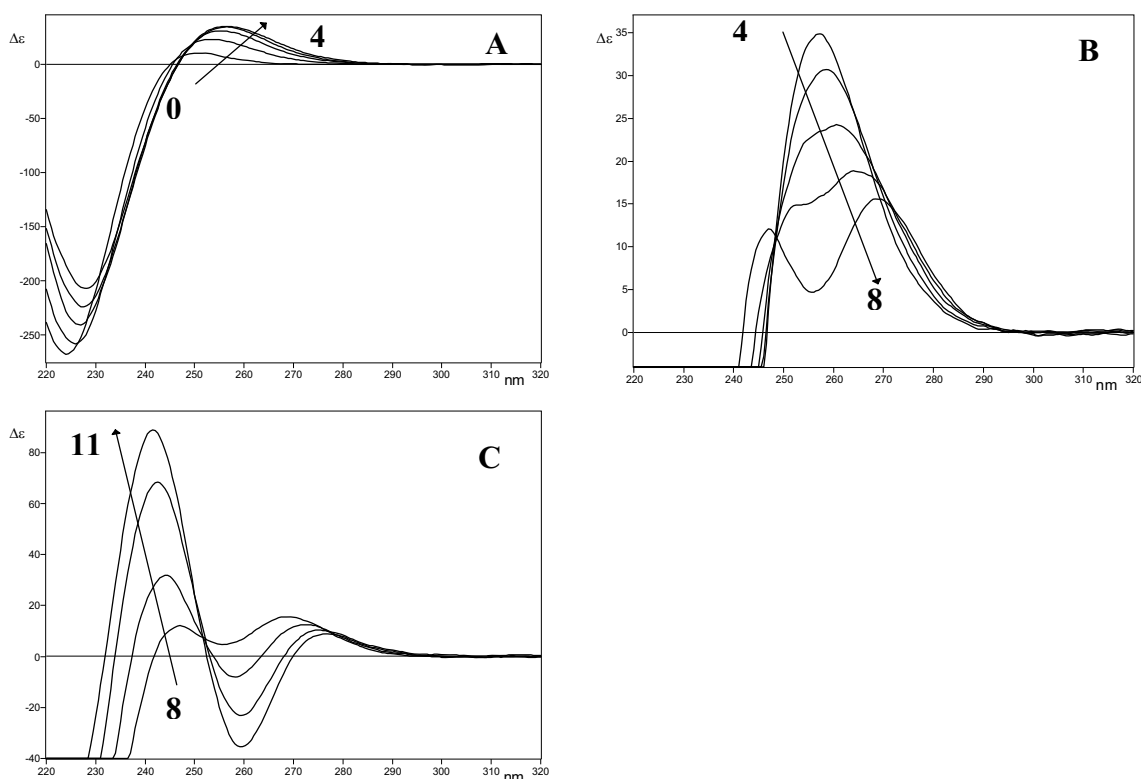


Fig. 4- CD spectra obtained during the titration of Zn₁₁-tpMT1 with Cd(II) at pH 7. (A) from 0 to 4 Cd(II) equivalents, (B) from 4 to 8 Cd(II) equivalents and (C) from 8 to 11 Cd(II) equivalents.

	Metal content per MT molecule (ICP-AES)	Metal content per MT molecule (acid ICP-AES) ^b	Sulfide content per MT molecule	Species detected at pH 7 by ESI-TOF
Zn-tpMT1	9.7 Zn	10.4 Zn	0.89 S ²⁻	Zn ₁₁ -tpMT1 >> Zn ₁₀ -tpMT1, Zn ₁₁ S ₁ -tpMT1
Cd-tpMT1	7.8 Cd	11.7 Cd	4.0 S ²⁻	Cd ₁₁ -tpMT1 >> Cd ₁₁ S ₁ -tpMT1 > Cd ₁₀ S ₂ -tpMT1
Cu-tpMT1	9.8 Cu, 1.3 Zn	12.5 Cu, 1.2 Zn	0.4 S ²⁻	M ₉ -tpMT1 ≥ M ₁₀ -tpMT1 > M ₈ -tpMT1 > M ₁₁ -tpMT1 > M ₁₂ -tpMT1

Table 2.- Metal:MT content in standard conditions^a and after incubation in 1M HCl at 65 °C for 5 min,^b S²⁻:MT content and species detected by TOF-ESI-MS at pH 7 for *in vivo*-conformed tpMT1 in the presence of Zn(II), Cd(II) and Cu(I).

CD and UV-vis data collected during the Cd(II) titration of Zn₁₁-tpMT1 show an isomorphous substitution of Zn(II) by Cd(II) until 4 equivalents added, followed by an inversion of chirality of the protein until 11 equivalents added (Fig. 4). After this point no further Cd(II) binding takes place (data not shown). TOF-ESI-MS measurements carried out at several stages of the titration showed the presence of a predominant Cd_xZn_{11-x}-tpMT1 species after *x* Cd(II) equivalents added (*x*=1-11), together with other minor Cd, Zn species with a total metal content (Zn + Cd) of 11. Also, some minor forms were detected with the presence of 1 sulfide atom.

TpMT1 has been synthesized in Cd-containing media in duplicate, with very similar results: acid ICP-AES measurements have shown the presence of an average 11.7 Cd atoms/MT and the complete absence of Zn(II) ions, and GC-FPD indicated the presence of 4.02 sulfide ions/protein. These data have been complemented by TOF-ESI-MS analyses at pH 7, which showed the presence of a predominant Cd₁₁-tpMT1 species in solution together with the presence of minor species containing 1 or 2 sulfide atoms (Fig. 5, Table 2). Its CD spectrum shows a characteristic *type C* fingerprint (Capdevila *et al.*, 1997) (Fig. 6), which further confirms the presence of inorganic sulfide coordinated into the protein.

