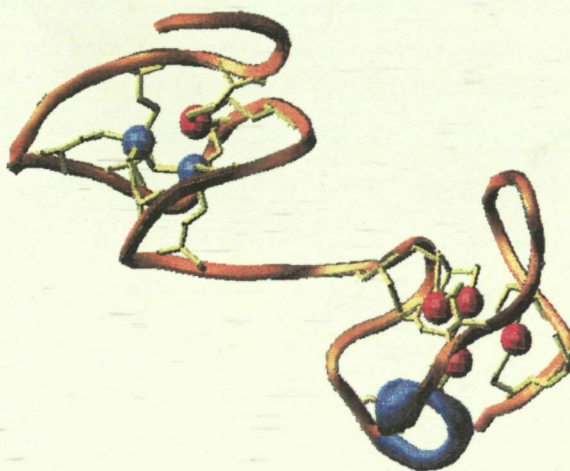


Universitat Autònoma de Barcelona

**EL PAPER ESTRUCTURAL DEL ZINC EN EL PLEGAMENT
DE LES METAL·LOTIONEÏNES DE COURE**



TESI DOCTORAL

Roger Bofill i Arasa

Març 2001

Article 4

M. Valls, R. Bofill, N. Romero-Isart, R. González-Duarte, J. Abián,

M. Carrascal, P. González-Duarte, M. Capdevila, S. Atrian.

Drosophila MTN: a metazoan copper-thionein related to fungal forms.

FEBS Let., **2000**, *467*, 189-194.

Drosophila MTN: a metazoan copper-thionein related to fungal forms

M. Valls^{a,1}, R. Bofill^{b,1}, N. Romero-Isart^b, R. González-Duarte^a, J. Abián^c, M. Carrascal^c,
P. González-Duarte^b, M. Capdevila^b, S. Atrian^a *

^aDepartament de Genètica Facultat de Biologia Av Diagonal 645 Universitat de Barcelona E 08028 Barcelona Spain

^bDepartament de Química Inorgànica Facultat de Ciències Universitat Autònoma de Barcelona E-08193 Bellaterra Spain

^cDepartament de Bioanàlisi Mèdiques Institut d'Investigacions Biomèdiques de Barcelona CSIC Jordi Guona Salgado 18 E 08034 Barcelona Spain

Received 25 November 1999, received in revised form 12 January 2000

Edited by Gunnar von Hejne

Abstract Two *Drosophila* metallothioneins (MT) have been reported: MTN, a 40 residue peptide including 10 Cys, and MTO, a 43 residue peptide including 12 Cys. However, neither functional nor evolutionary analyses for either of the *Drosophila* MT are available. Here, heterologous expression of *Mtn* in *Escherichia coli* is reported. The metal binding abilities of the Cu- and Zn-MTN complexes conformed in vivo, as well as the features of the Cd- and Cu-aggregates produced by metal replacement in vitro, have been determined by atomic emission spectrometry, circular dichroism and electrospray ionization mass spectrometry. Primary structure relationships with other MT have been examined. The results indicate a close resemblance of MTN to fungal copper-thioneins.

© 2000 Federation of European Biochemical Societies.

Key words Cu(I) binding, Cd(II) binding, Zn(II) binding, Molecular evolution, Recombinant synthesis, *Drosophila* metallothionein

1. Introduction

The metallothionein (MT) superfamily includes a wide range of low molecular mass and cysteine-rich heavy metal binding peptides [1]. Although they were first associated to metal detoxification and homeostasis, their presence in all animal phyla, and in most fungi and plants, supports a housekeeping metabolic function. In fact, protection against oxidative stress and/or free radical tolerance has been claimed recently [2–5].

Three classes of MT have been defined according to their primary structure (Web page, <http://www.unizh.ch/~mtpage/classif.html>). Class I comprises those polypeptides alignable to horse MT-1B [6] all vertebrate, crustacea and mollusk forms. Vertebrate MT share a two-domain structure: the N-terminal β domain, with nine Cys in Cys-X-Cys arrays, which binds three divalent metal ions, and the C-terminal α domain, with 11 Cys, some of which are in Cys-Cys doublets binding

four divalent metal ions [7,8]. Crustacean MT are also bidentate peptides, but built from two β -like units [9]. Class II consists of a highly heterogeneous group of MT from most invertebrates, fungi and plants, and comprises sequences with no clear homology to horse MT. Only *Neurospora crassa* and *Saccharomyces cerevisiae* MT have been characterized at the structural and functional level. Both peptides constitute single metal binding domains, in which seven and 10 coordinating Cys bind six and eight Cu(I) ions, respectively [10,11]. They are considered primeval β forms, from which the more evolved β - α mammalian MT arose [12], on the basis of their Cys-X-Cys motifs and their binding capacity, which is restricted to three divalent metal ions. Little is known about MT domain evolution as Class II MT have been poorly characterized, not even reports on the *Drosophila* MT, a well known model organism, have been provided.

Two *Drosophila* MT genes have been reported, *Mtn* (at the 85E region of the third chromosome) and *Mto* (at 92E on the same chromosome), they are distant paralogues, sharing only 26% amino acid identity. *Mtn* encodes a 40 residue peptide, comprising 10 Cys, and it is present in two allelic forms: *Mtn3* (Lys as C-terminal residue) and *Mtn1* (Glu as C-terminal residue) [13,14]. On the other hand, *Mto* encodes a 43 amino acid peptide, with 12 Cys, and was isolated from a Cd-resistant cell line [15].

Expression of these genes following metal induction appears to be significantly different. Amplification of the *Mtn* locus has been reported in unrelated natural populations and correlated to an increase of heavy metal tolerance [16]. However, *Mto* amplification is restricted to duplication and only in laboratory cell lines [15]. Transcripts of *Mtn* are mainly located in the digestive tract and Malpighian tubules of metal-fed larvae and adults. Cu and Cd are strong inducers of *Mtn* in the midgut, while Zn stimulates transcription from both genes in the Malpighian tubules. Basal expression supports a more housekeeping function for *Mto*. These expression patterns have suggested differential roles: involvement of MTO in Zn and Cu homeostasis and Zn excretion regulation, and contribution of MTN to Cu and Cd removal following oral intoxication [13,17].

Surprisingly, neither functional nor evolutionary analyses of these proteins are available. MTO has recently been purified to homogeneity, but it has not been characterized [18]. Isolation of MTN from flies, even metal-induced, has never been reported, probably due to lysosomal import and degradation after metal chelation. Recombinant synthesis was described in yeast, but only at the analytical level [19]. Here, we report heterologous expression of *Mtn* (*Mtn1*) in *Escherichia coli*, which provided highly homogenous MTN preparations. Fea-

*Corresponding author. Fax: (34) 93 4110969.
E-mail: silvia@potthos.bio.ub.es

¹ Made equal contributions to this study.

Abbreviations CD: circular dichroism; DTNB: 5,5'-dithiobis(nitrobenzoic acid); ICP-AES: inductively coupled plasma atomic emission spectrometry; ESI-MS: electrospray ionization mass spectrometry; MT: metallothionein.

tures of in vivo-conformed Zn- and Cu-MTN complexes have been determined, as well as those of the Cd- and Cu-aggregates obtained in vitro by metal replacement to Zn-MTN. Finally, primary structure relationships with other MT were established and the physiological role and evolutionary history of the MTN protein has been re-evaluated.

2. Materials and methods

2.1 Gene cloning and recombinant protein purification

Drosophila melanogaster *Mtn* cDNA, cloned in pUC9, was kindly provided by Dr G Maroni [13]. PCR amplification of the coding region was performed using this plasmid as a template. The upstream primer MTD1 (5'-CCCAGATCTATGCCTTGCCCA-3') introduced a *Bgl*II restriction site immediately upstream of the ATG initiation codon, and the downstream primer MTD2 (5'-CGGCGGTCGACTCACTCGGAGCA-3') generated a *Sal*I restriction site just after the *Mtn* stop codon. The PCR product was isolated from a 2% agarose gel, digested with *Bgl*II and *Sal*I and directionally cloned in the compatible *Bam*HI-*Sal*I sites of the pGEX4T-1 expression vector (Amersham Pharmacia), yielding pGEX-*Mtn*. DNA sequence was confirmed by automatic sequencing using an ABI 370 Automatic Sequencer and the Amersham Dye Terminator Cycle Sequencing kit. Restriction enzymes were purchased from Promega JM105 was used as recipient strain for cloning and sequencing. To enhance the production of recombinant protein, pGEX-*Mtn* was transformed into the protease-defective BL-21 *E. coli* strain [20]. Exponentially growing 1.5 l LB cultures of the transformed strain were induced with 100 μ M IPTG for 3 h, in the presence of 300 μ M ZnCl₂ or 500 μ M CuSO₄. The GST-MTN protein was isolated from the cell lysate by affinity chromatography, the MTN portion subsequently cleaved from the fusion protein and purified by FPLC chromatography, as described for recombinant mammalian MT [21].

