

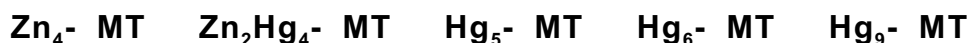
3. Comportament de Zn_4^- MT recombinant de ratolí enfront de diferents sals de Hg(II)

En aquest capítol es presenta i discuteix el comportament de Zn_4^- MT 1 recombinant de ratolí quan és valorada amb diferents sals de Hg(II) ($HgCl_2$ i $Hg(ClO_4)_2$), a diferents pH (7 i 3) i permetent diferents temps d'estabilització per a cada equivalent de Hg(II) afegit ($t=24h$ i $t=0h$).

3.1. Valoració de Zn_4^- MT recombinant de ratolí a pH 7

3.1.1. Valoració de Zn_4^- MT amb $HgCl_2$ a pH 7 a $t=24h$ (LÀMINA 1)

L'anàlisi detallada dels espectres de DC, absorció UV-Visible i de diferència d'aquests darrers permet postular que l'espècie Zn_4^- MT en ser valorada amb $HgCl_2$ a pH 7 a $t=24h$ evoluciona d'acord amb l'esquema de reacció següent:



Les dades i les evolucions espectrals que han permès postular l'existència d'aquestes espècies es discuteixen breument a continuació. Addicionalment, en aquesta valoració, el tractament amb la resina quelatant Chelex-100 juntament amb les tècniques d'ICP-AES i ICP-MS han permès determinar l'estequiometria de les espècies $Zn_2Hg_4^-$ MT, Hg_5^- MT i Hg_6^- MT.

$Zn_2Hg_4^-$ MT

DC: Els 4 primers eq de Hg(II) es coordinen progressivament a la proteïna per donar lloc, finalment, a una espècie amb una estructura altament quiral.

Per a aquesta espècie, les dades d'ICP determinen la presència de dos ions de Zn(II) coordinats a la proteïna, fet que s'observa també en el seu espectre de DC, on encara es detecta la presència de la banda situada a 244(+) nm que indica l'existència d'enllaços Zn(II)-S_{Cys}. Així doncs, s'observa que el desplaçament del Zn(II) pel Hg(II) no és isomòrfic.

UV: S'observa un augment de l'absorció en tot el rang de si bé es perd la seva linealitat amb l'addició del 4t eq (Figura 3.1.).

ED: La descomposició d'aquests espectres en corbes gaussianes indica la necessitat de considerar absorcions a properes a 230, 240, 260, 280, 300 i 320 nm. Així, en base a les dades bibliogràfiques comentades al

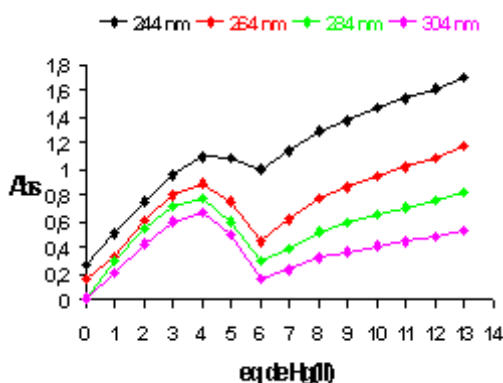


Figura 3.1. Representació gràfica de la variació de l'absorció a una determinada en funció del nombre d'equivalents de Hg(II) afegits al llarg de la valoració de Zn₄-MT amb HgCl₂ a pH 7 a t=24h.

Bloc I, no és possible distingir entre geometries de coordinació trigonal i tetraèdrica pels ions Hg(II) els quals es coordinen a S_{Cys} i altres lligands presents al medi on el més probable per afinitat i concentració és el Cl⁻. D'altra banda, la presència d'absorcions a superiors a 280 nm indica, com han demostrat estudis previs d'aquestes proteïnes amb Cd(II),¹⁶ que part dels S_{Cys} terminals esdevenen pontals ja que hi ha un corriment de les absorcions cap a menys energètiques.

Hg₅- MT

DC: Per a 5 eq de Hg(II) afegits s'obté un espectre indicatiu d'una espècie intermèdia detectable entre $Zn_2Hg_4^-$ MT i Hg_6^- MT. La desaparició de la banda situada a 244(+) nm indica, d'acord amb els resultats d'ICP-AES, que aquesta espècie ja no conté Zn(II) enllaçat a la proteïna.

UV: Aquest espectre també indica que aquesta espècie és un intermedi entre l'anterior i la següent. L'absorció en el rang de per sobre de 240 nm comença a disminuir.

ED: S'observa, per un costat, la pèrdua de les absorcions característiques de Hg(II) trigonal i/o tetraèdric i per una altra part, un increment en les contribucions al voltant de 230 nm. Tenint en compte que l'espectre a què dona lloc l'addició del 6è eq de Hg(II) correspon al mínim absolut d'aquestes contribucions, es proposa que en aquesta espècie coexisteix Hg(II) trigonal i/o tetraèdric i digonal.

Hg₆⁻ MT

DC: L'addició del 6è eq de Hg(II) dona lloc a l'espectre final de la tendència espectral observada des de l'espècie amb 4 eq de Hg(II).

UV: Aquest espectre també és el final de la tendència seguida des de 4 eq de Hg(II) afegits i s'arriba a un mínim d'absorció a per sobre de 240 nm (Figura 3.1.).

ED: S'arriba a una pèrdua màxima de les absorcions causades per Hg(II) trigonal i/o tetraèdric i només s'observa, com per a l'espècie anterior, absorcions positives corresponents a la presència de Hg(II) digonalment enllaçat a S_{Cys} .

Hg₉⁻ MT

DC: A partir del 6è eq, les addicions de Hg(II) provoquen un lleuger moviment de les bandes de l'espectre, cosa que indica que, de fet, l'addició de Hg(II) a l'espècie Hg_6^- MT només provoca petites variacions de la seva estructura. Per a 9 eq de Hg(II) afegits es pot establir un punt final de la variació esmentada per donar lloc, en addicionar més eq de Hg(II), a una pèrdua de l'estructuració assolida que queda reflectida en la disminució de les intensitats de les bandes de l'espectre de DC.

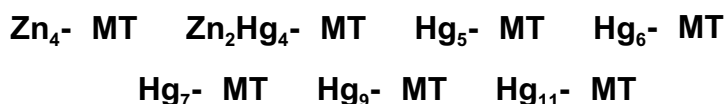
UV: Els espectres d'absorció d'aquesta darrera fase de la valoració mostren que les espècies formades continuen coordinant més eq de Hg(II) ja que l'absorció augmenta en tot el rang de de l'espectre (Figura 3.1.).

ED: La descomposició dels ED en corbes gaussianes permet observar que a partir del 7è eq afegit el Hg(II) presenta una coordinació trigonal de tipus MerR, si bé a mesura que s'addicionen més eq de Hg(II) aquestes contribucions disminueixen i n'apareixen a properes a 230 nm. En aquesta espècie, doncs, es postula Hg(II) amb entorns de coordinació mixtes trigonal i digonal.

3.1.2. Valoració de Zn_4^- MT amb $HgCl_2$ a pH 7 a t=0h (LÀMINA 2)

L'anàlisi de les dades espectroscòpiques enregistrades durant la valoració de Zn_4^- MT amb $HgCl_2$ a pH 7 i a t=0h permet veure que, a partir de la meitat de la valoració, l'estequiometria i l'estructura de les espècies

formades, així com el seu mecanisme de formació, difereixen de les dades corresponents a la valoració anàloga efectuada a $t=24h$. Així, es proposa que, en aquest cas, l'evolució de l'espècie inicial quan s'afegeix Hg(II) al medi segueix l'esquema de reacció següent:



A l'espècie $Zn_2Hg_4^-$ MT se li assignen 2 eq de Zn(II) coordinats a la proteïna per analogia amb la valoració anterior malgrat que en aquest cas no s'ha corroborat mitjançant les anàlisis d'ICP-MS i d'ICP-AES pertinents. Tot i així, si s'observa amb detall l'espectre de DC corresponent a aquesta espècie es detecta que la intensitat de la banda situada a 244(+)

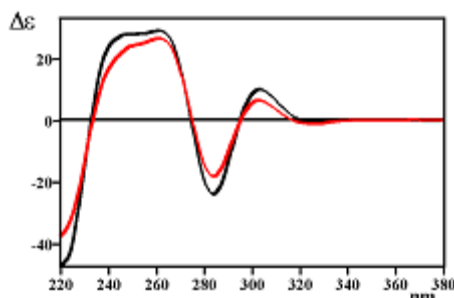


Figura 3.2. Espectres de DC de l'espècie $Zn_2Hg_4^-$ MT obtinguda afegint $HgCl_2$ a Zn_4^- MT a pH 7 a $t=24h$ i $t=0h$.

nm, assignada a les transicions S_{Cys} Zn(II), és inferior a la de l'espectre corresponent a la mateixa espècie obtinguda en la valoració a $t=24h$ (Figura 3.2.), i això apunta cap a una estequiometria amb un nombre d'ions Zn(II) possiblement inferior a 2.