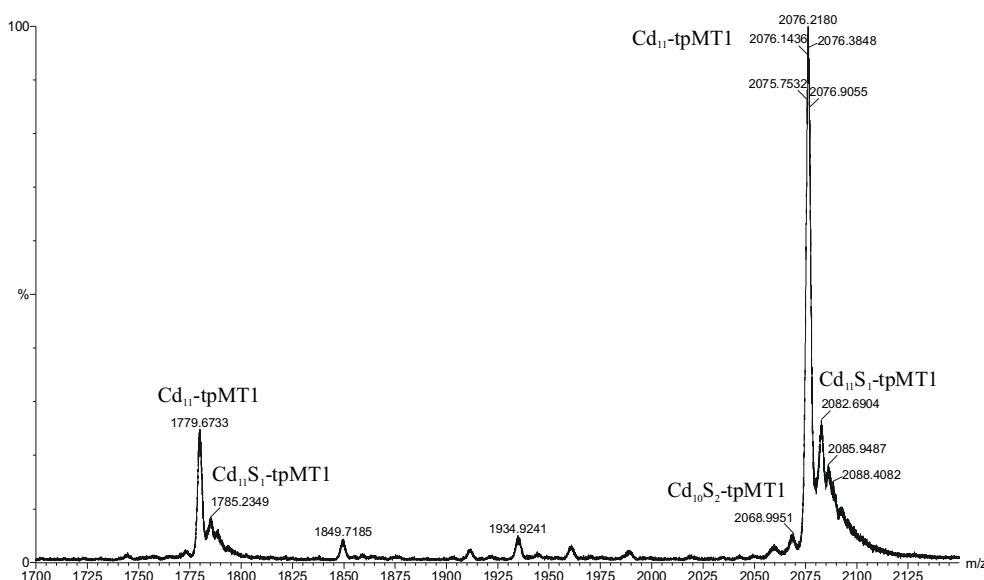


Fig. 5.- TOF-ESI-MS spectrum corresponding to the *in vivo*-conformed Cd-tpMT1 species at pH 7.

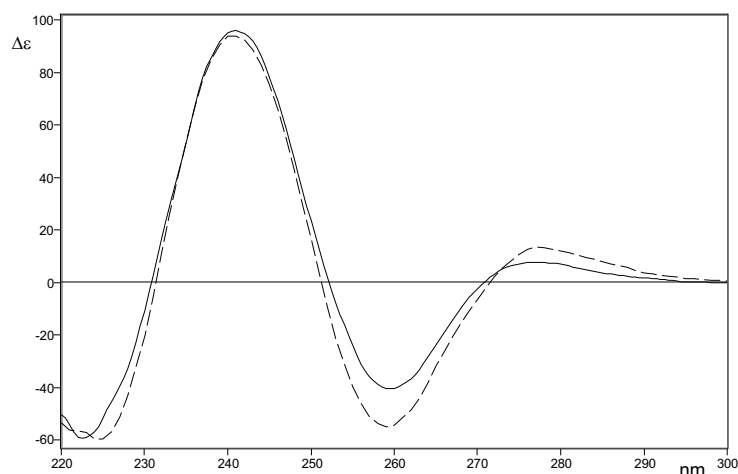


Fig. 6. CD spectra of the Cd₁₁-tpMT1 species obtained both under *in vitro* (solid line) and *in vivo* (dashed line) conditions.

The CD and TOF-ESI-MS fingerprints at the final stage of the titration, after 11 Cd(II) equivalents added, fully coincide with those of the *in vivo*-synthesized Cd-tpMT1 species (Fig 6).

Expression of tpMT1 in Cu-enriched media and in vitro Zn/Cu replacement

Recombinant synthesis of tpMT1 in Cu-containing media has been performed four times and the results show a high variability. However, in all cases mixed Cu,Zn-MT species were obtained. Acidic ICP-AES measurements showed the presence of an average of 12.5 Cu and 1.2 Zn per MT. On the other hand, GC-FPD showed the presence of 0.4 sulfide ions/MT. These *in vivo*-conformed species have also been analyzed by TOF-ESI-MS at pH 7. In all cases a complex mixture of species has been detected, ranging from M₈-tpMT1 to M₂₀-tpMT1, where M=Zn or Cu (Fig. 9, Table 2). Moreover, the presence of sulfide ions cannot be ruled out according to TOF-ESI-MS data.

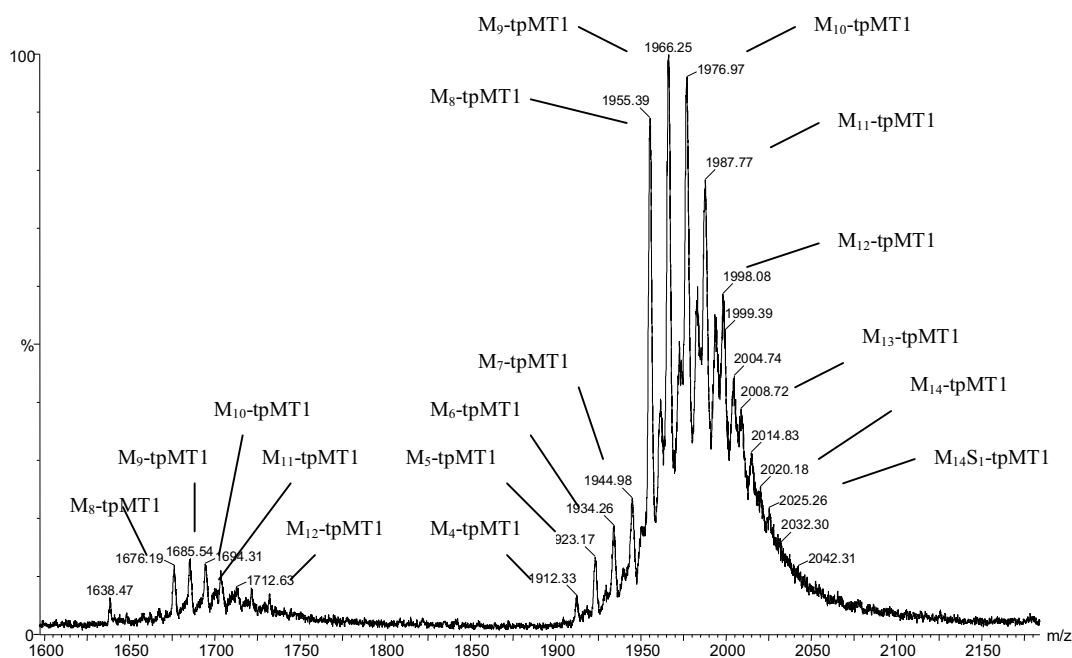


Fig. 9.- TOF-ESI-MS spectrum corresponding to the *in vivo*-conformed Cu-tpMT1 species at pH 7.

In vitro Cu(I) binding to Zn-tpMT1 did not introduce significant changes in the CD spectra and the maximum chirality was reached after 18 Cu(I) equivalents added (Fig. 10). At this point, the CD fingerprint closely resembled that of *in vivo*-synthesized Cu-tpMT1 (Fig. 11). On the other hand, TOF-ESI-MS analysis at this stage showed the presence of 15 different species, ranging from M₇-tpMT1 to M₂₁-tpMT1, where M=Zn or Cu (data not shown). Moreover, the presence of sulfide ions cannot be ruled out (see Discussion). CD and TOF-ESI-MS data did not change significantly after further addition of Cu(I) equivalents, even at a stoichiometric ratio of 30 Cu(I) per MT (data not shown).