2.2 Characterization of the metalated MTN species

Inductively coupled plasma atomic emission spectrometry (ICP-AES) in a Thermo Jarrell Ash, Polyscan 61E was used to measure S (182.0 nm), Zn (213.9 nm) and Cu (324.8 nm) contents and to estimate the protein concentration [21]. Thiol groups over total sulfur were determined by the 5,5'-dithiobis(nitrobenzoic acid) (DTNB) reaction [22], except in Cu-containing samples, as the presence of Cu in MT prevents SH quantification by Ellman's method [23]. Electronic absorption (UV) measurements were performed on an HP-8452A Diode array. A Jasco spectropolarimeter (Model J-715) interfaced to a computer was used for circular dichroism (CD) measurements. A Peltier PTC-351S maintained the temperature at 25°C. All spectra were recorded with 1 cm capped quartz cuvettes, corrected for the dilution effects and processed using the program GRAMS 32. Titrations of Zn-MTN with Cd(II) and Cu(I) at pH 7 were carried out following the procedures described elsewhere [21,24] and followed by UV and CD spectroscopies. Electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS) was also used to assess the purity and the metal binding stoichiometry of all the metalated species, as explained below.

2.3 ESI-MS

Molecular mass measurements were performed on a Fisons Platform II Instrument equipped with the Mass Lynx software, calibrated with horse heart myoglobin (0.1 mg/ml). The experimental conditions for the metalated species were as follows: 10 μ l of protein solution was injected at 20 μ l/min, capillary counterelectrode voltage, 4.5 kV, lens counterelectrode voltage, 1.0 kV, cone potential, 35 V, source temperature, 120°C, *m/z* range, 750–1950, scanning rate, 2 s/scan, interscan delay, 0.2 s. The carrier was a 5:95 mixture of methanol and 3 mM ammonium formate/ammonia, pH 7.5. The molecular mass of the apo-proteins was determined as described above except for the following conditions: for apo-MTN obtained from Zn-MTN, the carrier was a 1:1 mixture of acetonitrile and 0.05% trifluoroacetic acid, pH 2.5, source temperature, 60°C, for apo-MTN obtained from Cu-MTN, the carrier was a 1:1 mixture of acetonitrile and trifluoroacetic acid, pH 1.5, syringe pump at 30 μ l/min, source temperature, 90°C. In both cases, the capillary counterelectrode voltage was 3.5 kV, the lens counterelectrode voltage was 0.5 kV and the cone potential was 40 V. Masses for the holo-species were calculated according to [25].

2.4 Protein sequence and structure comparisons

Protein sequence alignments and tree construction were performed using Clustal W (v1.74) [26] and the PILEUP and PAUP utilities enclosed in the GCG Package (v10) [27]. Structure visualization was carried out using the Insight II Package [28] v97 (Byosim Inc.). Software was supported by an Irix 64 v 6.4/Silicon Graphics Octane Workstation platform.

3. Results

3.1 Gene cloning and protein biosynthesis

DNA sequencing of the major PCR product (123 bp) confirmed that it corresponded to the *Mtn* coding region and that no nucleotide changes had been introduced. To assess GST-MTN production, total cell extracts of induced and uninduced *E. coli* BL-21 cells containing pGEX-*Mtn* were resolved on a denaturing polyacrylamide gel. After Coomassie blue staining, an extra band corresponding to the expected size of the protein fusion (30 kDa) was detected. GST-MTN was recovered from transformed *E. coli* cells grown in media supplemented with IPTG and the required metal, and it was cleaved with thrombin. The MTN portion was further purified, so that homogeneous Zn- and Cu-MTN preparations were obtained. Due to the expression system used, the recombinant protein contained two extra N-terminal amino acids (N-Gly-Ser), but this does not interfere with the metal binding features of MT [21]. The yield of pure MTN was 0.3 mg/l of culture and MTN concentration in the FPLC fractions was within the range of 10⁻⁴–10⁻⁵ M.

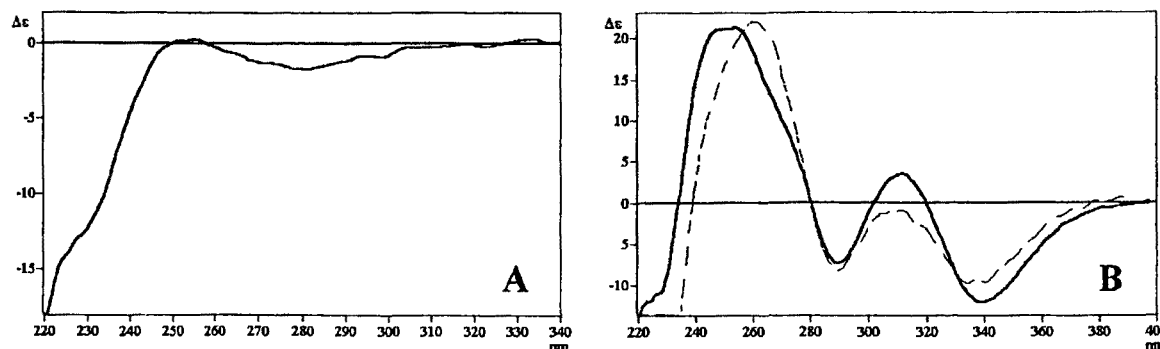


Fig. 1 (A) CD spectrum of recombinant Zn-MTN. (B) CD spectrum of recombinant Cu-MTN (solid line). The CD spectrum of the Cu-MTN species generated in vitro by total Zn/Cu replacement is also shown (dotted line).

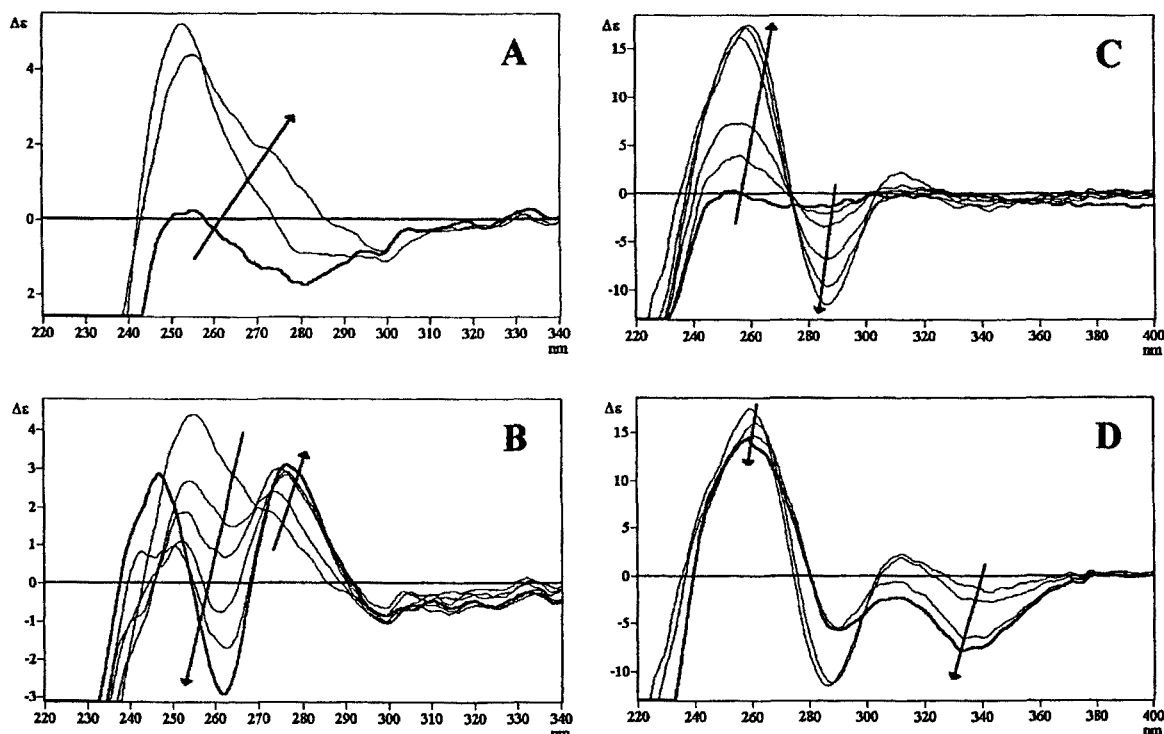


Fig 2 CD spectra obtained during the first (A) and second (B) stage of the titration of Zn-MTN with Cd(II), 12.16 μ M, and during the first (C) and second (D) stage of the titration of Zn-MTN with Cu(I), 10.98 μ M at pH 7. Arrows indicate increasing Cd(II) and Cu(I) equivalents, respectively. Traces corresponding to fully loaded Zn, Cd and Cu proteins are in bold.

3.2 Characterization of the Zn-MTN and Cu-MTN synthesized *in vivo*

ICP-AES, Ellman's and ESI-MS results (Table 1) showed that synthesis of MTN in Zn-supplemented media leads to the formation of two metalated species Zn_3 -MTN and Zn_4 -MTN. Acidification of this sample at pH 2.5 yielded a single apo-form with a molecular mass in accordance with the value calculated for the polypeptide sequence. This confirmed the integrity of the MT protein in the metal species mixture. ICP-AES and DTNB data indicated an average ratio of Zn/reduced protein of 3.5 and an oxidation degree of 35%, which could be expected from the coexistence of the two species. ESI-MS measurements carried out at pH 2.5 and 7.5 did not reveal multimers of MTN, thus pointing to the formation of intramolecular disulfides. The biosynthesized Zn-MTN species showed a low intensity and poorly resolved CD spectrum (Fig 1A), which indicates a low degree of folding.