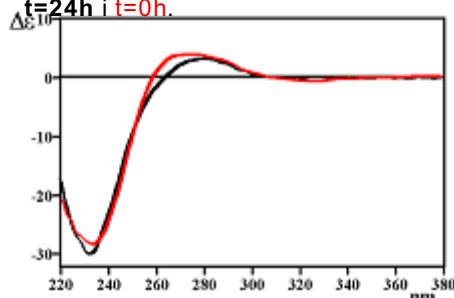


Figura 3.3. Espectres de DC de l'espècie Hg_6^- MT obtinguda afegint $HgCl_2$ a Zn_4^- MT a pH 7 a $t=24h$ i $t=0h$.

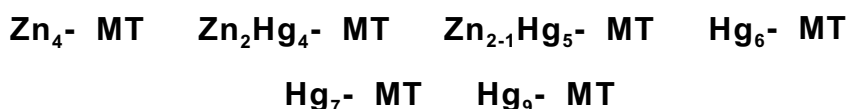
L'evolució espectral fins a la formació de Hg_6^- MT és essencialment la mateixa que la de la valoració efectuada a $t=24h$. Tot i així, Hg_6^- MT a $t=0h$ i $t=24h$ mostren estructures anàlogues però no idèntiques (Figura 3.3.). Els ED d'aquestes espècies mostren que el Hg(II) presenta els mateixos entorns de coordinació que

els agregats corresponents formats a $t=24h$. A partir d'aquest punt s'observa un comportament molt similar al que es veurà en la valoració de Zn_4^- MT a pH 3. Això podria fer pensar en un descens involuntari del pH, però s'ha comprovat que el pH al final de l'experiment continua essent 7. Cal remarcar, finalment, que Hg_{11}^- MT continua coordinant Hg(II) sense que s'alteri massa l'estructura assolida per aquesta espècie però disminueix el nombre de coordinació dels ions Hg(II) enllaçats a la proteïna, que acaben essent bàsicament digonals.

Cal destacar també, que tot i que no és massa evident en els espectres que es mostren, diverses repeticions de la valoració han permès observar un lleuger avançament d'aquesta respecte a la corresponent a $t=24h$ sobretot en les primeres addicions de Hg(II). És a dir, s'ha observat que és possible assolir la constitució de les espècies amb l'addició d'un nombre d'eq de Hg(II) inferior al que li correspon estequiomètricament de forma termodinàmica.

3.1.3. Valoració de Zn_4^- MT amb $Hg(ClO_4)_2$ a pH 7 a $t=24h$ (LÀMINA 3)

La comparació de les dades espectrals obtingudes al llarg de la valoració de Zn_4^- MT amb $Hg(ClO_4)_2$ a pH 7 i a $t=24h$ amb les corresponents a la mateixa valoració on l'agent valorant és $HgCl_2$ permet establir un seguit de diferències importants. L'evolució de Zn_4^- MT quan s'afegeix Hg(II) en forma de $Hg(ClO_4)_2$ al medi segueix l'esquema de reacció següent:



Per a la primera espècie postulada, $Zn_2Hg_4^-$ MT, s'assignen 2 eq de Zn(II) coordinats a la proteïna de la mateixa manera que s'ha fet en la valoració anterior, si bé en aquest cas sembla que, en base a la major intensitat de la banda de DC centrada a 244(+) nm, aquest nombre d'eq de Zn(II) pot ser superior a 2 (Figura 3.4.).

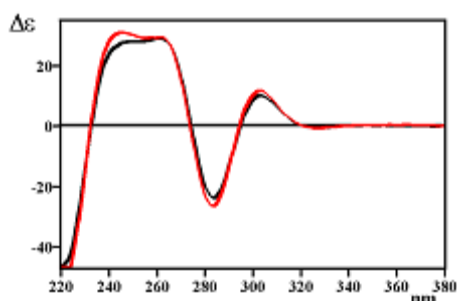


Figura 3.4. Espectres de DC de l'espècie $Zn_2Hg_4^-$ MT obtinguda afegint $HgCl_2$ o $Hg(ClO_4)_2$ a Zn_4^- MT a pH 7 i $t=24h$.

En canvi, l'espècie $Zn_{2-1}Hg_5^-$ MT comparada amb Hg_5^- MT corresponent a la valoració amb $HgCl_2$, presenta la banda assignada al Zn(II) coordinat a la proteïna en el seu espectre de DC (Figura 3.5.), si bé és menys intensa que en l'espècie anterior, $Zn_2Hg_4^-$ MT i per això es proposa la possible pèrdua

d'un dels ions de Zn(II). En la Figura 3.6. també pot observar-se que l'espècie següent, Hg_6^- MT, ja no presenta aquesta banda i, en conseqüència, no té Zn(II) coordinat. D'altra banda, s'aprecia que l'espècie Hg_5^- MT de la valoració amb $HgCl_2$ correspon a una fase intermitja entre $Zn_{2-1}Hg_5^-$ MT i Hg_6^- MT de la valoració amb $Hg(ClO_4)_2$ (Figura 3.5.). L'ED corresponent a l'addició del 5è eq de Hg(II) mostra una pèrdua de les

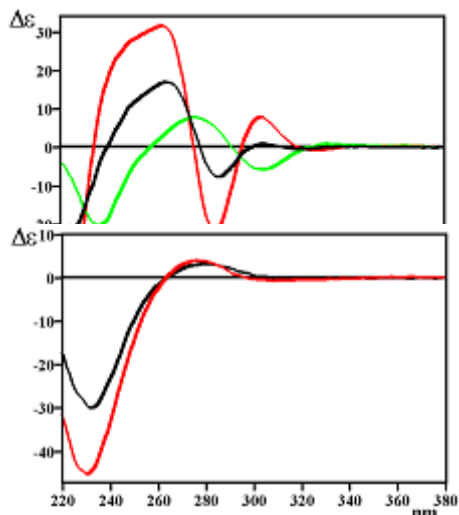
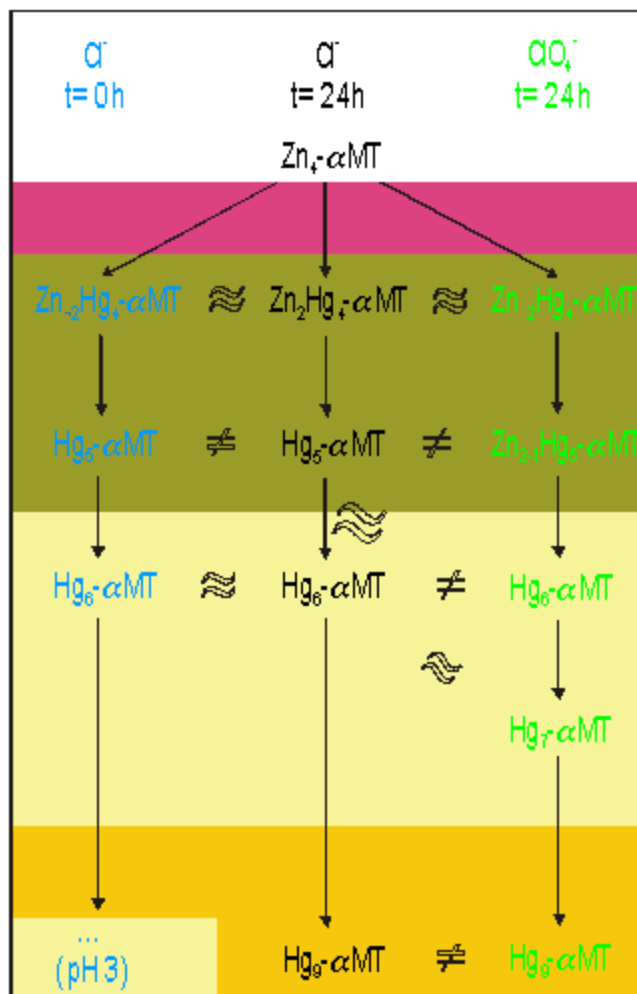


Figura 3.6. Espectres de DC de les espècies Hg_6^- MT i Hg_7^- MT obtingudes afegint $HgCl_2$ i $Hg(ClO_4)_2$, respectivament, a Zn_4^- MT a pH 7 a $t=24h$.