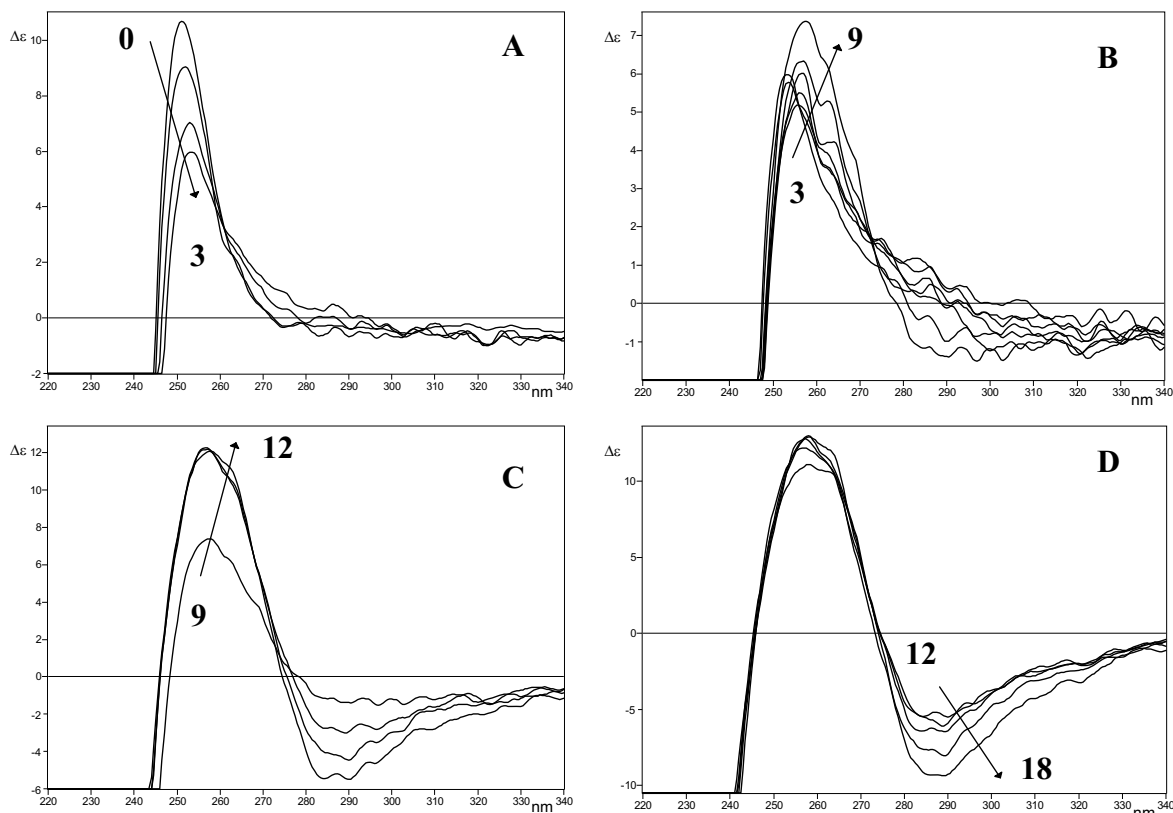


Fig. 10.- CD spectra obtained during the titration of Zn₁₁-tpMT1 with Cu(I) at pH 7. (A) from 0 to 3 Cu(I) equivalents, (B) from 3 to 9 Cu(I) equivalents, (C) from 9 to 12 Cu(I) equivalents and (D) from 12 to 18 Cu(I) equivalents.

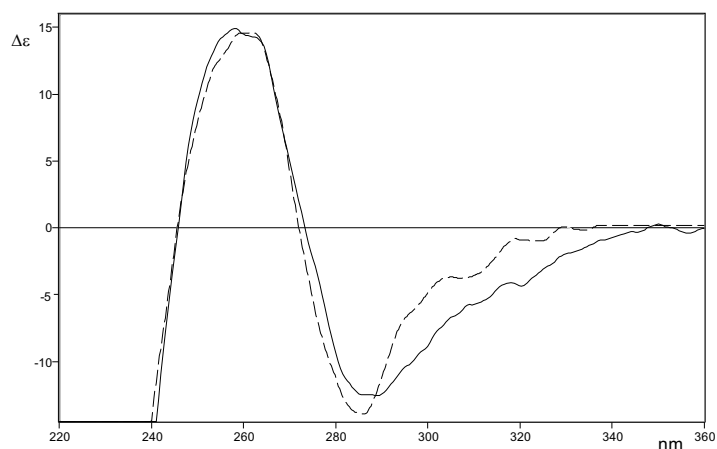


Fig. 11.- CD spectra of the Cu-tpMT1 species obtained both under *in vitro* (18 Cu(I) equivalents added, solid line) and *in vivo* (dashed line) conditions.

DISCUSSION

The *in vivo* Zn-, Cd- and Cu-tpMT1 aggregates contain sulfide anions as additional ligands. As described for other MTs (Capdevila *et al.*, 2005), the amount of detected S^{2-} per MT is higher for Cd-tpMT1 than for Zn-tpMT1 and Cu-tpMT1 aggregates. The CD fingerprint of Zn-tpMT1 (Fig. 4) and Cd-tpMT1 (Fig. 6) show the participation of sulfide anions at 250 nm and 280 nm respectively, being higher the intensity of the latter, in concordance with the lower sulfide content of the Zn-tpMT1 aggregates observed by GC-FPD (Table 2). The low chirality of the Cu-tpMT1 aggregates (Fig. 10 and Fig. 11) impairs the assignment of similar or equivalent metal-sulfide signals in these aggregates.

Interestingly, the low amount of sulfide ions present in Zn-tpMT1 species in comparison with the *in vivo*-conformed Cd-tpMT1 species (0.89 vs. 4.0 S^{2-} /MT respectively, Table 2) does not impair to reproduce the *in vivo* Cd-tpMT1 spectrum by *in vitro* Zn/Cd replacement (Fig. 6).

In the case of Cu binding experiments, *in vitro* Zn/Cu substitution also end up yielding CD fingerprints very similar to those obtained for the *in vivo* samples (Fig. 11), this suggesting the existence of similar aggregates in both cases. GC-FPD results clearly show the presence of low amounts of sulfide ions in the *in vivo* Cu-tpMT1, and TOF ESI-MS results are indicative of the presence of minor aggregates including S^{2-} both under *in vivo* and *in vitro* conditions. In conclusion, this work describes for the first time recombinant copper-containing MT species which contains S^{2-} in their aggregates.