When *Mtn* was expressed in Cu-supplemented media, a single Cu_8 -MTN species was detected by ESI-MS. The high intensity and well-defined CD spectrum (Fig 1B) revealed an organized folding of the protein around the metal ions. However, a 7.0 Cu/protein ratio was calculated from ICP-AES (Table 1). The absence of undermetalated species detected by ESI-MS, the fact that the Cu_8 -MTN species was also obtained *in vitro* through Zn/Cu replacement (see below) and the observation of a pure apo-protein by ESI-MS at pH 1.5 are all suggestive of the presence of a small fraction of totally oxidized MT (12.5%), while the bulk of the non-oxidized protein binds 8 Cu(I) ions.

3.3 *In vitro* Cd(II) and Cu(I) binding ability of Zn-MTN

The cadmium and copper binding ability of Zn-MTN was analyzed by metal replacement studies. The titration of the *in vivo*-synthesized Zn-MTN species with Cd(II) or Cu(I) was

Table 1
Molecular masses and zinc to protein and copper to protein ratios found for *in vivo*-synthesized Zn-MTN and Cu-MTN

Expression of MTN in X-supplemented media	<i>m</i> (apo-protein) ^a	<i>m</i> (X-protein) ^b	(X/protein) ^c	(X/protein) ^d
X = Zn	3995.9 ± 1.7	4253.0 ± 2.2 4188.6 ± 3.1	4 3	3.5
X = Cu	4003.0 ± 1.3	4496.7 ± 0.6	8	7.0

^aMolecular mass of the apo-protein. Calculated mass based on the polypeptide sequence is 3997.49.

^bMolecular mass of the Zn- and Cu-protein complexes. Calculated masses for neutral species with loss of two protons per zinc bound and one proton per copper bound [28] are 4251.01 (Zn_4 -MTN), 4187.63 (Zn_3 -MTN) and 4497.86 (Cu_8 -MTN).

^cZinc or copper per MT molar ratio calculated from the mass difference between holo- and apo-protein.

^dZinc per MT molar ratio calculated from the content of zinc (ICP-AES) and cysteine thiolates (Ellman's method) and Cu per MT molar ratio calculated from the content of copper and total sulfur (ICP-AES) [21].

followed by UV (data available upon request) and CD spectroscopies (Fig 2) ESI-MS determinations were performed at the end of each titration

As expected, the addition of Cd(II) to the Zn-MTN solution caused replacement of the Zn(II) ions by Cd(II) Initially (Fig 2A), a Gaussian band developed at ca 250 nm which finally resolved in a derivative-shaped profile (Fig 2B), indicating the presence of clustered Cd-thiolate complexes [21] A new Gaussian-shaped band centered at ca 275 nm developed before reaching saturation Although there is not any bibliographic reference of absorption at this wavelength for Cd-thiolate chromophores, absorptions between 260 and 320 nm have been reported for Cd-BPI cadystin complexes, which contain inorganic sulfur [29] ESI-MS measurements after saturation indicated the presence of two Cd-MTN species, Cd₃-MTN and Cd₄-MTN (data not shown), whose relative abundance was similar to that observed for the Zn-MTN species These data are consistent with a stoichiometric but non-isomorphous replacement of Zn by Cd atoms in MTN, together with the acquisition of a more organized fold in the latter

The increase in the intensity of the CD bands during the titration of Zn-MTN with Cu(I) (Fig 2C,D) comes from the enhancement of chirality produced by a tighter protein fold around the incoming metal ions In the first stage of the titration (Fig 2C), a derivative-like band with an inflexion point at 273 nm evolved It showed a slight decrease in intensity in the second stage of the titration while a new band centered at

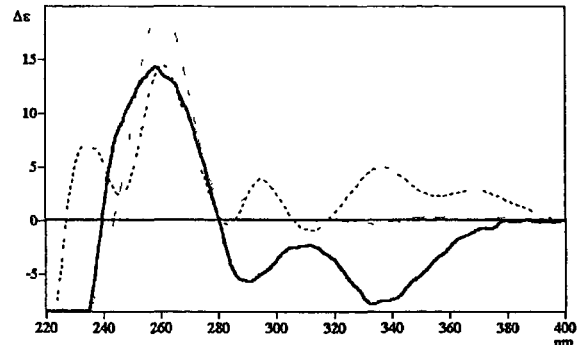


Fig 3 Superimposition of the CD spectra of the Cu₈-MTN species generated in vitro by Zn/Cu replacement (solid line) and of recombinant mouse Cu₆ βMT (dashed line) and Cu₇-βMT (dotted line)

ca 335 nm appeared (Fig 2D) The final CD spectrum corresponding to the fully Cu-loaded MTN species obtained in vitro practically matched that recorded for the in vivo-synthesized Cu-MTN (Fig 1B) Molecular mass measurements of the Cu-loaded MTN species have been plagued by the common difficulties associated with the artifactual clustering and oxidation either of Cu(I) to Cu(II) ions or of thiolate to disulfide bonds [30] However, ESI-MS results after Cu(I) saturation of MTN showed a predominant Cu₈-MTN species, together with other minor species of lower nuclearity (data not shown) These data corroborate the structural similarities observed in the CD spectra of the in vivo-synthesized and in vitro-replaced Cu-MTN species

Table 2

(A) PILEUP output of seven MT sequences, using the Blossum 62 weight matrix for the multiple alignment construction and (B) the consensus PAUP tree constructed from the four possible maximum parsimony PAUP trees from the alignment shown in (A)

A)

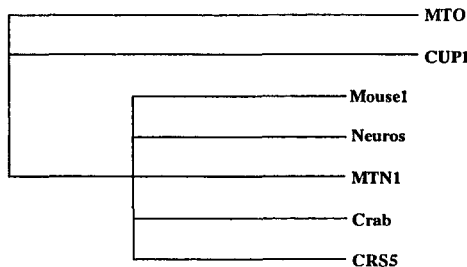
```

      . . . 10 . . . 20 . . . 30 . . . 40 . . .
MTO -----MVCKGGATNCCGSAQRGGDNRAGN
CUP1 -----QNEGBECCCGGCKNNEQGG
Mouse1 -----MDPMSC . STGGS . GT
Neuros ----- . GDGCG . . SGASS . NCG
MTN1 -----MPCFGSGCKCASQATRGK . NCG
Crab -----MPGFCNDKVCQEGGCKRAG . QGT
CRS5 -----MTVKICDCEGECCCKDSCHCGSTCLPSCSGGKCKCDHSTGSPQKRSGG
    
```

```

      50 . . . 60 . . . 70 . . . 80 . . . 90 . . .
MTO -----KDCQCVCKNGPKDCCSNK-----
CUP1 -----KSDSCPTGCGNSDDKCPGGNKSSEETKKSCKSGK-----
Mouse1 -----HSQACKNKCKTSCCKKCCSCCPVGCSCKAQGCVCVCGAADRCTCCA
Neuros -----SGGCGSNGGSK-----
MTN1 -----SDGCGGDDKK . SAGCGG-----
Crab -----S . GCGSPGQRCTGCGCATKKEECSKKTCTKPCSCCFK-----
CRS5 -----EKGCGETTSCEKSKNGEK-----
    
```

B)



Sequences are MTO and MTN1, the two *Drosophila* MT, CUP1 and CRS5, the two *S cerevisiae* MT, Neuros *N ciassa* MT, Crab, *Canca pagurus* MT and Mouse1 mouse MT 1

3.4 Structure/function analysis

Alignments of Class II MT by conventional algorithms are questionable due to the extreme size heterogeneity of the sequences, from 25 residues for *N ciassa* up to 105 for *Tetrahymena*, and due to the variable composition of the Cys arrays X-Cys-X-Cys-X, X-Cys-Cys-X and X-Cys-Cys-Cys-X. Thus, we focused our analysis on a more homogeneous subgroup of MT peptides containing the X-Cys-X-Cys-X motif. This included mouse MT 1 and *N ciassa* MT as the most distant members, the two *Drosophila* forms MTN and MTO, the two yeast forms CUP1 and CRS5, and a representative of crustacean MT, the blue crab, all of them with a reported metal cluster structure determined by X-ray or nuclear magnetic resonance (NMR) studies

The PILEUP alignment (Table 2), in agreement with all the Clustal W pairings obtained (data not shown), revealed the next interesting features: (1) A segment of approximately 40 residues defined a coherent core of the alignment. It comprised the complete sequence of *N ciassa* MT, in agreement with the predicted ancestral position of this fungal form among eukaryotic MT. (2) The two *Drosophila* peptides almost matched this core, but for their seven N-terminal residues, which contain two cysteines. *Drosophila* MTN corresponded to the shortest reported MT among multicellular organisms (40 residues), even shorter than those of several unicellular yeasts (*S cerevisiae* CRS5, *Candida* MT, *Yarrowia* MT). (3) The alignment for the secreted form of *S cerevisiae* CUP1 ended at Lys-69. The C-terminal unaligned tail, which includes 12 residues, two of which are Cys, corresponded to a

segment that does not participate in the Ag(I) clusters, according to NMR results [31,32]. (4) CRS5, the other *S. cerevisiae* MT [33], is similar in length (69 amino acids) to the vertebrate Class I MT, although it differs in amino acid composition and Cys distribution. The N-terminal segment remained unaligned and it might contribute to the second chelating domain predicted for this yeast MT [34]. (5) The two bi-domainial Class I MT, crustacean (β - β) and mammalian (β - α), were aligned by their N-terminal domains. This is also consistent with the hypothesis that the β domain is the ancestral unit in eukaryotic MT evolution. (6) In all cases, the unaligned segments comprised the X-Cys-Cys-X motifs. Therefore, this structure may have appeared later than the primeval β X-Cys-X-Cys-X motif, and may have eventually led to the formation of α -like clusters, as seen in vertebrate MT.