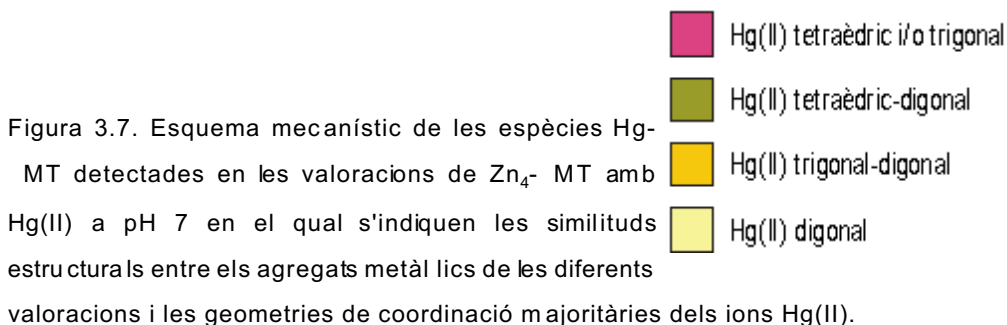
contribucions corresponents a Hg(II) trigonal i/o tetraèdric, amb la qual cosa es postula que tot i que encara resti algun ió Hg(II) amb aquest tipus de coordinació, també n'hi ha de digonalment coordinat. L'espècie següent, Hg₆⁻ MT, és, en aquest cas, un intermedi detectable en el pas cap a l'espècie Hg₇⁻ MT. Aquesta darrera espècie és la que correspondria, estructuralment i pel que fa a la geometria de coordinació dels ions Hg(II), a l'espècie Hg₆⁻ MT de la valoració amb HgCl₂ tot i que la comparació dels seus espectres de DC no mostra una superposició perfecta (Figura 3.6.). Cal destacar que els ED d'aquestes dues espècies indiquen que el Hg(II) presenta una geometria de coordinació digonal.

A partir de la formació de Hg₇⁻ MT, les espècies següents no tenen massa rellevància en el conjunt de la valoració ja que adopten estructures poc quirals, inclús inferiors a la de la darrera espècie formada en la valoració amb HgCl₂, Hg₉⁻ MT.



3.1.4. Conclusions per a la valoració de Zn_4^- -MT recombinant de ratolí a pH 7

L'estudi comparatiu de les valoracions de Zn_4^- -MT amb $Hg(II)$ a pH 7 descrites permet proposar l'esquema de reacció general següent i extreure les conclusions que es detallen a continuació.



Les tres valoracions segueixen mecanismes de reacció anàlegs amb l'excepció de la realitzada amb $HgCl_2$ a $t=0h$, la qual segueix, a partir de la formació de l'espècie Hg_6^- MT, un procés similar al que té lloc a pH 3.

La substitució del Zn(II) per Hg(II) és més ràpida en presència de Cl^- i sota control cinètic. D'altra banda, l'existència de l'espècie mixta $Zn_{2-1}Hg_5^-$ MT en la valoració efectuada amb $Hg(ClO_4)_2$ indica que la presència de ClO_4^- en el medi provoca la retenció del Zn(II) coordinat a la proteïna.

Per a la mateixa quantitat de Hg(II) afegit, a $t=0h$ es detecten espècies amb una estequiometria Hg: MT superior a la de les formades sota control termodinàmic. L'addició de 5 eq de Hg(II) a $t=0h$ provoca la formació d'una espècie, Hg_5^- MT estructuralment molt propera a

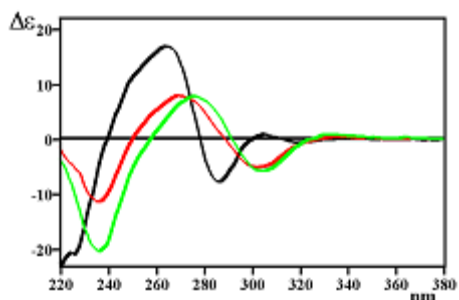


Figura 3.8. Espectres de DC de les espècies: Hg_5^- MT, obtinguda afegint $HgCl_2$ a Zn_4^- MT a pH 7 a $t=24h$ i $t=0h$, i Hg_5^- MT, obtinguda afegint-hi $Hg(ClO_4)_2$ a pH 7 i a $t=24h$.

l'espècie Hg_6^- MT que es forma amb $Hg(ClO_4)_2$ a $t=24h$ (Figura 3.8.). A més a més, aquesta espècie Hg_5^- MT presenta un perfil espectral de DC que mostra que la seva estructura correspon a una fase més avançada que la de l'espècie Hg_5^- MT assolida amb $HgCl_2$ a $t=24h$ (Figura 3.8.). Tot això indica que sota control cinètic s'estabilitzen, inclús en absència de la quantitat de Hg(II) necessària, les espècies que no requereixen Cl^- en la seva estructura.

Sota control termodinàmic s'arriba finalment a la formació de l'espècie Hg_9^- MT, l'estructura de la qual depèn de la presència de Cl^- o ClO_4^- en el medi.

Les espècies formades en les darreres etapes de les valoracions efectuades sota control termodinàmic presenten poca quiralitat, o el que és el mateix, baixa estructuració, però aquesta encara és inferior en absència de Cl^- al medi.

Les zones ombrejades de l'esquema indiquen l'entorn de coordinació majoritari del Hg(II) que presenten les diferents espècies proposades, l'ordre d'aparició del qual és tetraèdric, digonal i trigonal tot i que s'assoleixen espècies que contenen Hg(II) amb geometries de coordinació mixtes. Cal destacar que en les valoracions efectuades a $t=24h$ l'evolució de les geometries de coordinació del Hg(II) de les espècies proposades no és idèntica i per tant, cal deduir que molt probablement el Cl^- intervé activament completant l'entorn de coordinació del Hg(II) coordinat a la proteïna.

3.2. Valoració de Zn₄- MT recombinant de ratolí amb HgCl₂ a pH 3

3.2.1. Valoració de Zn₄- MT amb HgCl₂ a pH 3 a t=24h (LÀMINA 4)

L'anàlisi de les dades espectroscòpiques de DC, d'absorció UV-Visible i de diferència d'aquestes darreres permet postular que, quan es valora amb HgCl₂ a pH 3 i a t=24h, l'espècie Zn₄- MT (apo- MT a pH 3) segueix l'esquema de reacció següent:



Les dades i les evolucions espectrals que permeten postular l'existència d'aquestes espècies es discuteixen seguidament.

Hg₄- MT

DC: L'addició dels 4 primers eq de Hg(II) provoca el desenvolupament d'unes bandes que posen de manifest la baixa quiralitat de l'espècie.

UV: Hi ha un increment lineal de l'absorció en tot el rang de (Figura 3.9.).

ED: S'observa que els 4 eq de Hg(II) afegits provoquen les mateixes absorcions amb la mateixa intensitat. Es poden assignar absorcions a properes

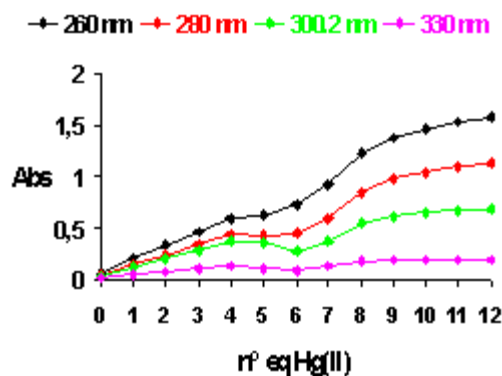


Figura 3.9. Representació gràfica de la variació de l'absorció a una determinada en funció del nombre d'equivalents de Hg(II) afegits al llarg de la valoració de Zn₄- MT amb HgCl₂ a pH 3 a t=24h.

a 230, 260, 280 i 300 nm les quals permeten proposar que els ions Hg(II) presenten entorns de coordinació trigonals i/o tetraèdrics. Pel fet de tractar-se dels primers eq de Hg(II) afegits, tenint en compte l'elevada disponibilitat dels S_{Cys} a pH àcid i considerant que els nombres de coordinació majors estan, a priori, més afavorits energèticament, es proposa que el Hg(II) adopta un entorn de coordinació preferentment tetraèdric amb S_{Cys} .