The content of Zn(II) and Cd(II) coordinated *in vivo* by tpMT1 is identical and fits a sensible number according to its Cys content. Certainly, the Cys:M(II) ratio of tpMT1 (31:11) closely resembles the 20:7 ratio observed for mammalian MTs, and is similar to that obtained for *T. thermophila* MTT1 by other authors (47:16) (Dondero *et al.*, 2004). This similarity between MTs from different phyla with different Cys content and arrangements suggests that the disposition in Cys triplets in tpMT1 does not lead to an additional chelating capacity towards divalent metal ions.

The results presented here differ from those obtained by *de novo* reconstitution experiments using tpMT1 and Cd(II) carried out by other authors (Piccinni *et al.*, 1994) that led to propose a Cd_{12} -tpMT1. In our study, all attempts to detect a Cd_{12} -tpMT1 species either under *in vivo* or *in vitro* conditions failed. It should be also added that in the purification of *Tetrahymena* MTs from Cd-induced organisms both Zn and Cd were detected (Piccinni *et al.*, 1987). However, in our case no traces of Zn have been observed in the aggregates obtained in the recombinant synthesis of tpMT1 in Cd-supplemented media.

According to all the *in vivo* and *in vitro* results obtained when considering the Cu(I) binding ability, it is reasonable to postulate that tpMT1 has a clear preference for divalent metal ions (Zn(II), Cd(II)) compared to monovalent metal ions (Cu(I)). This becomes evident after the analysis of the data obtained from the synthesis of tpMT1 in Cu-supplemented media, where Cu,Zn-mixed metal species are recovered with a low folding degree compared to the Cd-tpMT1 species. Additionally, it can be seen that the Cd-tpMT1 aggregates achieve higher folding degrees than the Zn-tpMT1 species. Therefore, the overall binding preferences of tpMT1 can be summarized as $Cd(II) > Zn(II) > Cu(I)$ and according to the classification proposed elsewhere (Valls *et al.*, 2001) tpMT1 should be classified as a Zn-thionein. These preferences are also consistent with the induction patterns of tpMT1 and the postulated role of tpMT1 in Cd-detoxification. It is worth noting that, the absence of Cys triplets in the *Tetrahymena* MTs induced by Cu (MT2 and MTT2) and the above mentioned results suggest that Cu binding in *Tetrahymena* MTs could be impaired precisely by the presence of the four Cys triplets.

The differences in the response to metals in different *Tetrahymena* MT isoforms suggest a specialized involvement in metal homeostasis, as gene regulation data from several authors indicate that tpMT1 would be specific for Cd and tpMT2 would be specific for Cu (Santovito *et al.*, 2001; Boldrin *et al.*, 2002). The Cd detoxification mechanism in Protozoa include the synthesis of cytoplasmatic granules which are supposed to contain Cd and MT (Martin-Gonzalez *et al.*, 2006). The formation of intracellular Cd,S-rich granules as a Cd detoxification system have been observed in many Metazoan and Plant organisms and attributed to the participation of phytochelatins (PC) or MT (Sturzenbaum, *et al.*, 1998; Marigomez *et al.*, 2002; Soto *et al.*, 2002; Carrier, *et al.*, 2003; Spurgeon *et al.*, 2004) and often related to lysosomes. But although the presence of sulfide ligands and PCs have been repeatedly proved in this type of aggregates, and a PC synthase gene has already been described in *T.termophila* (Clemens, 2006), there are few data to support the participation of MTs in this kind of metal accumulations (George, 1983).

TpMT1 has structural features (presence of Cys and sulfide) similar to those observed for PCs, thus becoming a good candidate for the formation of metal granules. Moreover, tpMT1 levels increase after exposure to Cd concomitantly with the formation of electronegative granules in the cytoplasm. Also, the aggregation of tpMT1 in tetrameric aggregates has been proposed by other authors (Piccinni *et al.*, 1987). However, ESI-MS analysis of our samples did not reveal any polymeric species, although this technique has been shown to be suitable to detect such complexes (Domenech *et al.*, 2006). From our data, it can be concluded that tpMT1 is a good Cd chelator and does not form polymers by itself. These properties are more compatible with a "Cd solubilization" role than a "Cd-precipitation" role. According to this, the *Tetrahymena* genus, the richest in MT isoforms compared to other protozoan genus, shows a delay in including Cd in the particulate fraction in response to Cd exposure and, contrarily, exhibits a tendency to maintain the metals in the solubilized fraction (Piccinni, 1996). These data support that MT specialization in *Tetrahymena* has lead to the predominance of the Cd solubilization strategy during the detoxification processes.

On the other hand, the presence of two putative phosphorylation sites and the hints of post-translational modifications (Piccinni *et al.*, 1994) and post-translational regulation in *Tetrahymena* MTs (Boldrin *et al.*, 2003) suggests that tpMT1 could acquire novel properties under stress conditions, leading to the formation of metallic granules. Moreover, even though the induction patterns suggest a participation of MTs in Cd detoxification, the MT diversification does not seem to generate high detoxification capacities, as *T. termophila*, the *Tetrahymena* specie with the highest number of MT forms, displays alterations in its growth rate at Cd concentrations that do not affects *T.pyriformis* and *T.pigmentosa* (Piccinni, 1996), both with a lower number of isoforms.

From our results it can be concluded that tpMT1 is not a suitable Cu-binding MT. Up to now only partial data have been reported for the Cu-binding abilities of *T.pigmentosa* MT2 (7 Cu(I) atoms per MT) (Santovito *et al.*, 2001), but the low stoichiometry obtained suggests that there may have been a loss of Cu(I) ions during the purification process of the corresponding aggregates. Concerning *Tetrahymena* MT1 behavior, metal inducibility patterns suggest that tpMT1 does not play a role in Cu detoxification (Santovito *et al.*, 2001; Boldrin *et al.*, 2002), which is in concordance with the results here included.

CONCLUSIONS

The presence of Cys triplets in *Tetrahymena* tpMT1 does not confer it a different chelating capacity in front of divalent metal ions from what is observed in MTs without Cys triplets. The absence of such triplets in the Cu specific *Tetrahymena* MT isoforms suggests that these Cys arrangement could be related to a metal-binding behavior optimized for divalent metals, in

contrast with data published by other authors concerning the expression patterns of MTs of other phyla (*Callinectes sapidus* MT, Syring, *et al.*, 2000).