Unrooted trees generated from the core sequences (Table 2) by three algorithms, PILEUP, Clustal W and four PAUP pair-wise comparisons, highlight two main features. First, *Drosophila* MTO and *S. cerevisiae* CUP1 MT always cluster independently of the rest of sequences. Second, *Drosophila* MTN and *S. cerevisiae* CRS5 belong to a same tree branch, which also comprises *N. crassa* and Class I MT (crustacean and mammalian MT). From these data, an early origin of the MT duplication, which would be later responsible for the bi-domain forms, could be traced already in monocellular eukaryotes. The separate clustering of the mono-domain *N. crassa* MT and MTN1 together with the bi-domainial forms in yeast (CRS5), crab and mouse MT suggested that this was the lineage which gave rise to the β - β and β - α forms.

4. Discussion

Drosophila MTN is the shortest MT reported among metazoa. For the present, all metazoan MT have shown up to two metal binding clusters, or at least a peptide length compatible with the folding of two independent chelating domains. The fact that monocellular eukaryotes contain both mono-domain MT, the fungal (*N. crassa*, *Agaricus*) and *S. cerevisiae* CUP1 proteins, and longer peptides able to form two or more clusters, as described for yeast CRS5 and *Tetrahymena* MT, points to an early origin of the domain duplication in the eukaryotic lineage. Surprisingly, *Drosophila* MTN and MTO amino acid sequences appear closer to *Ascomycota* than to its *Arthropoda* counterparts, i.e. crustacean MT. As for MTN the similarity can be extended to its metal binding features, it appears as an ancient form in MT evolution.

We have previously shown for mammalian β MT that preference for a given metal correlates with the degree of folding of the holo-protein recombinantly obtained from metal-supplemented cultures [35]. Data obtained in this study for recombinant Zn-MTN and Cu-MTN show the formation of a single, low oxidized Cu_8 -MTN species in the presence of copper, while a mixture of oxidized, poorly folded, Zn_3 - and Zn_4 -MTN aggregates in the presence of zinc. Furthermore, Zn/Cu in vitro replacement led to well-defined aggregates, fully comparable to those obtained in vivo. In contrast, in vitro Zn/Cd replacement enhanced the degree of folding of MTN, but it remained still far from that achieved in the presence of Cu(I). These data indicate that MTN binds monovalent metals much more efficiently than divalent ones. The ability of these metals to fold the MTN peptide is proportional to the level of *Mtn* mRNA that they induce in metal-fed flies: $\text{Cu} > \text{Cd} > \text{Zn}$ [17].

This is consistent with a fundamental role of MTN in copper gastric detoxification, also operative for cadmium protection, and otherwise, a poor contribution to zinc metabolism, which would be mainly contributed by MTO, as suggested before [18].

The stoichiometry of the in vivo-synthesized and in vitro-replaced Cu-, Zn- and Cd-MTN species revealed further details about the metal binding features of MTN. Spectroscopic and ESI-MS data indicated a unique, well-defined Cu_8 -MTN cluster; however, a minor Cu_7 -MTN species was also detected by ESI-MS in samples submitted to harsh conditions. The copper binding stoichiometry of MT is controversial. Several Cu(I) species have been reported for *N. crassa* MT [10,36], *S. cerevisiae* CUP1 [31,32,37–41] and mammalian β domain [24,35,42,43], depending on synthesis, preparation conditions and detection procedures. Differently coordinated Cu(I) ions, some in compact clusters, some in external regions, and an extreme flexibility of the thionein chain to rearrange the thiol-Cu(I) bonds would account for this heterogeneity.

The superimposition of the CD spectrum of the Cu-MTN species obtained by Zn/Cu replacement with those of the recombinant mouse Cu_6 - β MT and Cu_7 - β MT species [24] (Fig. 3) gives information on the stereochemistry of the Cu-MTN aggregate. On the one hand, the CD spectrum of Cu-MTN and Cu_6 - β MT resembles in shape, with minor variations in the position and intensity of some bands. On the other hand, the bands at 280–400 nm corresponding to Cu-MTN are almost equal but of opposite sign to those observed for the Cu_7 - β MT species. The first resemblance suggests that Cu_8 -MTN and Cu_6 - β MT fold similarly and allows the assumption that both contain the same $\text{Cu}^1(\text{S}_{\text{Cys}})_3$ chromophores. The coincident band of Cu_8 -MTN and Cu_7 - β MT at ca. 340 nm is indicative of the presence of additional digonal $\text{Cu}^1(\text{S}_{\text{Cys}})_2$ units in Cu_8 -MTN. The opposite sign of the CD bands at ca. 340 nm can be explained by inverse folding of the peptide chains around these chromophores. The presence of digonal $\text{Cu}^1(\text{S}_{\text{Cys}})_2$ units is sensible taking into account that 10 S_{Cys} cannot trigonally coordinate eight Cu(I) ions.

Regarding divalent metals, a Zn_3 - and Zn_4 -MTN mixture was obtained. These stoichiometries match those found for the Zn- β MT and Zn-CUP1 native species, respectively [21,37,42]. In the case of MTN, the Zn/Cd replacement increased the degree of organization of the cluster, although the mixture of species (Cd_3 - and Cd_4 -MTN) was maintained. Analogous results were found for the Zn/Cd replacement in the β -C5H mouse MT site-directed-mutant, where substitution of Cys by His resulted in a modified β MT peptide with decreased binding capacity for Zn and Cd [44]. Thus, the coexistence of two species, even after Zn/Cd replacement, seems to be indicative of non-optimized forms for coordination of divalent ions.

Protein sequence comparisons (Table 2) define a primeval MT core, with strong similarities to the extant mono-domain fungal copper-thioneins. According to this alignment, *Drosophila* MTN should behave as a conventional copper-thionein, which is precisely what our results strongly suggest: a resemblance between *Drosophila* MTN and yeast CUP1. Both share 10 coordinating Cys and a clear preference for monovalent ions, Cu(I), with a major stoichiometry of eight Cu(I) and a less efficient capacity to bind divalent metals.

MT core sequences aligned with the N-terminal domain of Class I, namely β domain, thus identifying the ancient copper-

thioneins as β -like peptides. The reported X-Cys-X-Cys-X β domain signature is located at the core, while all Cys-Cys stretches remain outside, in agreement with their previous consideration as α peptide motifs. The position of the Cys-Cys pairs differs in each MT, consistently with changes associated with an emergent trait. Moreover, in yeast CUP1, the C-terminal Cys doublet does not contribute to the Cu(I)- and Ag(I)-aggregates [31,32], thus these Cys-Cys doublets may not yet have acquired their coordinating capacity. From our alignment, we suggest 'C-X-C-X₅₋₈-C-X₁₋₂-C-X₂₋₃-C-X-C.' as the consensus sequence for the β -like MT domain, which extends 'the central MT segment' -CxCxxxCx- previously defined [12]. In all trees, *Drosophila* MTN clusters with yeast CRS5, whereas *Drosophila* MTO appears close to the well-characterized CUP1 yeast protein. This could be interpreted as first, an early divergence of the MT lineages in metazoa, and second, a higher association of MTN and SRC5 to the fungal/mammalian line. Finally, it highlights the need to define orthology/paralogy relationships, in order to avoid misleading comparisons. Full genome data should contribute to this end.

The identification of *Drosophila* MTN as the only metazoan MT representative of the primeval copper binding β MT domains is the first step of the knowledge of its coordination abilities. The comparative analysis of the three-dimensional structure of the Cu(I)-MTN and CUP1 metal clusters should be relevant. Moreover, the two additional Cys present in MTO when compared to MTN could be related to a putative increase in the metal binding capacity, the fact that these two terminal Cys form an α conventional array support this view. Longer MT-like proteins, as yet unknown, cannot be ruled out. If found, they would be representatives of the widely described two-domain metazoan MT. Finally, why ancient MT forms have been preserved in *Drosophila* is still an open question.