Hg₆- MT

DC: Per a 5 eq de Hg(II) afegits s'arriba a un espectre indicatiu d'un intermedi detectable en el pas cap a l'espècie següent, Hg₆- MT, la qual mostra un espectre individual amb una banda negativa centrada a 230 nm i una positiva molt ampla situada entre 260 i 315 nm.

UV: Tot i que per a 5 eq s'observa un petit increment de l'absorció per sobre de 260 nm, aquesta torna a augmentar en tot el rang de a partir del 6è eq de Hg(II) però amb un pendent diferent a l'observat fins a aquest punt de la valoració.

ED: Per a 5 eq de Hg(II) afegits s'observa la pèrdua dels cromòfors tetraèdrics de l'espècie anterior i la presència de la banda característica de Hg(II) digonal. L'addició del 6è eq de Hg(II) provoca increments de l'absorció però no en tot el rang de ni amb les mateixes contribucions gaussianes que l'addició següent, 7 eq de Hg(II), per a la qual el Hg(II) presenta ja una geometria de coordinació trigonal. Pels ions de Hg(II) d'aquesta espècie es proposen, doncs, entorns de coordinació mixtes digonals i trigonals de tipus MerR.

Hg₈- MT

DC: Aquesta espècie dóna lloc a un espectre de DC que pot considerar-

se com l'espectre final de l'evolució seguida des de l'espècie anterior, Hg₆- MT, i l'inicial del desenvolupament següent, fins a Hg_{11,...}- MT, el qual és isodicroic a 231, 245, 284 i 302 nm. Es tracta d'una espècie força quiral amb una empremta espectral que no varia massa malgrat l'addició dels eq de Hg(II) següents.

UV: L'absorció augmenta en tot el rang de si bé la representació gràfica de la seva variació indica que el pendent disminueix una mica a partir de l'addició d'aquest 8è eq de Hg(II) (Figura 3.9.).

ED: S'observa un espectre que mostra la participació de corbes gaussianes assignades a la presència de Hg(II) trigonal de tipus MerR però també de l'assignada a Hg(II) digonal. Es proposa, doncs, un entorn de coordinació mixte trigonal-digonal per al Hg(II) d'aquesta espècie.

Hg_{11,...}- MT

DC: Els espectres de DC d'aquesta darrera fase de la valoració no permeten precisar l'espècie final perquè l'evolució isodicroica iniciada amb el 8è eq afegit continua progressant a mesura que s'addiciona més Hg(II). És per aquest motiu que s'ha escrit l'estequiometria de l'espècie com a Hg_{11,...}- MT. No obstant això, es considera que la coordinació de més d'11 eq de Hg(II) té lloc d'una manera externa al cluster format, Hg₁₁- MT, ja que l'augment de la relació molar Hg(II): MT pràcticament no afecta la seva estructura.

UV: Aquests espectres mostren un augment de l'absorció en tot el rang de de l'espectre que indica que el Hg(II) es continua coordinant a la proteïna.

ED: S'observen increments de l'absorció a 230 nm la qual cosa permet proposar que el Hg(II) presenta una geometria de coordinació digonal. S'observa també que l'enllaç de Hg(II) a partir d'11 eq és un procés cooperatiu ja que tots els eq de Hg(II) adicionats provoquen les mateixes absorcions.

3.2.2. Valoració de Zn_4^- MT amb $HgCl_2$ a pH 3 a $t=0h$ (LÀMINA 5)

En general, l'evolució observada quan Zn_4^- MT (apo- MT a pH 3) és valorada amb $HgCl_2$ a pH 3 i a $t=0h$ és anàloga, i segueix el mateix esquema de reacció, a la de la valoració efectuada a $t=24h$. La diferència principal entre ambdues valoracions és que tot i que les espècies que es formen presenten estructures similars, però no idèntiques, el grau d'estructuració d'aquestes és molt menor en els agregats obtinguts a $t=0h$ (Figures 3.10., 3.11., 3.12. i 3.13.).

En aquesta valoració, la darrera etapa no és un procés cooperatiu, a diferència del de l'efectuada a $t=24h$, i el Hg(II) de la darrera espècie formada presenta entorns de coordinació mixtes trigonal-digonal.

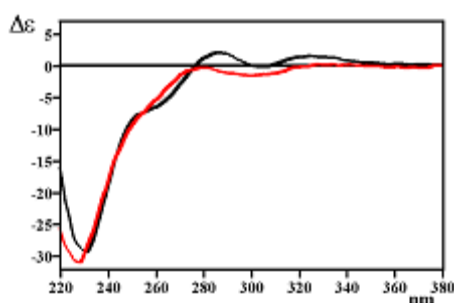


Figura 3.10. Espectres de DC de l'espècie Hg_4^- MT obtinguda afegint $HgCl_2$ a Zn_4^- MT a pH 3 a $t=24h$ i $t=0h$.

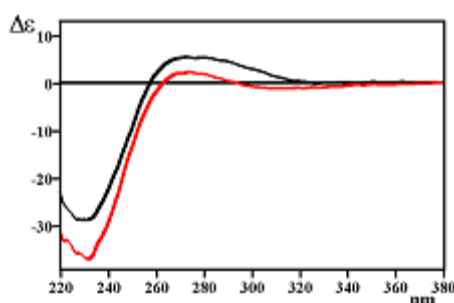


Figura 3.11. Espectres de DC de l'espècie Hg_6^- MT obtinguda afegint $HgCl_2$ a Zn_4^- MT a pH 3 a $t=24h$ i $t=0h$.

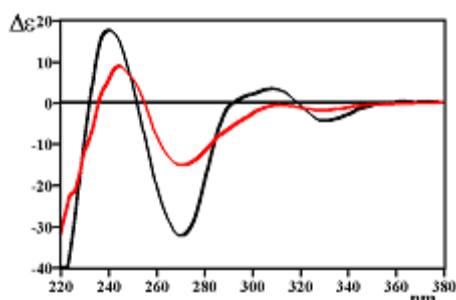


Figura 3.12. Espectres de DC de l'espècie Hg_8^- MT obtinguda afegint $HgCl_2$ a Zn_4^- MT a pH 3 a $t=24h$ i $t=0h$.

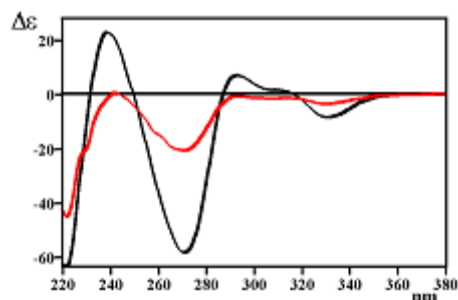


Figura 3.13. Espectres de DC de l'espècie Hg_{11}^- MT obtinguda afegint $HgCl_2$ a Zn_4^- MT a pH 3 a $t=24h$ i $t=0h$.

3.2.3. Valoració de Zn_4^- MT amb $Hg(ClO_4)_2$ a pH 3 a $t=24h$ (LÀMINA 6)

La valoració de Zn_4^- MT (apo- MT a pH 3) amb $Hg(ClO_4)_2$ a pH 3 i a $t=24h$ dona lloc a espècies de la mateixa estequiometria que les obtingudes emprant $HgCl_2$ com a agent valorant, però amb $Hg(ClO_4)_2$ es formen, addicionalment, Hg_3^- MT i Hg_7^- MT.

Les primeres etapes d'ambdues valoracions segueixen un mecanisme de reacció anàleg fins a la formació de Hg_6^- MT. Malgrat això cap de les espècies assolides addicionant $Hg(ClO_4)_2$ presenta un espectre de DC perfectament superposable al de l'equivalent afegint $HgCl_2$ (Figures 3.14., 3.15., 3.16. i 3.17.). Així, la diferència més important entre ambdues valoracions ve donada per la intensitat de les bandes dels espectres de DC. La comparació global de tots ells permet observar que, independentment de la seva estructura, els agregats formats addicionant

$\text{Hg}(\text{ClO}_4)_2$ presenten un grau de quiralitat, i, per tant, probablement una estructuració, molt inferior als formats afegint HgCl_2 .