Tetrahymena tpMT1 is a Zn-thionein and has a good capacity to form well-structured Cd aggregates. The presence of sulfide ions in these aggregates and their good folding suggests the participation of tpMT1 in the granules observed in these organisms as a response to Cd intoxication, with similar structures to those formed by phytochelatins in other organisms. The *in vivo* Cd- and Zn,Cu-tpMT1 species can be reproduced *in vitro* by Zn/Cd and Zn/Cu replacement processes respectively. Sulfide anions are present in all the tpMT1 Zn-, Cd- and Cu-containing aggregates. Although the presence of S²⁻ in Zn and Cd MT seems to be a general rule amongst many living organisms (Capdevila *et al.*, 2005), the presence of sulfide ions should not be discarded in the presence of Cu(I). In this paper we have shown that Cu-tpMT1 does in fact contain sulfide ligands when synthesized *in vivo*. To our knowledge this is the first time in which such phenomenon is described for any MT.

REFERENCES

- Binz, P. A., Kägi, J.H.R. (2001). <http://www.biochem.unizh.ch/mtpage/MT.html>.
- Bofill, R., Palacios, O., Capdevila, M., Cols, N., Gonzalez-Duarte, R., Atrian, S. & Gonzalez-Duarte, P. (1999). A new insight into the Ag⁺ and Cu⁺ binding sites in the metallothionein beta domain. *J Inorg Biochem* 73(1-2), 57-64.
- Boldrin, F., Santovito, G., Irato, P. & Piccinni, E. (2002). Metal interaction and regulation of *Tetrahymena pigmentosa* metallothionein genes. *Protist* 153(3), 283-91.
- Boldrin, F., Santovito, G., Negrisol, E. & Piccinni, E. (2003). Cloning and sequencing of four new metallothionein genes from *Tetrahymena thermophila* and *T. pigmentosa*: evolutionary relationships in *Tetrahymena* MT family. *Protist* 154(3-4), 431-42.
- Boldrin, F., Santovito, G. and Piccinni, E. (2003). Unpublished sequence, GenBank accession number AY204351.1.
- Bongers, J., Walton, C. D., Richardson, D. E. & Bell, J. U. (1988). Micromolar protein concentrations and metalloprotein stoichiometries obtained by inductively coupled plasma atomic emission spectrometric determination of sulfur. *Anal Chem* 60(24), 2683-6.
- Capdevila, M., Cols, N., Romero-Isart, N., Gonzalez-Duarte, R., Atrian, S. & Gonzalez-Duarte, P. (1997). Recombinant synthesis of mouse Zn₃-beta and Zn₄-alpha metallothionein 1 domains and characterization of their cadmium(II) binding capacity. *Cell Mol Life Sci* 53(8), 681-8.
- Capdevila, M., Domenech, J., Pagani, A., Tio, L., Villarreal, L. & Atrian, S. (2005). Zn- and Cd-metallothionein recombinant species from the most diverse phyla may contain sulfide (S²⁻) ligands. *Angew Chem Int Ed Engl* 44(29), 4618-22.
- Carrier, P., Baryl, A. & Havaux, M. (2003). Cadmium distribution and microlocalization in oilseed rape (*Brassica napus*) after long-term growth on cadmium-contaminated soil. *Planta* 216(6), 939-50.
- Clemens, S. (2006). Evolution and function of phytochelatin synthases. *J Plant Physiol* 163(3), 319-32.
- Díaz, S., Rico, L., Benítez, L., Martín-González, A., Hamilton, E. P., Orias, E. & Gutierrez, J. C. (2003). Unpublished sequence. GenBank accession number AY405525.
- Domenech, J., Mir, G., Huguet, G., Capdevila, M., Molinas, M. & Atrian, S. (2006). Plant metallothionein domains: functional insight into physiological metal binding and protein folding. *Biochimie* 88(6), 583-93.
- Dondero, F., Cavaletto, M., Ghezzi, A. R., La Terza, A., Banni, M. & Viarengo, A. (2004). Biochemical characterization and quantitative gene expression analysis of the multi-stress inducible metallothionein from *Tetrahymena thermophila*. *Protist* 155(2), 157-68.
- Fabris, D., Zaia, J., Hathout, Y., Fenselau, C. (1996). Retention of thiol protons in two classes of protein zinc coordination centers. *J. Am. Chem. Soc.* 118, 12242-3.
- Fu, C. & Miao, W. (2006). Cloning and Characterization of a New Multi-Stress Inducible Metallothionein Gene in *Tetrahymena pyriformis*. *Protist* 157(2), 193-203.
- George, S. G. (1983). Heavy metal detoxication in the mussel *Mytilus edulis*-composition of Cd-containing kidney granules (tertiary lysosomes). *Comp Biochem Physiol C* 76(1), 53-7.