Acknowledgements This work was supported by the projects PB96-0225 and PB97-0216 and UE98-0014 from the Spanish Ministerio de Educacion y Cultura. M V and R B are indebted to the Comissionat per a Universitats i Recerca de la Generalitat de Catalunya (CIRIT) for a pre-doctoral scholarship. We acknowledge the Serveis Científico-Tècnics, Universitat de Barcelona (DNA sequencing, ICP-AES and ESI-MS) and the Servei d'Anàlisi Química, Universitat Autònoma de Barcelona (AAS, CD, UV) for allocating instrument time. Finally, we thank R. Rycroft for revising the English language of this manuscript.

References

- [1] Kāgi, J H R (1993) in *Metallothionein III Biological Roles and Implications* (Suzuki, K T, Imura, N and Kimura, M, Eds), pp 29–55, Birkhauser Verlag, Basel.
- [2] Fisher, E H and Davie, E W (1998) *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 3333–3334.
- [3] Palmeter, R D (1998) *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 8428–8430.
- [4] Jiang, L-J, Maret, W and Vallee, B L (1998) *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 9146–9149.
- [5] Jacob, C, Maret, W and Vallee, B L (1999) *Proc Natl Acad Sci USA* 96, 1910–1914.
- [6] Margoshes, M and Vallee, B L (1957) *J Am Chem Soc* 79, 4813–4814.
- [7] Otvos, J D and Armitage, I M (1980) *Proc Natl Acad Sci USA* 77, 7094–7098.
- [8] Robbins, A H, McRee, D E, Williamson, M, Collett, S A, Young, N H, Furey, W F, Wang, B C and Stout, C D (1991) *J Mol Biol* 221, 1269–1293.
- [9] Narula, S S, Brouwer, M Hua, Y and Armitage, I A (1995) *Biochemistry* 34, 620–631.
- [10] Malikayil, J A, Lerch, K and Armitage, I A (1989) *Biochemistry* 28, 2991.
- [11] Narula, S S, Winge, D R and Armitage, I M (1993) *Biochemistry* 32, 6773–6778.
- [12] Nemer, M, Wilkinson, D G, Travaglini, E C, Sternberg, E J and Butt, T R (1985) *Proc Natl Acad Sci USA* 82, 4994.
- [13] Latowski-Perry, D, Otto, E and Maroni, G (1985) *J Biol Chem* 260, 1527–1530.
- [14] Theodore, L, Ho, A and Maroni, G (1991) *Genet Res* 58, 203–210.
- [15] Mokdad, R, Debec, A and Wegnez, M (1987) *Proc Natl Acad Sci USA* 84, 2658–2662.
- [16] Maroni, G, Wise, J, Young, J E and Otto, E (1987) *Genetics* 117, 739–744.
- [17] Durliat, M, Bonneton, F, Boissonneau, E, Andre, M and Wegnez, M (1995) *Biomaterials* 8, 339–351.
- [18] Silar, P, Theodore, L, Mokdad, R, Errass, N, Cadic, A and Wegnez, M (1990) *J Mol Biol* 215, 217–224.
- [19] Silar, P and Wegnez, M (1990) *FEBS Lett* 269, 273–276.
- [20] Studier, F W and Moffatt, B A (1986) *J Mol Biol* 189, 113–130.
- [21] Capdevila, M, Cols, N, Romero-Isart, N, Gonzalez-Duarte, R, Atrian, S and Gonzalez-Duarte, P (1997) *CMLS* 53, 681–688.
- [22] Birchmeier, W and Christen, P (1971) *FEBS Lett* 18, 208–213.
- [23] Winge, D R (1991) in *Methods in Enzymology* (Riordan, J F and Vallee, B L, Eds), v 205, pp 458–469, Academic Press, San Diego, CA.
- [24] Bofill, R, Palacios, O, Capdevila, M, Cols, N, Gonzalez-Duarte, R, Atrian, S and Gonzalez-Duarte, P (1999) *J Inorg Biochem* 73, 57–64.
- [25] Fabris, D, Zaia, J, Hathout, Y and Fenselau, C (1996) *J Am Chem Soc* 118, 12242–12243.
- [26] Higgins, D G, Thompson, J D and Gibson, T J (1996) in *Methods in Enzymology* (Doolittle, R F, Ed), v 266, pp 383–400, Academic Press, San Diego, CA.
- [27] GCG (1994) Program manual for the Wisconsin Package version, v 10, Wisconsin Genetics Computer Group, Madison, WI.
- [28] INSIGHT (1997) V 97.0 Biosym/Molecular Simulations, San Diego, CA.
- [29] Norihuro, M and Hayashi, Y (1991) in *Methods in Enzymology* (Riordan, J F and Vallee, B L, Eds), v 205, pp 340–347, Academic Press, San Diego, CA.
- [30] Zaia, J, Fabris, D, Wei, D, Karpel, R L and Fenselau, C (1998) *Prot Sci* 7, 2398–2404.
- [31] Narula, S S, Winge, D R and Armitage, I M (1993) *Biochemistry* 32, 6773–6787.
- [32] Peterson, C W, Narula, S S and Armitage, I M (1996) *FEBS Lett* 379, 85–93.
- [33] Culotta, V C, Howard, W R and Liu, X F (1994) *J Biol Chem* 269, 25295–25302.
- [34] Jensen, L T, Howard, W R, Strain, J J, Winge, D R and Culotta, V C (1996) *J Biol Chem* 271, 18514–18519.
- [35] Cols, N, Romero-Isart, N, Bofill, R, Capdevila, M, Gonzalez-Duarte, P, Gonzalez-Duarte, R and Atrian, S (1999) *Prot Eng* 12, 265–269.
- [36] Lerch, K (1980) *Nature*, 368–370.
- [37] Winge, D R, Nielson, K B, Gray, W R and Hamer, J (1985) *J Biol Chem* 260, 14464–14470.
- [38] George, G N, Byrd, J and Winge, D R (1988) *J Biol Chem* 263, 8199–8203.
- [39] Sayers, Z, Brouillon, P, Vorgias, C E, Noltng, H F, Hermes, C and Koch, M H J (1993) *Eur J Biochem* 212, 521–528.
- [40] Sayers, Z, Brouillon, P, Svergun, D I, Zielenkiewicz, P and Koch, M H J (1999) *Eur J Biochem* 262, 858–865.
- [41] Weser, U and Hartmann, H (1988) *Biochim Biophys Acta* 953, 1–5.
- [42] Nielson, K B and Winge, D R (1985) *J Biol Chem* 260, 8698–8701.
- [43] George, G N, Winge, D, Stout, C D and Cramer, S P (1986) *J Inorg Biochem* 27, 213–220.
- [44] Romero-Isart, N, Cols, N, Termansen, M K, Gelpi, J-L, Gonzalez-Duarte, R, Atrian, S, Capdevila, M and Gonzalez-Duarte, P (1999) *Eur J Biochem* 259, 519–527.

Article 5

M. Valls, R. Bofill, R. González-Duarte, P. González-Duarte,
M. Capdevila, S. Atrian.

A New Insight into MT Classification and Evolution. The *in vivo* and *in vitro*
metal binding features of *Homarus americanus* recombinant MT.

Enviat a *J. Biol. Chem.*

A New Insight into MT Classification and Evolution.

The *in vivo* and *in vitro* metal binding features of *Homarus americanus* recombinant MT^{s,ss}.

Marc Valls*¹, Roger Bofill*², Roser González-Duarte¹, Pilar González-Duarte², Mercè Capdevila^{#2} and Sílvia Atrian¹.

¹ Departament de Genètica, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, 08028-Barcelona, Spain.

² Departament de Química, Facultat de Ciències, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193-Bellaterra, Barcelona, Spain

^s This work was supported by projects PB97-0216 and BIO2000-0910 from the Spanish Ministerio de Educación y Cultura, and UE contract BIO4-CT97-2123.

^{ss} The full cDNA sequence has been submitted to EMBL Nucleotide Sequence Database under accession number AJ401298.

* Both authors contributed equally to this work.

[#] To whom correspondence should be addressed at: Departament de Química, Facultat de Ciències, Universitat Autònoma de Barcelona, E-08193-Bellaterra, Barcelona, Spain. Tel.: +34.93.581.33.23; Fax.: +34.93.581.31.01; E-mail: Merce.Capdevila@uab.es.

Running title: A New Insight into MT Classification and Evolution.

Abbreviations

CD, circular dichroism; DTNB, 5,5'-dithiobis(nitrobenzoic acid); ESI-MS, electrospray ionization mass spectrometry; FPLC, fast performance liquid chromatography; ICP-AES, inductively coupled plasma-atomic emission spectroscopy; UV-Vis, ultraviolet-visible electronic absorption; MT, metallothionein; MTH, *Homarus americanus* metallothionein; MTN, *Drosophila melanogaster* metallothionein; PCR, polymerase chain reaction; RACE, rapid amplification of cDNA ends; $\beta\alpha$ MTH, the C-terminal domain of *Homarus americanus* metallothionein; $\beta\beta$ MTH, the N-terminal domain of *Homarus americanus* metallothionein.