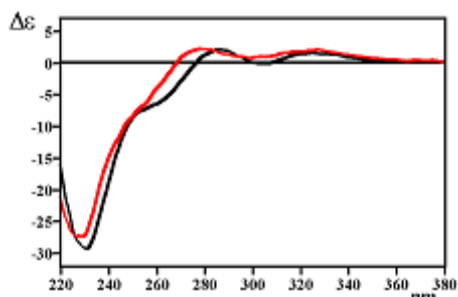


Figura 3.14. Espectres de DC de l'espècie Hg_4^- MT obtinguda afegint HgCl_2 i $\text{Hg}(\text{ClO}_4)_2$ a Zn_4^- MT pH 3 a

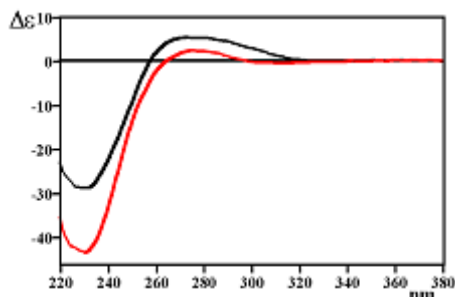


Figura 3.15. Espectres de DC de l'espècie Hg_6^- MT obtinguda afegint HgCl_2 i $\text{Hg}(\text{ClO}_4)_2$ a Zn_4^- MT pH 3 a

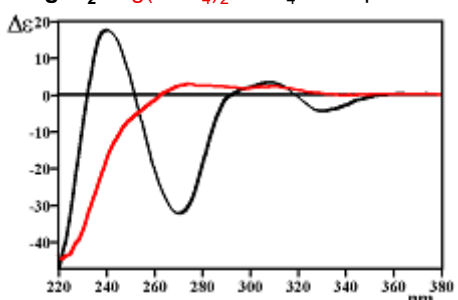


Figura 3.16. Espectres de DC de l'espècie Hg_8^- MT obtinguda afegint HgCl_2 i $\text{Hg}(\text{ClO}_4)_2$ a Zn_4^- MT a pH 3 a $t=24\text{h}$.

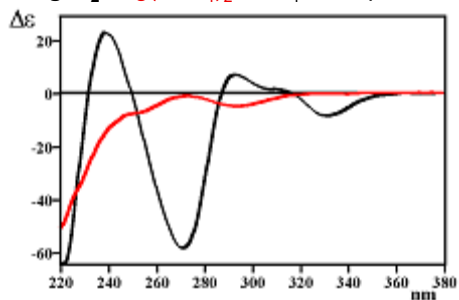


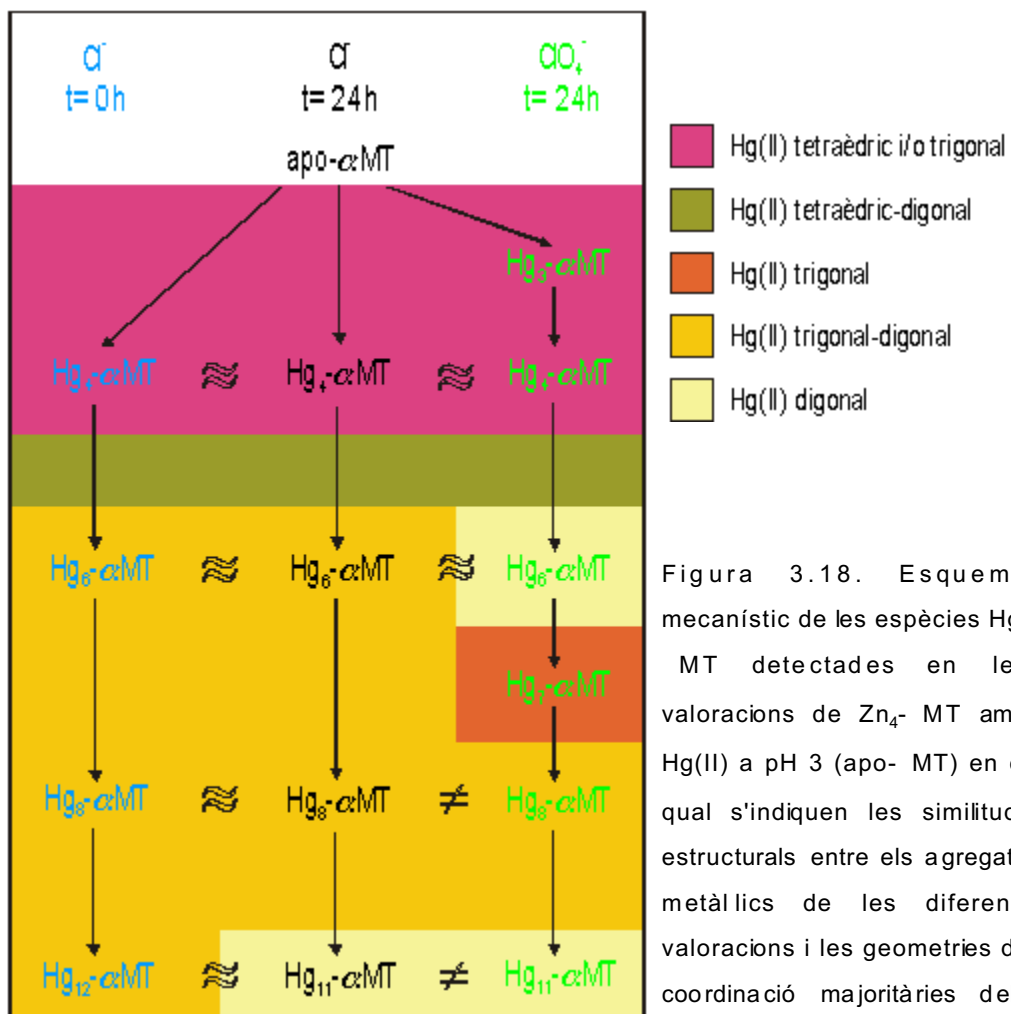
Figura 3.17. Espectres de DC de l'espècie Hg_{11}^- MT obtinguda afegint HgCl_2 i $\text{Hg}(\text{ClO}_4)_2$ a Zn_4^- MT a pH 3 a $t=24\text{h}$.

Malgrat la coincidència estequiomètrica dels agregats metàl·lics d'ambdues valoracions hi ha diferències en els ED, la qual cosa indica que els entorns de coordinació dels ions $\text{Hg}(\text{II})$ no coincideixen en totes les espècies proposades. Així, Hg_6^- MT obtinguda addicionant $\text{Hg}(\text{ClO}_4)_2$ presenta $\text{Hg}(\text{II})$ amb entorns de coordinació únicament digonals, a diferència del que mostra en la valoració amb HgCl_2 , on els ions de $\text{Hg}(\text{II})$ són mixtes digonals i trigonals. D'altra banda, en la valoració amb $\text{Hg}(\text{ClO}_4)_2$ s'observa, a partir del 9è eq de $\text{Hg}(\text{II})$ afegit, la pèrdua de les absorpcions menys energètiques la qual cosa indica que molt probablement l'enllaç de més eq de $\text{Hg}(\text{II})$ implica una disminució del nombre de coordinació dels $\text{Hg}(\text{II})$. Tot això suggereix que el Cl^- participa

en la coordinació del Hg(II) donant lloc a espècies amb estructures i geometries de coordinació del Hg(II) diferents a les assolides en presència de ClO₄⁻.

3.2.4. Conclusions per a la valoració de Zn₄- MT recombinant de ratolí a pH 3

La comparació de les valoracions de Zn₄- MT (apo- MT) amb Hg(II) a pH 3 permet proposar l'esquema de reacció general i les conclusions següents.



ions Hg(II).

Les tres valoracions segueixen mecanismes de reacció anàlegs fins a arribar a la formació de l'espècie Hg_6^- MT. A partir d'aquesta espècie, l'addició de HgCl_2 o $\text{Hg}(\text{ClO}_4)_2$ provoca que els agregats Hg(II): MT evolucionin per mecanismes diferents.

Les espècies que es detecten en les tres valoracions presenten la mateixa estequiometria Hg(II): MT. En la valoració efectuada afegint $\text{Hg}(\text{ClO}_4)_2$ es formen addicionalment Hg_3^- MT i Hg_7^- MT.

Fins a la formació de Hg_6^- MT, en les tres valoracions s'assoleixen espècies amb estructures poc quirals.