- Kägi, J. & Kojima, Y. (1987). Metallothionein II: Proceedings of the "Second international meeting on metallothionein and other low molecular weight metal-binding proteins". Birkhäuser, Basel.
- Kägi, J. H. R. (1993). Evolution, structure and chemical activity of class I metallothioneins: An overview. In Suzuki KT, I.N.a.K.M. (Ed.) Metallothionein III, Biological Roles and Implications. pp. 29-55. Birkhauser Verlag, Basel.
- Marigomez, I., Soto, M., Cajaraville, M. P., Angulo, E. & Giamberini, L. (2002). Cellular and subcellular distribution of metals in molluscs. *Microsc Res Tech* 56(5), 358-92.
- Martin-Gonzalez, A., Diaz, S., Borniquel, S., Gallego, A. & Gutierrez, J. C. (2006). Cytotoxicity and bioaccumulation of heavy metals by ciliated protozoa isolated from urban wastewater treatment plants. *Res Microbiol* 157(2), 108-18.
- Piccinni, E., Albergoni, V. (1996). Cadmium detoxification in Protists. *Comp.Biochem.Physiol.C* 113(2), 141-7.
- Piccinni, E., Bertaggia, D., Santovito, G., Miceli, C. & Kraev, A. (1999). Cadmium metallothionein gene of *Tetrahymena pyriformis*. *Gene* 234(1), 51-9.
- Piccinni, E., Irato, P., Coppellotti, O. & Guidolin, L. (1987). Biochemical and ultrastructural data on *Tetrahymena pyriformis* treated with copper and cadmium. *J Cell Sci* 88 (Pt 3), 283-93.
- Piccinni, E., Staudenmann, W., Albergoni, V., De Gabrieli, R. & James, P. (1994). Purification and primary structure of metallothioneins induced by cadmium in the protists *Tetrahymena pigmentosa* and *Tetrahymena pyriformis*. *Eur J Biochem* 226(3), 853-9.
- Romero-Isart, N., Cols, N., Termansen, M. K., Gelpi, J. L., Gonzalez-Duarte, R., Atrian, S., Capdevila, M. & Gonzalez-Duarte, P. (1999). Replacement of terminal cysteine with histidine in the metallothionein alpha and beta domains maintains its binding capacity. *Eur J Biochem* 259(1-2), 519-27.
- Santovito, G., Formigiari, A., Boldrin, F., Irato, P. & Piccinni, E. (2005). Unpublished sequence, Access number AY884209.2.
- Santovito, G., Irato, P., Palermo, S., Boldrin, F., Sack, R., Hunziker, P. & Piccinni, E. L. (2001). Identification, cloning and characterisation of a novel copper-metallothionein in *Tetrahymena pigmentosa*. Sequencing of cDNA and expression. *Protist* 152(3), 219-29.
- Shang, Y., Song, X., Bowen, J., Corstanje, R., Gao, Y., Gaertig, J. & Gorovsky, M. A. (2002). A robust inducible-repressible promoter greatly facilitates gene knockouts, conditional expression, and overexpression of homologous and heterologous genes in *Tetrahymena thermophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(6), 3734-9.
- Soto, M., Zaldibar, B., Cancio, I., Taylor, M. G., Turner, M., Morgan, A. J. & Marigomez, I. (2002). Subcellular distribution of cadmium and its cellular ligands in mussel digestive gland cells as revealed by combined autometallography and X-ray microprobe analysis. *Histochem J* 34(6-7), 273-80.
- Spurgeon, D. J., Sturzenbaum, S. R., Svendsen, C., Hankard, P. K., Morgan, A. J., Weeks, J. M. & Kille, P. (2004). Toxicological, cellular and gene expression responses in earthworms exposed to copper and cadmium. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 138(1), 11-21.
- Sturzenbaum, S. R., Kille, P. & Morgan, A. J. (1998). The identification, cloning and characterization of earthworm metallothionein. *FEBS Lett* 431(3), 437-42.
- Syring, R. A., Hoexum Brouwer, T. & Brouwer, M. (2000). Cloning and sequencing of cDNAs encoding for a novel copper-specific metallothionein and two cadmium-inducible metallothioneins from the blue crab *Callinectes sapidus*. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 125(3), 325-32.
- Tourancheau, A. B., Tsao, N., Klobutcher, L. A., Pearlman, R. E. & Adoutte, A. (1995). Genetic code deviations in the ciliates: evidence for multiple and independent events. *Embo J* 14(13), 3262-7.
- Valls, M., Bofill, R., Gonzalez-Duarte, R., Gonzalez-Duarte, P., Capdevila, M. & Atrian, S. (2001). A new insight into metallothionein (MT) classification and evolution. The in vivo and in vitro metal binding features of *Homarus americanus* recombinant MT. *J Biol Chem* 276(35), 32835-43.

CAPÍTOL 3- LES MT DE PLANTA. CARACTERITZACIÓ FUNCIONAL I ESTRUCTURAL D'UNA MT DE *Quercus suber* (QsMT)



L'existència de les MT de planta va restar ignorada fins 30 anys després del descobriment de les MT d'animals, i per aquesta raó les MT vegetals són grans desconegudes tant des del punt de vista funcional com des del punt de vista estructural. Els diversos tipus de MT de planta establerts a partir de característiques de seqüència mostren també diferències importants pel que fa als patrons d'expressió dels seus gens. Tot sembla indicar que existeix una especificitat de funció significativa entre els diferents subtipus de MT de planta, però fins al moment no hi ha estudis que aprofundeixin en les bases d'aquesta observació.

El grup de recerca de la Facultat de Ciències de la Universitat de Girona dirigit per la Dra. Marissa Molinas aïllà el cDNA d'una MT de *Quercus suber* a partir d'una llibreria de cDNAs de fel·lema, un teixit vegetal multiestressat i senescent sotmès a un fort estrès oxidatiu. El cDNA aïllat codificava una MT (QsMT) de tipus 2, tipus que en la bibliografia es descriu com a MT implicades en l'homeòstasi del Cu i la senescència.

S'obrien, doncs, diverses preguntes respecte a aquesta MT: és capaç QsMT de jugar un paper en l'homeòstasi del Cu o la detoxificació del Cd? Està QsMT implicada d'alguna manera en l'estrès oxidatiu? Quines són les peculiaritats estructurals d'aquesta MT de tipus 2 i quina és la relació d'aquestes particularitats amb els papers funcionals que desenvolupa?

Per abordar aquestes qüestions, s'establí una col·laboració entre el grup de recerca dirigit per la Dra. Marissa Molinas i el grup de recerca en què s'ha realitzat aquesta tesi. Aquesta col·laboració ha generat els resultats que es presenten en els tres primers articles d'aquest capítol. La manca de dades a nivell estructural en les MT de planta motivà l'aprofundiment de l'estudi de QsMT mitjançant l'espectroscòpia Raman, raó per la qual l'autor d'aquesta tesi realitzà una estada de 3 mesos als laboratoris del Departament de Bioquímica "Giovanni Moruzzi" de la Universitat de Bologna (Itàlia) i el Consiglio Nazionale della Ricerca de Bologna, sota la direcció de la Dra. Anna Tinti, la Dra. Armida Torreggiani i el Prof. Concezio Fagnano. Aquesta col·laboració ha generat els resultats que es presenten en el darrer article d'aquest capítol.

Article 7- Mir G, Domenech J, Huguet G, Guo WJ, Goldsbrough P, Atrian S, Molinas M. A plant type 2 metallothionein (MT) from cork tissue responds to oxidative stress. **Journal of Experimental Botany** (2004), 55(408):2483-93

Presentació

En aquest article es descriu l'estructura primària i inclou una primera caracterització funcional de QsMT basada en tres punts principals: el seu patró d'expressió a *Quercus suber*, la seva capacitat detoxificadora de Cu en el llevat *S.cerevisiae* i les seves propietats coordinants davant el Zn, el Cu i el Cd.

Els dos primers punts han estat realitzats per Gisela Mir, del grup de recerca de la Dra. Marissa Molinas (UdG), en els laboratoris del seu grup i els laboratoris del Dr. Peter Goldsbrough (Purdue University, USA). Els estudis de les capacitats coordinants de QsMT han estat realitzats mitjançant la determinació de les capacitats quelatants dels agregats obtinguts per síntesi recombinant en medis enriquits amb Zn, Cd o Cu. L'obtenció del plasmidi d'expressió recombinant i una gran part de les síntesis dels agregats han estat duts a terme per Gisela Mir, en una estada al laboratori del Departament de Genètica de la Universitat de Barcelona.