ABSTRACT

We report the synthesis and characterization of a *Homarus americanus* MT-cDNA (MTH) through retrotranscription of MTH-mRNA from metal-injected lobsters. Heterologous *E.coli* expression in Zn- and Cu-supplemented media was achieved for MTH, the two domains $\beta\beta$ MTH and $\beta\alpha$ MTH and three site-directed mutants, $\beta\beta$ C9H, $\beta\alpha$ C37H and $\beta\alpha$ E31C/T34C. The *in vivo*-conformed metal complexes and the *in vitro*-substituted Cd aggregates were characterized. Major stoichiometries of M^{II}_6 -MTH for the entire MTH, and M^{II}_3 - $\beta\beta$ MTH and M^{II}_3 - $\beta\alpha$ MTH for the independent domains fully validated our expression system. A low affinity binding site for a seventh Zn(II) in the *in vivo*-synthesized MTH was located into the $\beta\alpha$ domain. Additionally, minor M^{II}_4 -species were found for each domain. Both single mutants exhibited a similar reduction of their *in vivo*-Zn binding ability, but differed in their Cd binding behavior when compared with the wild-type forms. Conversely, the double mutant showed an enhanced Zn and Cd binding capacity. *In vivo* synthesis of MTH and of its independent domains in the presence of copper only afforded heterometallic Cu,Zn species. These findings allow consideration of MTH as a Zn-thionein, and question the view of β - β MT crustacean structures as copper-thioneins. Furthermore, a new approach for the evolutionary and functional classification of MT is proposed, based on the stoichiometry of metal-MT species and molecular phylogenetic analysis.

Introduction

The metallothionein (MT) superfamily comprises a wide range of low molecular weight polypeptides, sharing the ability to chelate heavy-metal atoms (1). MT are present in all animal phyla, in most fungi and plants, and have been related to metal homeostasis and detoxification, although their definite physiological function is still a matter of debate (2, 3, 4, 5). To classify these extremely heterogeneous amino acid sequences, three different classes were proposed: Class I, comprising all the MT alignable to horse MT 1; Class II, including all the sequences with no clear homology to horse MT 1; and Class III for the phytochelatines, vegetal γ -glutamyl peptides of enzymatic origin (1). More recently, a new classification consisting of a singular set for each individual eukaryotic taxon has been proposed (<http://www.unizh.ch/~mtpage/classif.html>). Both systematizations are based on primary structure data but do not include any functional or evolutionary information.

Conventionally, terminology and standards corresponding to the canonical mammalian MT molecule have been extended to describe amino acid sequence and metal cluster features for new MT forms. Mammalian MT folds into a two-domain structure when coordinating divalent metal ions. The N-terminal segment (β domain), with 9 cysteines in Cys-X-Cys arrays, binds three M(II) ions, and the C-terminal segment (α domain), with 11 cysteines, some of which in Cys-Cys doublets binds four M(II) ions (6, 7). A higher binding affinity for monovalent (copper) than for divalent (zinc and cadmium) ions was described for the mammalian β domain, with an opposite trend for the α domain (8). Contemporary, *Saccharomyces cerevisiae* MT CUP1 was characterized. The synthesis of this protein was induced by copper and the MT recovered contained copper ions exclusively (9). As the CUP1 amino acid sequence aligned well to the β domain of mammalian MT, it was assumed that proteins with a primary structure alignable to the mammalian β domain would exhibit copper- rather than zinc-binding preferences. On the basis of their amino acid alignments, further application of the β/α domain terminology led to the consideration of crustacean peptides as β - β MT (10), and thus putative copper-thioneins. This was corroborated by the three divalent ions contained in each domain of the crustacean Cd-MT structures

resolved by NMR (11, 12) and thus comparable to the Cd₃-βMT fragment in mammalian MT.

A survey of the literature on naturally-occurring and metal-induced crustacean MT forms indicates that the established correlation between *crustacean MT* and *copper-thioneins* deserves further consideration. First, the high variety of metal-containing MT proteins identified in Crustacea after cadmium or copper treatment calls into question a unifying view of crustacean MT. Furthermore, the number of MT genes varies in the analyzed species -*Cancer pagurus* (13, 14), *Carcinus maenas* (15, 16), *Homarus americanus* (17, 18) and *Callinectes sapidus* (19, 20)-, ranging from one up to three MT encoding polypeptides, with substantially different metal affinities. This has recently been substantiated by the identification in *C.sapidus* of a Cu-specific MT, in addition to two Cd-inducible MT forms (21), according to a previous report in Mollusk (22). Second, characterization of the proteins induced in Crustacea by high copper and cadmium concentrations has yielded a wide range of metal stoichiometries. In species with only one apparent MT, cadmium rather than copper is the best inducer, and homometallic cadmium-MT aggregates are generally identified. If copper ions are present, usually mixed Cu, Cd forms are reported (13, 14, 15, 16, 17, 18). On the contrary, in *C.sapidus*, whose MT gene multiplicity is well-established (19, 20), cadmium and copper induce the different isoforms, yielding the corresponding homometallic aggregates.

In order to achieve a more comprehensive systematization of crustacean MT, new variables should be taken into account. If the physiological role of MT is related to the coordination of metal ions, their *in vivo* behavior with respect to zinc or copper should provide a more realistic approach, one which has rarely been considered probably due to the lack of homogeneity of MT samples prepared from metal-treated animals. However, recombinant synthesis of MT in metal-supplemented media and the subsequent characterization of the *in vivo*-conformed metal clusters has allowed us to characterize *Drosophila* MTN (23) and the mammalian independent β domain (24) as copper-thioneins, along with the entire mammalian and α domain as zinc-thioneins (25). This categorization is based on the *in vivo* metal binding preferences of these MT proteins.

As crustacean MT can be considered an inescapable keystone in the structure/function and evolution studies of MT polypeptides, we undertook the molecular characterization of *Homarus americanus* MT (MTH) and its *in vivo* Zn(II)- and Cu(I)-binding abilities by the previously-mentioned approach. The *in vivo*-conformed complexes, as well as those resulting from *in vitro* Zn/Cd replacement, have been characterized not only by the entire MTH, but also by its independent domains and three site-directed mutants. From the data gathered, MTH can be unambiguously considered as a zinc-thionein. Furthermore, the stoichiometries found combined with molecular phylogenetic analysis provide a new approach to the evolutionary history and classification of MT.

Materials and methods

Metallothionein gene induction and total hepatopancreas cDNA preparation

Homarus americanus (American lobster, 600 g) were provided by a local seafood breeder (Maresmar, Mercabarna, Barcelona). They were kept in 120 l tanks with flow-through seawater (salinity: 1.02-1.05 g/l NaCl, pH 7.5-8.3) at 15°C in the dark. The animals were injected between the exoskeleton plates of the dorsal thorax with a 21.5 G needle, with increased amounts of CdCl₂ in physiological saline, according to the following dosage: 0.5, 1.0, 2.0 and 4.0 mg metal kg⁻¹ wet weight on day 2, 7, 11 and 16, respectively. Animals were killed 24 h after the last injection, and the hepatopancreas was immediately removed, frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C.

RNA was purified from the hepatopancreas according to the guanidine isothiocyanate method (26). The poly(A)-rich fraction was prepared with the Poly(A)Tract mRNA Isolation System III kit (Promega) and used as template for cDNA synthesis. This was performed using the avian-myeloblastosis-virus reverse transcriptase (AMV-RT, Promega) and poly(dT) following the conventional assay (27).

Metallothionein cDNA synthesis and characterization

Homarus americanus MT-cDNA was obtained after a three-step synthesis, from total hepatopancreas cDNA. First, a central coding region was amplified by PCR, using two 17-mer degenerate oligonucleotides, MHOM1 and MHOM2 (Table 1, Figure 1A), deduced from the partial amino acid sequence reported for *Homarus* MT (18). Codons with a usage < 20% were disregarded to lower the degeneration degree (*Homarus* codon-bias data, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). The calculated T_m for the oligonucleotides was 45°C. The PCR reaction was carried out in a final volume of 25 µl containing 1.5 µl of total cDNA, 0.5 units of Taq DNA Polymerase (Dynazyme), 2 µM of the corresponding oligonucleotides, 20 µM dNTPs, and 2 mM MgCl₂. 35-cycle amplifications were performed at 94 °C/30 s, 40 °C/30 s and 72 °C/30 s. Amplified

samples were kept at 72 °C for 5 min before storage (4 °C). The DNA sequence of the MHOM1/MHOM2 PCR fragment agreed completely with the MT sequence and permitted the design of the non-degenerated HND2 oligonucleotide. In a second step, the cDNA was extended to its 3' end using HND2 (upstream) and poly(dT) (downstream) primers on total cDNA (Figure 1B). Finally, the 5' cDNA region was RACE-amplified with the Marathon-cDNA-Amplification kit (Clontech). To begin, 1 µg of total cDNA was ligated with 20 µmols of the adaptor segment in a 10 µl reaction. After ligation, distilled water was added up to 250 µl final volume. 5 µl of the diluted solution was used as template for a PCR amplification at 58 °C, with the AP1 (upstream, complementary to the kit adaptor) and the RACE2 (downstream, complementary to the cDNA 3' non-translated region) oligonucleotides (Figure 1C). A nested PCR amplification with primers AP2 (upstream, complementary to the kit adaptor) and RACE 1 (downstream, complementary to the triplets 2nd to 8th of the coding region) yielded the sequence of the 5' non-translated region and the first coding triplets.