Els agregats metàl·lics amb una relació molar Hg(II): MT més gran que 6 mostren una quiralitat superior en presència de Cl^- i inclús major si es formen sota control termodinàmic.

En els tres casos estudiats, les espècies Hg_4^- MT i Hg_6^- MT presenten estructures similars (Figures 3.19. i 3.20.).

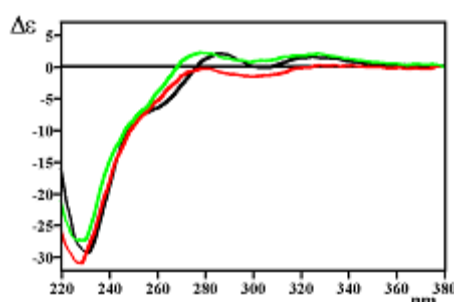


Figura 3.19. Espectres de DC de l'espècie Hg_4^- MT obtinguda afegint $HgCl_2$ a Zn_4^- MT a pH 3 a $t=24h$ i $t=0h$ i afegint-hi $Hg(ClO_4)_2$ a $t=24h$.

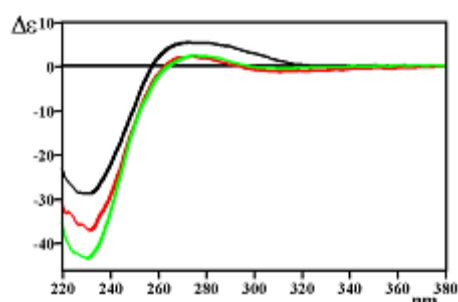


Figura 3.20. Espectres de DC de l'espècie Hg_6^- MT obtinguda afegint $HgCl_2$ a Zn_4^- MT a pH 3 a $t=24h$ i $t=0h$ i afegint-hi $Hg(ClO_4)_2$ a $t=24h$.

Les espècies formades en la segona meitat de les valoracions amb $HgCl_2$ presenten estructures anàlogues entre elles i diferents de les obtingudes afegint $Hg(ClO_4)_2$ (Figures 3.21. i 3.22.).

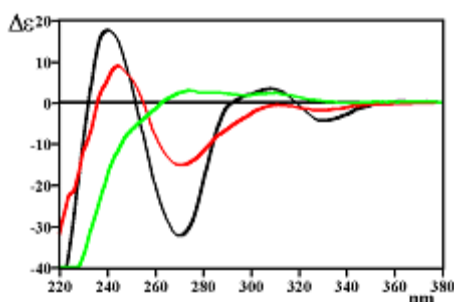


Figura 3.21. Espectres de DC de l'espècie Hg_8^- MT obtinguda afegint $HgCl_2$ a Zn_4^- MT a pH 3 a $t=24h$ i $t=0h$ i afegint-hi $Hg(ClO_4)_2$ a $t=24h$.

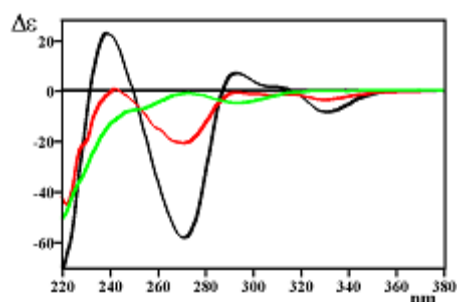


Figura 3.22. Espectres de DC de les espècies: Hg_{11}^- MT, obtinguda afegint $HgCl_2$ o $Hg(ClO_4)_2$ a Zn_4^- MT a pH 3 a $t=24h$, i Hg_{12}^- MT obtinguda afegint-hi $HgCl_2$ a $t=0h$.

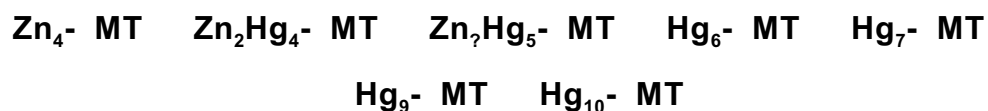
Com a conseqüència de que les espècies Hg_8^- MT i Hg_{11} o 12^- MT presentin estructures diferents segons s'obtinguin afegint $HgCl_2$ o $Hg(ClO_4)_2$ cal deduir que el Cl^- participa activament en l'estructuració d'aquests agregats. Així mateix, el fet que la quiralitat de les espècies obtingudes a $t=24h$ sigui major que la de les assolides a $t=0h$ indica que cal un temps mínim per a la conformació de l'agregat més estable.

La similitud entre els mecanismes de reacció de les valoracions efectuades en presència de Cl^- a $t=24\text{h}$ i $t=0\text{h}$ permet afirmar que l'evolució de Zn_4^- -MT en ser valorada amb HgCl_2 és independent de si la valoració es porta a terme sota criteris de control cinètics o termodinàmics.

A l'esquema s'indica amb zones ombrejades les diferents geometries de coordinació majoritàries del Hg(II) en les espècies detectades. S'observa que en les tres valoracions el Hg(II) adopta, primerament, un entorn de coordinació tetraèdric, seguidament digonal, després trigonal i finalment un altre cop digonal. També es formen espècies amb entorns de coordinació mixtes.

3.3. Valoració de Zn_4^- MT recombinant de ratolí amb $HgCl_2$ a pH variable (LÀMINA 7)

L'esquema de reacció que segueix l'espècie inicial quan s'addiciona Hg(II) a pH variable és el següent:



Una comparació global de les dades espectroscòpiques enregistrades durant la valoració de Zn_4^- MT amb $HgCl_2$ a pH variable, amb les descrites anteriorment a pH 7 i 3 permet determinar clarament que la primera fase de la valoració segueix la mateixa evolució que la corresponent a pH 7. El fet que la valoració efectuada a pH 7 a $t=0h$ mostri, a partir del 6è eq de Hg(II) afegit, un mecanisme de reacció anàleg al descrit a pH 3 no permet assegurar que el comportament observat a partir del 4t eq de Hg(II) afegit en la valoració a pH variable sigui atribuït al descens del pH i, per tant, impossibilita detectar, mitjançant la comparació dels espectres de DC, a partir de quin punt comença a disminuir el pH en aquesta valoració. Així doncs, quan es comparen els espectres de DC corresponents als agregats $Zn_7Hg_5^-$ MT, obtingut a pH variable, i Hg_5^- MT, obtingut a $t=0h$ a pH 7 i a pH 3, s'observa que la primera espècie presenta una empremta espectral intermitja entre les altres dues (Figura 3.23.). Es proposa que possiblement en aquest punt de la valoració el pH ja sigui inferior a 7.

La superposició dels espectres de DC de les darreres espècies de les tres valoracions efectuades a $t=0h$, a pH variable, 7 i 3, mostra força diferències (Figura 3.24.). S'observa que Hg_{10}^- MT a pH variable és

estructuralment anàloga a l'agregat $\text{Hg}_8^- \text{MT}$ que es forma en la valoració efectuada a pH 3 a $t=0\text{h}$ (Figura 3.25.) però que al cap de tres dies el seu espectre és més proper al de l'espècie final que s'assoleix a pH 3 a $t=0\text{h}$, $\text{Hg}_{12}^- \text{MT}$ (Figura 3.26.).

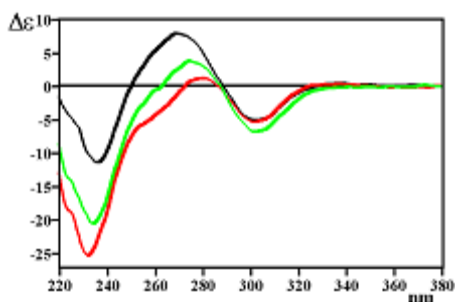


Figura 3.23. Espectres de DC de les espècies $\text{Hg}_5^- \text{MT}$ i $\text{Zn}_7\text{Hg}_5^- \text{MT}$ obtingudes afegint HgCl_2 a $\text{Zn}_4^- \text{MT}$ a $t=0\text{h}$ a **pH 7** o **pH 3**, la primera, i a **pH variable** la segona.

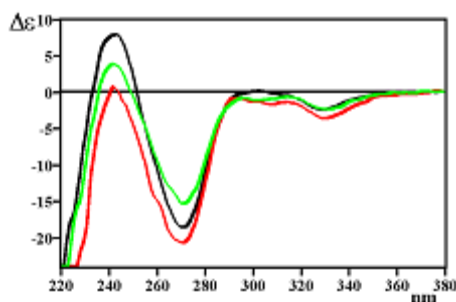


Figura 3.24. Espectres de DC de les espècies **$\text{Hg}_{11}^- \text{MT}$** , **$\text{Hg}_{12}^- \text{MT}$** i **$\text{Hg}_{11}^- \text{MT}$** obtingudes afegint HgCl_2 a $\text{Zn}_4^- \text{MT}$ a **pH 7**, **3** i **variable**, respectivament.