Resum

En aquest article es descriu l'aïllament d'un gen codificant per una MT que s'expressa en cèl·lules del suro, i estaria associada a la suberització. El cDNA ha estat aïllat d'una llibreria de cDNA de fel·lema, i codifica per una MT (QsMT) de planta del tipus 2. QsMT ha estat expressada en *E.coli* en medis enriquits en Zn, Cu o Cd, i s'han determinat les característiques dels agregats metall-MT obtinguts en els tres casos. Els resultats recolzen la participació d'aquesta MT en el metabolisme del Cu, en coherència amb la capacitat que mostra QsMT de rescatar el fenotip de sensibilitat al Cu quan és expressada en cèl·lules de llevat deficientes en CUP1. Els estudis d'hibridació *in situ* demostren que l'RNA de QsMT s'acumula principalment en situacions d'estrès oxidatiu, ja sigui endògen (com el de les cèl·lules en suberificació), com exògen (en resposta a paraquat i aigua oxigenada).

L'ARTICLE ÉS INCLÒS A LA VERSIÓ IMPRESA DE LA TESI, PERÒ PER TAL DE RESPECTAR ELS DRETS DE L'EDITOR, NO S'HA INCLÒS EN LA VERSIÓ DE LA TESI DISPONIBLE EN XARXA. PER AIXÒ S'HA AFEGIT LA CITA DE L'ARTICLE PUBLICAT.

Article 8- Domenech J, Mir G, Huguet G, Capdevila M, Molinas M, Atrian S. Plant metallothionein domains: functional insight into physiological metal binding and protein folding. *Biochimie* (2006), 88(6):583-93

Presentació:

S'aborda en aquest article un estudi de la contribució dels diferents dominis de QsMT en la funcionalitat d'aquesta proteïna, pel que fa a la seva capacitat detoxificadora davant el Cu *in vivo* i les propietats coordinants davant el Zn i el Cu. La metodologia emprada s'ha basat en la construcció de formes mutants de QsMT per deleccions de dominis sencers, per a establir la contribució de cada domini en la funcionalitat de QsMT mitjançant la comparació amb la forma silvestre.

L'estudi de les capacitats detoxificadores de Cu *in vivo* ha estat dut a terme per Gisela Mir en el grup de recerca de la Dra. Marissa Molinas mitjançant assajos de complementació en cèl·lules de llevat *S.cerevisiae* defectives per la MT CUP1.

L'estudi de les capacitats coordinants i les propietats estructurals dels agregats obtinguts en síntesi heteròloga en medis enriquits en Zn i Cu ha estat realitzat com a part d'aquesta tesi. L'obtenció dels clons recombinants i gran part de les síntesis dels agregats metall-MT han estat duts a terme per Gisela Mir en el laboratori del grup de recerca en què s'ha realitzat aquesta tesi.

Resum:

Les MT de planta es diferencien de les MT animals en la seva peculiar estructura primària, constituïda per dos dominis rics en Cys separats per un *espaiador* sense Cys. No es tenen actualment dades del paper d'aquests dominis en l'estructura i la funcionalitat de la proteïna.

En aquest article estudiem la contribució de cadascun dels dominis de la MT de planta QsMT en la unió de Zn i Cu *in vivo* i la capacitat de conferir resistència a metalls a cèl·lules de llevat defectives en CUP1. Amb aquest objectiu, s'han obtingut tres pèptids recombinants que es corresponen, respectivament, als dominis cisteïnics N-terminal (N25) i C-terminal (C18) de QsMT, i una construcció en què l'espaiador ha estat substituït per 4 residus Gly (N25-C18). Els agregats metall-pèptid obtinguts de la síntesi *in vivo* en *E.coli* en medis enriquits en Zn i Cu han estat caracteritzats mitjançant tècniques espectroscòpiques (CD, UV-vis, ICP-AES) i espectromètriques (ESI-MS), i els resultats han estat comparats amb els obtinguts per a la QsMT silvestre. Els resultats indiquen que QsMT dona lloc a agregats homometal·lics de Zn o Cu amb una estructura de "pinça", en què els dos dominis rics en Cys interactuen per a donar lloc a un únic *cluster* metal·lic. Segons aquest model de plegament, el domini *espaiador* no intervé directament en la coordinació metal·lica, però participa en l'estructuració de Zn-QsMT i en les capacitats detoxificadores de Cu de QsMT en cèl·lules de llevat defectives per CUP1.

L'ARTICLE ÉS INCLÒS A LA VERSIÓ IMPRESA DE LA TESI, PERÒ PER TAL DE RESPECTAR ELS DRETS DE L'EDITOR, NO S'HA INCLÒS EN LA VERSIÓ DE LA TESI DISPONIBLE EN XARXA. PER AIXÒ S'HA AFEGIT LA CITA DE L'ARTICLE PUBLICAT.

Article 9- Domènech J, Orihuela R, mir G, Molinas M, Atrian S, Capdevila M. The Cd-binding abilities of recombinant *Quercus suber* metallothionein: bridging de gap between phytochelatin and metallothioneins. *J Biol Inorg Chem* (2007) 12(6):867-82

Presentació:

En aquest article, s'estudia el comportament coordinatiu de QsMT davant el Cd, seguint la metodologia d'estudi de l'aportació dels diferents dominis aplicada en l'article 8 d'aquest capítol. L'estudi de les capacitats detoxificadoras de Cd *in vivo* ha estat dut a terme per Gisela Mir en el grup de recerca de la Dra. Marissa Molinas mitjançant assajos de complementació en *S.cerevisiae* defectius en CUP1.

L'estudi de les capacitats coordinants i les propietats estructurals dels agregats obtinguts en síntesi heteròloga en medis enriquits en Zn o Cd ha estat realitzat com a part d'aquesta tesi.

Part de les síntesis heteròlogues dels agregats metall-MT han estat dutes a terme per Gisela Mir. Els agregats obtinguts *in vitro* han estat sotmesos a diversos tipus d'estudis espectroscòpics i espectromètrics per aprofundir en la seva estructura i propietats. Aquests han estat duts a terme principalment per Rubén Orihuela, del grup de recerca dirigit per la Dra. Mercè Capdevila a la Universitat Autònoma de Barcelona.