All oligonucleotides were from Boehringer-Mannheim (Germany). Restriction enzymes were from Promega. Blunt-end ligations were performed with the SureClone ligation kit (Pharmacia). DNA was sequenced by an ABI 370 Automatic Sequencer and the Amersham Dye Terminator Cycle Sequencer Kit.

cDNA, protein sequence and structure comparisons.

cDNA alignment was performed using the *Pileup* utility enclosed in the GCG Package (v.10). Protein sequences were aligned by *ClustalW* (v1.75), using Blosum62 as distance matrix (28). The *ClustalW* alignments were the input to calculate protein distances through *Protdist*, and the corresponding phylogenetic trees were constructed using *Fitch*, which implements the Fitch-Margoliash tree-building algorithm (29). *Protdist* and *Fitch* are included in the *Phylip* software package (30). 3D Protein structures were visualized using the *Insight II* Package v.2000 (Byosim. Inc.). Software was supported by an Irix 64 v.6.4/Silicon Graphics Octane Workstation platform.

Cloning of the wild-type MT cDNA, its independent domains and site-directed mutants in an E.coli expression vector.

PCR amplification of the wild-type MT coding sequence was performed using total cDNA as template and the HND2(upstream)/ALFA2(downstream) primers (Figure 1D). Segments encoding the independent *Homarus* MT domains were obtained by PCR amplification with the primers HND2/BETA2 for the N-terminal domain (encompassing the residues 1 to 30, and hereafter referred to as $\beta\beta$), and ALFA1/ALFA2 for the C-terminal domain (encompassing the residues 31 to 62, and hereafter referred to as $\beta\alpha$). Site-directed mutants were constructed by mutagenic PCR (31): a one-step reaction for the single mutant C9H and the double mutant E31C/T34C, a two-step coupled reaction for the single mutant C37H. Primer combinations were: C9H/BETA2 for $\beta\beta$ C9H; [HC37/ALFA2]/ALFA1 for $\beta\alpha$ C37H; and E31CT34C/ALFA2 for $\beta\alpha$ E31C/T34C (Table 1). All PCR primers were designed to introduce a *Bam*HI restriction site immediately before the ATG initiation codon, and a *Sal*I restriction site immediately following a translation stop codon. PCR conditions were as described. The amplified products were isolated from 2% agarose gels, digested with *Bam*HI-*Sal*I, and directionally cloned in the corresponding sites of the pGEX4T-1 expression vector (Amersham Pharmacia) for all the constructions. Before recombinant protein synthesis, sequences were confirmed by automatic sequencing. JM105 was used as the recipient *E.coli* strain for cloning and sequencing purposes.

MT expression, analysis of the recombinant Zn- and Cu-peptides of the corresponding in vitro-substituted Cd clusters.

To over-express all the *Homarus* MT cDNAs obtained, the corresponding pGEX recombinant constructs were transformed into protease-deficient BL-21 *E.coli* cells. Small-scale cultures for analytical purposes (1.5 l) were carried out in Erlenmeyer flasks, while large-scale cultures were performed in fermentators (10 l: Microferm Fermentor (New Brunswick); 12 l and 30 l: Braun Biostat U (Braun Biotech)) which were coupled to a Westfalia CSA-1-06-475 centrifuge (6000 x g) controlled by a

TVE-OP 76/0 programmer. Transformant *E.coli* cells were grown in LB medium supplemented with 100 mg/ml ampicillin and 300 μM ZnCl_2 , 500 μM CuSO_4 or 150 μM ZnCl_2 plus 250 μM CuSO_4 , and induced with 100 μM IPTG (final concentration). Purification of the fusion proteins and recovery of the MT portion in 50 mM Tris-HCl (pH 7.0) was performed as previously described (32). Aliquots of the protein-containing FPLC fractions were separated by 15 % SDS-PAGE, and stained by Coomassie Blue. MT-containing samples were pooled and stored at -70°C for further analysis.

Inductively coupled plasma-atomic emission spectroscopy (ICP-AES), in a Thermo Jarrell Ash, Polyscan 61E, measuring S at 182.040 nm, Zn at 213.856 nm and Cu at 324.754 nm, was used to assess the amount of protein present in the different preparations and to determine the metal-to-protein ratios (33). The reaction with DTNB (5,5'-dithiobis(nitrobenzoic acid)) (34) allowed us to determine the percentage of thiol groups over total sulfur in our samples.

Titration of the *in vivo*-synthesized Zn-containing forms with Cd(II) at pH 7.0 were carried out according to the procedures described elsewhere (32) and followed by UV-Vis and Circular Dichroism (CD) spectroscopies. Electronic absorption measurements were performed on a HP-8452A Diode array UV-visible spectrophotometer (data available upon request). A Jasco Spectropolarimeter (J-715) interfaced to a computer (GRAMS/32 Software) was used for CD determinations.

Electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS) was used to assess the purity and the metal binding stoichiometry of all the *in vivo*-synthesized Zn- and Cu,Zn-containing forms and the *in vitro* Cd- and Cd,Zn-MTH species. ESI-MS spectra were performed on a Platform II (Micromass) equipped with the Max Lynx software, calibrated using horse heart myoglobin (0.1 mg/ml). Assay conditions were as follows. For the holo species obtained at pH 7 (*in vivo* Zn- and Cu,Zn-MTH and *in vitro* Cd- and Cd,Zn-MTH species), 10 μl of protein solution were injected at 20 $\mu\text{l}/\text{min}$; source temperature, 120-150 $^\circ\text{C}$; capillary counter electrode voltage, 4500 V; lens counter electrode voltage, 1000 V; cone potential, 30-45 V; m/z range, 750-1950; scanning rate, 2.0-3.2 s/scan; interscan delay, 0.2-0.4 s. The liquid carrier was a 95:5 mixture of 3mM ammonium formate / ammonia at pH 7 (eluent A) and methanol (eluent B). Masses for the holo-species were calculated according to the literature (35). The molecular masses

of the apo-species corresponding to the *in vivo* Zn-MTH species were determined as described above, except for the following conditions: source temperature, 60°C; capillary counter electrode voltage, 3500 V; lens counter electrode voltage, 500 V; cone potential, 40 V. The liquid carrier was a 50:50 mixture of acetonitrile and TFA 0.04% (pH 2.5). The molecular masses of the apo-proteins corresponding to the *in vivo* Cu,Zn-containing forms were determined as described for the apo-species corresponding to the *in vivo* Zn-MTH species, with the exception of the source temperature (90°C) and the liquid carrier (acetonitrile:TFA (0.07%) 50:50, pH 1.5). In order to avoid the masking effect of the buffer, a C4 column (5 cm long, i.d. 2.0 mm, 5 µm particle size) was coupled on line with the ESI source during the measurements carried out at pH 7.

Results

Isolation and characterization of the *Homarus* MT cDNA

The single 800 bp-band obtained from the PCR reaction on total hepatopancreas cDNA contained all the MTH coding sequence, except for the methionine initiation codon, and 595 bp corresponding to the MTH cDNA 3' non-translated region (Figure 1C, Table 1). Cloning and sequencing of the 78-bp AP2/RACE1 product, showed 27 bp of 5' non-translated segment and the first seven MT triplets. Assembling of this sequence with the previous HND2/poly(dT) fragment rendered the full length MTH cDNA (Figure 2). The nucleotide composition of the region immediately upstream to the ATG codon agrees with Kozack's rules of ribosome-binding site consensus sequences. In contrast to the short length of the 5' non-translated segment, the 3' non-translated region, expanding 595 bp before the polyadenylation site, is much longer than the corresponding regions of the mammalian and *Drosophila* MT genes and only comparable to that of the sea urchin gene (36). The polyadenylation signal (AATAAA) exactly follows the consensus pattern in eukaryotes. MTH cDNA full sequence has been submitted to EMBL Nucleotide Sequence Database and is available under accession number AJ401298. Screening of the GenEMBL Data Bases through BLASTN homology search using the *Homarus* MTH cDNA sequence as a query did not retrieve any significant match.

Analysis of the primary structure of *Homarus* MTH.

The deduced amino acid sequence of MTH (Figure 2) was compared to the native *Homarus* MT 1 partial protein sequence (18). From our data, residues 54 and 56 were lysine and proline, respectively, and the total length of mature MT, after methionine cleavage, was determined to be 57 residues, and not 58 as postulated before. *Homarus* MTH, like most of the crustacean MT, includes 18 cysteine residues, equally distributed between the two coordinative domains. *Carcinus* MT has an extra cysteine residue, which should be taken into account when analyzing the corresponding metal

chelating abilities (16, 17). The copper-specific MT of the blue crab *Callinectes sapidus* (20) is characterized by a higher number of cysteines (21), only 13 of which share a common distribution with other crustacean MT, already pointing to a distant evolutionary relationship with the non-copper MT of the same organism.