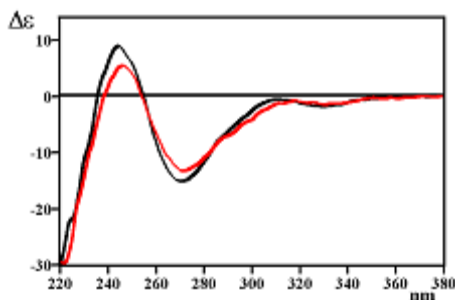


Figura 3.25. Espectres de DC de les espècies: **$\text{Hg}_8^- \text{MT}$** , obtinguda afegint HgCl_2 a $\text{Zn}_4^- \text{MT}$ a pH 3 a $t=0\text{h}$, i **$\text{Hg}_{10}^- \text{MT}$** afegint-li a pH variable.

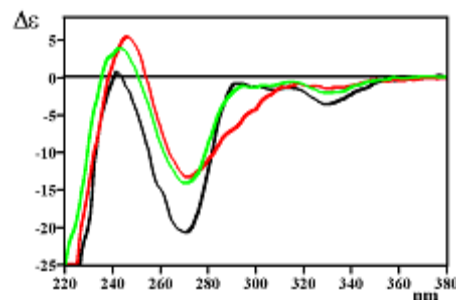


Figura 3.26. Espectres de DC de les espècies: **$\text{Hg}_{12}^- \text{MT}$** , obtinguda afegint HgCl_2 a $\text{Zn}_4^- \text{MT}$ a pH 3 a $t=0\text{h}$, i **$\text{Hg}_{10}^- \text{MT}$** , obtinguda afegint-li a pH variable a **$t=0\text{h}$** i **$t=10\text{dies}$** .

3.4. Comparació amb les dades bibliogràfiques

Les dades bibliogràfiques referents a la coordinació de Hg(II) al fragment de la MT es limiten als estudis de Stillman i col·laboradors amb apo- MT i Zn₄- MT corresponents a la isoforma 2 nativa de fetge de conill en ser valorades amb HgCl₂ a pH 7 (Figures 3.27. i 3.28.).¹⁵³ En ambdues valoracions els autors proposen la formació de les espècies Hg₄- MT i Hg₁₁- MT. La primera

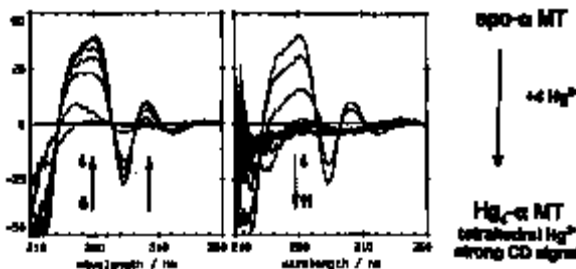


Figura 3.27. Espectres de DC enregistrats a pH 7 i a 20 °C per a diferents solucions d'apo- MT 2 de fetge de conill amb relacions molars Hg(II): MT creixents. Al costat es mostra l'esquema de reacció proposat per a aquesta valoració.

espècie mostra un espectre de DC idèntic en els dos casos a m b

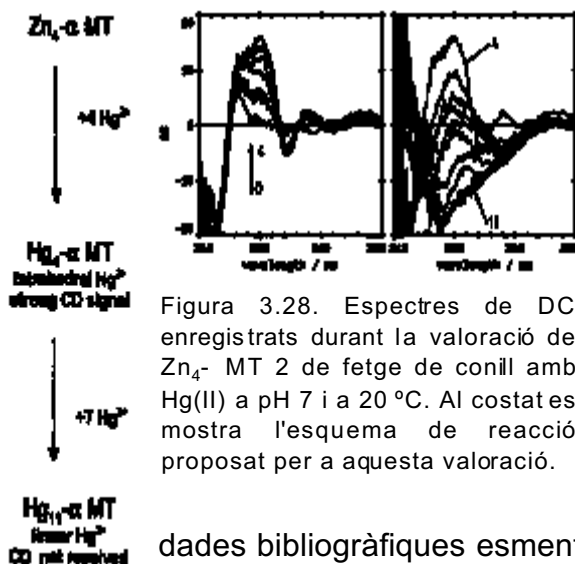


Figura 3.28. Espectres de DC enregistrats durant la valoració de Zn₄- MT 2 de fetge de conill amb Hg(II) a pH 7 i a 20 °C. Al costat es mostra l'esquema de reacció proposat per a aquesta valoració.

bandes a 260(+), 280(-), 300(+) i 320(-) nm i es proposa que el Hg(II) presenta entorns de coordinació exclusivament tetraèdrics. Hg₁₁- MT presenta en els dos casos espectres de DC molt poc intensos i resolts.

Quan es comparen les dades bibliogràfiques esmentades amb les obtingudes en aquest estudi el que destaca és que, en general, les

valoracions bibliogràfiques mostren uns espectres molt menys resolts que els que s'obtenen en aquest treball. La causa més probable d'aquestes diferències és que la puresa de la proteïna nativa és força inferior a la de la proteïna recombinant emprada en aquest estudi. Tot i així, independentment de la intensitat i resolució dels espectres de DC es detecten algunes similituds entre les dades bibliogràfiques i les es presenten en aquest treball però també diversos punts de discordança.

Òbviament, no és possible comparar les dades referents a la valoració d'apo- MT a pH 7 ja que en aquest treball no s'ha considerat adequat treballar amb les formes apo de les proteïnes a pH 7 per motius de sensibilitat a l'oxidació i quantitat de proteïna requerida.

La comparació de les valoracions de Zn_4^- MT amb $HgCl_2$ a pH 7 indica que les primeres fases d'ambdues són similars. L'espècie Hg_4^- MT postulada per Stillman i col laboradors presenta un espectre de DC i, per tant, una estructura, molt semblant al de l'espècie $Zn_2Hg_4^-$ MT caracteritzada en aquest treball, si bé els autors proposen que la primera no conserva cap ió de Zn(II) coordinat al cluster. A partir d'aquest punt no s'observa cap altra coincidència ni en l'estructura ni en l'estequiometria de les espècies proposades tot i que l'addició del 6è eq de Hg(II) podria donar lloc a una espècie Hg_6^- MT similar a l'obtinguda amb la proteïna recombinant, però la manca de resolució de les dades bibliogràfiques impedeix fer-ne una comparació exhaustiva.

El fet que en la bibliografia es proposi la formació de Hg_4^- MT tant a partir de Zn_4^- MT com d'apo- MT sembla corroborar l'absència d'ions Zn(II) en l'agregat metàl·lic, però l'observació que el seu espectre de DC coincideix amb el de l'espècie $Zn_2Hg_4^-$ MT caracteritzada en aquest treball planteja

una qüestió a resoldre. A tal efecte cal considerar la realització d'un assaig que demostra que la coordinació del Zn(II) a la proteïna és indispensable per a la conformació de $Zn_2Hg_4^-$ MT.

La Figura 3.29. mostra l'evolució dels espectres de DC enregistrats quan a una solució a pH 7 que conté l'espècie $Zn_2Hg_4^-$ MT se li afegeix progressivament HCl 10^{-2} M fins que la solució assoleix un pH entorn de 3. S'observa que aquesta acidificació porta a la formació de l'espècie Hg_4^- MT, caracteritzada a pH 3 la qual no conté ions de Zn(II) coordinats. L'addició posterior de Tris-HCl 70 mM a pH 7 a la

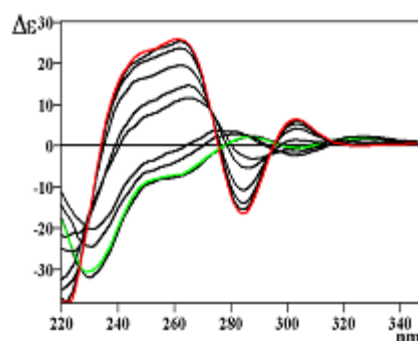


Figura 3.29. Espectres de DC corresponents a la interconversió de les espècies $Zn_2Hg_4^-$ MT, obtinguda a pH 7, i Hg_4^- MT, obtinguda a pH 3, en funció del pH.

mateixa solució provoca un canvi d'estructuració i l'aparició de la banda situada a 244(+) nm característica del Zn(II) coordinat a la proteïna per donar lloc, novament, a la formació de $Zn_2Hg_4^-$ MT. Així, aquesta interconversió de les dues espècies demostra que, en presència d'ions Zn(II) lliures al medi, el pH determina la coordinació del Zn(II) a la proteïna i, per tant, la seva estructura la qual dóna lloc a un espectre de DC característic.