Resum:

S'aborda en aquest article un aprofundiment en la contribució dels diferents dominis de QsMT en la seva funcionalitat com a detoxificadora de Cd i les seves propietats coordinants davant el Zn i el Cd. La metodologia emprada ha estat l'estudi de formes mutants de QsMT per deleccions de dominis sencers descrites en l'article 8 d'aquesta tesi per establir la contribució de cada domini a la coordinació de Cd mitjançant la comparació amb la forma silvestre.

La síntesi *in vivo* dels agregats en medi ric en Cd resulta en agregats Cd₆-QsMT amb un contingut metàl·lic superior al dels agregats sintetitzats en medi ric en Zn (Zn₄-QsMT). Els nostres resultats Els agregats Cd-QsMT contenen ions sulfur que participen en la unió de metall. La comparació del comportament coordinatiu de les diferents formes mutants amb el de la forma silvestre ha permès fer una proposta sobre el model de plegament de QsMT amb el Cd, i sobre el paper de la His continguda en l'espaiador.

L'ARTICLE ÉS INCLÒS A LA VERSIÓ IMPRESA DE LA TESI, PERÒ PER TAL DE RESPECTAR ELS DRETS DE L'EDITOR, NO S'HA INCLÒS EN LA VERSIÓ DE LA TESI DISPONIBLE EN XARXA. PER AIXÒ S'HA AFEGIT LA CITA DE L'ARTICLE PUBLICAT.

Article 10- Domènech J, Tinti A, Capdevila M, Atrian S, Torreggiani A. Structural study of the zinc and cadmium complexes of a type 2 plant (Quercus suber) metallothionein: insights by vibrational spectroscopy. **Biopolymers** (2007) 86(3):240-8

Presentació

Aquest article exposa la caracterització estructural dels agregats Zn-QsMT i Cd-QsMT per mitjà d'espectroscòpia Raman i IR. Els agregats Zn i Cd-QsMT foren sintetitzats per síntesi recombinant a partir del clon recombinant descrit en l'article 7 d'aquesta tesi, i sotmesos a un tractament de diàlisi i liofilització adaptat per a aquestes mostres en els laboratoris del Departament de Bioquímica de la Universitat de Bologna (Institut *Giovanni Moruzzi*). El desenvolupament del protocol de preparació de les mostres i les primeres anàlisis es realitzaren sota la direcció de la Dra. Anna Tinti i el Dr. Concezio Fagnano. La interpretació dels espectres fou duta a terme per la Dra. Armida Torreggiani i la Dra. Anna Tinti.

Resum

L'estructura secundària i l'entorn de coordinació metàl·lica dels agregats Zn- i Cd-QsMT han estat estudiats mitjançant les espectroscòpies vibracionals FT-Raman i FT-IR. Cd-QsMT conté un 64% de *beta-sheets* i un 22% de *beta-turns*. Zn-QsMT conté un 61% de *beta-sheets* i un 24% de *beta-turns*. En ambdós casos, el *random coil* representa el 14% i el contingut d'estructures helicals és negligible. L'estudi de la regió de l'espectre Raman de 800 a 200 cm^{-1} mostra diferències importants entre els agregats de Zn i Cd, en referència a les geometries d'unió entre Cys i metalls i ions sulfur i metalls. La participació en la coordinació metàl·lica del residu His situat en l'espaiador sense Cys de QsMT ha estat demostrada per bandes Raman particulars en els agregats de Cd. Les dades es discuteixen en relació a resultats previs, per a suggerir un model de plegament per a les MT de planta.

L'ARTICLE ÉS INCLÒS A LA VERSIÓ IMPRESA DE LA TESI, PERÒ PER TAL DE RESPECTAR ELS DRETS DE L'EDITOR, NO S'HA INCLÒS EN LA VERSIÓ DE LA TESI DISPONIBLE EN XARXA. PER AIXÒ S'HA AFEGIT LA CITA DE L'ARTICLE PUBLICAT.

CAPÍTOL 4: NOVETATS ESTRUCTURALS EN LES MT

Article 11- Capdevila M, Domenech J, Pagani A, Tío L, Villarreal L, Atrian S. Zn- and Cd-metallothionein recombinant species from the most diverse phyla may contain sulfide (S²⁻) ligands. *Angew Chem Int Ed Engl.* (2005), 44(29):4618-22

Presentació

En el camp de les MT, la major part dels estudis han estat duts a terme amb MT de mamífer. A causa de les dificultats en obtenir mostres homogènies, la major part dels investigadors han optat per estudiar agregats obtinguts per reconstitució *in vitro*, o sigui, agregats metall-MT formats partint de la proteïna desnaturalitzada i posada en contacte amb ions metàl·lics, assumint que aquests agregats serien representatius dels que es constitueixen *in vivo*.

En el grup de recerca en què s'ha realitzat aquesta tesi s'usa rutinàriament un protocol de síntesi heteròloga de MT que permet l'obtenció d'agregats metall-MT formats en condicions fisiològiques, i, per tant, més significatius biològicament.

En l'estudi de diversos agregats metall-MT per part de diversos membres del nostre grup, s'obtingueren, utilitzant diferents tècniques, resultats aparentment incoherents. Absorbàncies espectrals particulars observades per DC suggeriren que podia haver-hi una participació d'ions sulfur (S²⁻) en els agregats metall-MT, un fenomen que ha estat descrit com a habitual i fisiològicament significat en les PC, però que mai havia estat analitzat per a les MT.

Resum:

En aquest article, es descriu la determinació i quantificació de la presència d'ions sulfur en els agregats metall-MT sintetitzats heteròlogament, per a MT de *fila* molt diversos, incloent el disseny d'un protocol de mesura del contingut de sulfurs per GC-FPD.

La síntesi dels agregats i el desenvolupament dels protocols de mesura del contingut de sulfurs en els agregats metall-MT és el resultat del treball conjunt en col·laboració amb Laura Tío i Ayelén Pagani, del mateix grup de recerca. La complementació d'algunes de les mesures amb altres dades espectroscòpiques i espectromètriques ha estat duta a terme pel grup de recerca de la Universitat Autònoma de Barcelona dirigit per la Dra. Mercè Capdevila.

L'ARTICLE ÉS INCLÒS A LA VERSIÓ IMPRESA DE LA TESI, PERÒ PER TAL DE RESPECTAR ELS DRETS DE L'EDITOR, NO S'HA INCLÒS EN LA VERSIÓ DE LA TESI DISPONIBLE EN XARXA. PER AIXÒ S'HA AFEGIT LA CITA DE L'ARTICLE PUBLICAT.