3.5. Conclusions del comportament de Zn₄- MT recombinant de ratolí a diferents pH

L'anàlisi de les dades presentades i discutides als diferents pH, amb diferents temps d'estabilització i addicionant Hg(II) en forma de HgCl₂ o Hg(CIO₄)₂, i la seva comparació amb les dades bibliogràfiques, permet establir el comportament del fragment MT enfront Hg(II) d'acord amb l'esquema següent i proposar les conclusions que es detallen a continuació.

Independentment del pH, del temps d'estabilització i de la sal de Hg(II) addicionada, la coordinació del Hg(II) a Zn₄- MT dóna lloc, en els primers estadis de les valoracions, a espècies que contenen 4 (Zn₂Hg₄- MT o Hg₄- MT) i 6 (Hg₆- MT) equivalents de Hg(II).

L'estructura de les espècies amb 4 eq de Hg(II) és diferent a pH 7 i 3 a causa de que a pH 7 l'agregat metàl·lic format també conté Zn(II) coordinat. Tot i així, ambdues estructures

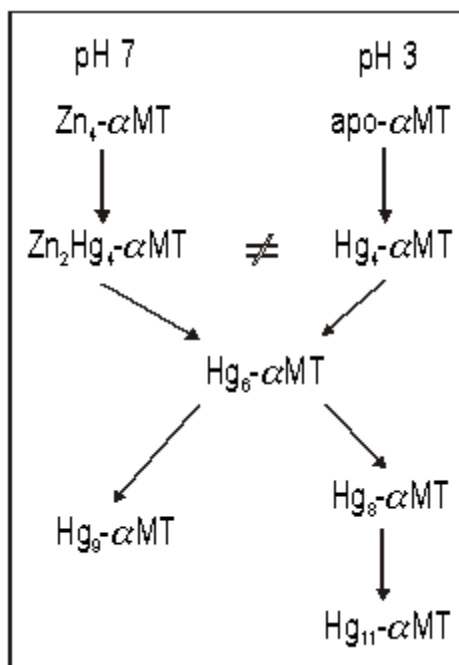


Figura 3.30. Esquema general de les espècies detectades al llarg de la valoració de Zn₄- MT amb Hg(II).

s'interconverteixen baixant o pujant el pH. La geometria de coordinació del Hg(II) en aquests agregats també depèn del pH, essent mixta, tetraèdrica-digonal, a pH 7 i exclusivament tetraèdrica a pH 3. D'acord amb l'anàlisi realitzada, el Hg(II) de Hg₄- MT estaria coordinat únicament a S_{Cys} mentre que en l'espècie Zn₂Hg₄- MT molt probablement completa

la seva esfera de coordinació amb altres lligands presents al medi.

L'estructura de l'espècie Hg₆- MT és anàloga en totes les valoracions (Figura 3.31.). La geometria de coordinació que presenta el Hg(II) en aquest agregat és exclusivament digonal en tots els casos excepte en les espècies que es formen afegint HgCl₂ a pH 3, les quals presenten Hg(II) amb geometria de coordinació mixta trigonal-digonal si bé això afecta molt poc la seva estructura.

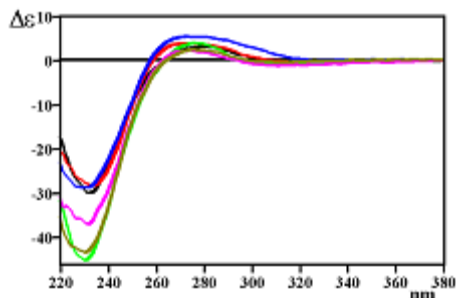


Figura 3.31. Espectres de DC de les espècies: Hg₆- MT, obtinguda afegint HgCl₂ a Zn₄- MT a pH 7 a **t=24h** i **t=0h** i Hg₇- MT, obtinguda afegint-hi Hg(ClO₄)₂, i Hg₆- MT, obtinguda afegint HgCl₂ a Zn₄- MT a pH 3 a **t=24h**, **t=0h** i afegint-hi Hg(ClO₄)₂.

Les espècies amb una relació molar Hg(II): MT superior a 6 són estequiomètricament i estructuralment diferents a pH 7 i 3.

Les geometries de coordinació que adopta el Hg(II) en les espècies formades al llarg de les valoracions segueix, independentment del pH, del temps d'estabilització i de la presència de Cl⁻ o ClO₄⁻ en el medi, l'ordre següent: tetraèdric, digonal, trigonal i quan el nombre d'equivalents de Hg(II) addicionat s'acosta al nombre de S_{Cys} de la proteïna, és a dir, 11, les espècies tornen a presentar un entorn de coordinació digonal. Els espectres de diferència d'absorció UV-Visible de les espècies amb Hg(II) digonal formades en les etapes intermitja i final de les valoracions indiquen que probablement els lligands de l'entorn de coordinació del metall són diferents en els dos casos.

La utilització de HgCl₂ o Hg(ClO₄)₂ com a agent valorant de Zn₄- MT a

qualsevol dels pH estudiats posa de manifest que:

A pH 7 en presència de ClO_4^- , es reté el Zn(II) coordinat a la proteïna durant més equivalents de Hg(II) afegits.

Les espècies que, tenint la mateixa relació estequiomètrica Hg(II): MT, mostren geometries de coordinació diferents pel Hg(II), presenten nombres de coordinació superiors quan s'utilitza $\text{Hg}(\text{ClO}_4)_2$ com a agent valorant.

L'absència de Cl^- al medi comporta un increment del nombre d'espècies detectades al llarg de les valoracions.

Les espècies formades en la segona meitat de les valoracions realitzades afegint $\text{Hg}(\text{ClO}_4)_2$ presenten molt poca quiralitat i, per tant, un grau d'estructuració baix, respecte als agregats corresponents formats amb HgCl_2 .

L'addició de HgCl_2 o $\text{Hg}(\text{ClO}_4)_2$ a Hg_6^- - MT a pH 3 dóna lloc a mecanismes de reacció diferents.

Tot això sembla indicar que el Cl^- juga un paper important en la dinàmica i l'estructuració dels agregats metàl·lics Hg(II)- MT. Així, els Cl^- del medi molt probablement participen en els entorns de coordinació del Hg(II) donant lloc a enllaços secundaris que afavoreixen una estructuració major de moltes de les espècies formades, o bé participant en la seva primera esfera de coordinació. D'altra banda, la presència de ClO_4^- , menys coordinant i més voluminós que el Cl^- , no permet l'augment d'estructuració de les espècies formades i molt probablement no s'enllaça en la primera esfera de coordinació del Hg(II).

Respecte al temps d'estabilització cal destacar que influeix en el mecanisme de reacció de les valoracions realitzades a pH 7 però no en el de les dutes a terme a pH 3. En qualsevol cas, la manca d'estabilització dels agregats Hg(II)- MT detectats en les valoracions a $t=0\text{h}$ queda

reflectida en una quiralitat inferior dels espectres de DC de les espècies d'estequiometria Hg(II): MT superior a 6 la qual indica que molt probablement el seu grau d'estructuració és inferior al dels agregats formats a $t=24h$.

La informació bibliogràfica existent només aporta dades del comportament de la proteïna nativa a pH 7 però concorda amb les dades obtingudes en aquest treball pel que fa a l'estructura de la primera espècie postulada, a la geometria de coordinació que hi presenta el Hg(II), i al nombre d'equivalents de Hg(II) pel qual s'assoleix la saturació de la proteïna. No obstant això, hi ha diferències significatives en la proposta estequiomètrica, Hg_4 - MT *versus* Zn_2Hg_4 - MT, i en l'evolució general de la valoració. Així doncs, les dades bibliogràfiques permeten validar el comportament del fragment de la MT recombinant de mamífer i posen de manifest que, molt probablement, les diferències observades entre ambdues proteïnes són causades per la diferència en la seva puresa.