Multiple alignment analysis for all crustacean MT sequences available from GeneBank and EMBL has been performed. Two non-crustacean, well-characterized *in vivo* copper-thionein sequences, have been added: *Drosophila* MTN (23) and *Saccharomyces cerevisiae* CUP1 (9). *ClustalW* alignment and the corresponding Fitch tree are shown and compared with the taxonomic classification of the crustacean species included in the analysis (Figure 3), according to the NCBI Taxonomy classification (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Taxonomy>). The comparison of both distributions give rise to interesting concerns. First, in those species with duplicated MT -*Callinectes sapidus* (calli1 and calli2) and *Scylla serrata* (scy1 and scy2)-, isoform 1 and isoform 2 appear closer in sequence similarity than both isoforms of the same species. This fact is indicative of duplication events preceding genera differentiation in the *Brachyura/Portunoidae* group. Second, the *Callinectes sapidus* Cu-specific form appears closer to the yeast and fruit-fly copper-thioneins than to the other crustacean MT sequences, which gather in a non-copper-thionein cluster.

Recombinant synthesis of wild-type *Homarus* Zn-MT (Zn-MTH). Characterization of its *in vitro* Cd(II)-binding ability.

SDS-PAGE analysis (Figure 4, lane 1) of the Zn-MTH samples yielded homogeneous preparations at a concentration range of 10^{-4} - 10^{-5} M (0.5 mg/l of bacterial culture). ESI-MS measurements showed that synthesis of MTH in Zn-supplemented media led to the formation of two metalated species, a major Zn_6 -MTH and a minor Zn_7 -MTH form (Table 2). Chelex-100 treatment of this mixture (32) yielded a single Zn_6 -MTH species, according to ESI-MS results. The similarity of the CD spectra of the sample before and after Chelex treatment suggests that the seventh zinc ion is weakly bound to the Zn_6 -MTH aggregate. The integrity of the MTH protein was confirmed after acidification of Zn-MTH at pH 2.5, which yielded a single apo-form as indicated by the

molecular mass (Table 2). The high degree of folding for the biosynthesized Zn-MTH was evidenced by its high intensity CD spectrum (Figure 5, Table 3).

The cadmium binding ability of Zn-MTH was assessed by Zn/Cd replacement at pH 7, followed by the UV-Vis, CD and ESI-MS techniques (Figures 6A and 6B, Table 3). Results show that the *in vitro* formation of the Cd-MTH aggregates occurred in two stages. In the first, a Cd₄Zn₂-MTH intermediate was non-cooperatively formed. This species was detected by ESI-MS and characterized by its CD fingerprint (Table 3). In the second stage, from 4 to 6 Cd(II) equivalents added, a mixture of a major Cd₆-MTH and a minor Cd₆Zn₁-MTH species was obtained, according to ESI-MS data (Table 3). No significant spectroscopic changes were observed upon addition of increasing amounts of Cd(II). Only after 20 Cd(II) equivalents was the Zn atom in Cd₆Zn₁-MTH displaced to render a minor Cd₇-MTH species.

Recombinant synthesis of the independent Zn-MTH domains (Zn-ββMTH and Zn-βαMTH). Characterization of their *in vitro* Cd(II)-binding ability.

The SDS-PAGE of the purified Zn-ββMTH and Zn-βαMTH independent domains, obtained from the corresponding pGEX constructs, is shown in Figure 4, lanes 2 and 3 respectively. Analytical data showed that synthesis in Zn-supplemented media led to the formation of a unique Zn₁-ββMTH species, and to a mixture of a major Zn₁-βαMTH and a minor Zn₄-βαMTH species (Table 2), which evidenced a high good degree of folding in view of their CD spectra (Figure 5, Table 3). Acidification of the proteins containing solutions at pH 2.5 yielded the expected apo-forms (Table 2), thus confirming the integrity of the proteins.

Titration of Zn₁-ββMTH with Cd(II) at pH 7 indicated that *in vitro* formation of the Cd-fully loaded species occurred in two stages (Figures 6C and 6D). First, a Cd₂Zn₁-ββMTH intermediate was non-cooperatively formed, which was detected by ESI-MS and characterized by CD (Table 3). Second, after 3.5 Cd(II) equivalents added, this species evolved to an approximate equimolar mixture of Cd₁-ββMTH and Cd₄-ββMTH (Table 3). No changes were observed by further additions of Cd(II) within

the range 3.5 to 10 equivalents. According to the CD features (Table 3), the structure of the Cd-fully loaded recombinant $\beta\beta$ MTH species differs from that reported for the chemically synthesized peptide (37).

Conversely, *in vitro* formation of the Cd- $\beta\alpha$ MTH species occurred in a non-cooperative single stage after the addition of 3.5 Cd(II) equivalents (Figure 6E). ESI-MS measurements performed at this stage showed the presence of a major Cd₁- $\beta\alpha$ MTH and a minor Cd₃Zn₁- $\beta\alpha$ MTH species (Table 3). Further addition of Cd(II) caused a partial replacement of Zn(II) in Cd₃Zn₁- $\beta\alpha$ MTH, as indicated by the disappearance of the CD shoulder at 235.5 nm and by ESI-MS data, which showed the presence of a major Cd₁- $\beta\alpha$ MTH and minor Cd₃Zn₁- $\beta\alpha$ MTH and Cd₄- $\beta\alpha$ MTH species, even after 15 Cd(II) equivalents had been added.

Recombinant synthesis and characterization of Zn- $\beta\beta$ MTH and Zn- $\beta\alpha$ MTH site-directed mutants and analysis of their *in vitro* Cd(II)-binding ability.

The SDS-PAGE of the purified mutant domains (Zn- $\beta\beta$ C9H, Zn- $\beta\alpha$ C37H and Zn- $\beta\alpha$ E31C/T34C), obtained from the corresponding pGEX constructs, is shown in Figure 4, lanes 4 to 6, respectively. The integrity of these proteins was confirmed by the molecular mass of the corresponding apo-forms obtained by acidification at pH 2.5 (Table 2).

ESI-MS data indicated that the synthesis of $\beta\beta$ C9H and $\beta\alpha$ C37H in Zn-supplemented media occurred similarly, yielding a major Zn₃- and a minor Zn₂-species (Table 2). The addition of 4 Cd(II) equivalents led to a mixture of a major Cd₁- and a minor Cd₂-species in the case of $\beta\beta$ C9H, but to a single Cd₃-species for that of $\beta\alpha$ C37H (Table 3). In both cases, Zn/Cd replacement was accompanied by a significant increase in the chiral intensity of the CD bands (Figures 7A and 7B). Conversely, the synthesis of the $\beta\alpha$ E31C/T34C mutant in Zn-supplemented media yielded a major Zn₁- and a minor Zn₃-species (Table 2). Titration with Cd(II) was accompanied by a significant increase in the chiral intensity of the CD bands (Figures

7C and 7D) and resulted in a mixture of a major Cd₄- and a minor Cd₅-forms, according to ESI-MS data (Table 3).

Recombinant synthesis of *Homarus* Cu-MT forms.

Constructs corresponding to the entire MTH and both independent domains were expressed in Cu-supplemented media. Strikingly, all three forms were recovered as mixed Cu,Zn aggregates in the absence of supplemented Zn(II) in the culture media and using the same Cu concentration (500 μ M) that yielded homometallic Cu-MT species in mammalian β MT (24) and *Drosophila* MTN (23) recombinant synthesis.

For MTH, ICP-AES results rendered a metal content of 1.42 Cu/3.28 Zn per MT. For the independent domains, the corresponding values were 5.13 Cu/1.91 Zn per $\beta\beta$ MTH and 3.25 Cu/0.69 Zn per $\beta\alpha$ MTH proteins. All ratios were the mean of at least two independent syntheses and their corresponding ICP-AES determination. The fact that the synthesis of the entire MTH in copper-supplemented media unexpectedly showed a metal content higher for zinc than for copper, led us to undertake the recombinant synthesis of $\beta\beta$ MTH in a culture medium supplemented simultaneously with 50% zinc and 50% copper. ICP-AES results indicated a metal ratio of 6.22 Cu/0.43 Zn per $\beta\beta$ MTH; thus, the presence of zinc ions paradoxically increased the copper content of the recovered metal clusters.

Despite the synthesis of the Cu,Zn-MTH proteins proceeding correctly as shown by the ESI-MS data of the corresponding apo-forms at pH 1.5, determination of their molecular mass at pH 7 was not achieved, probably because of the presence of Cu(I) ions (38).

Discussion

We report the recombinant synthesis and the *in vivo* metal-binding abilities of wild-type and site-directed mutants of a crustacean MT (*Homarus americanus*, MTH). The recombinant synthesis has allowed the recovery of extremely pure MT preparations to follow the *in vivo* metal-binding behavior and to approach a functional understanding of these polypeptides. Synthesis of MTH in Zn-supplemented media and Cd(II) titration of the Zn-MTH complexes yielded a predominant stoichiometry of M^{II}_6 -MTH. This agrees well with the NMR structure of the *in vitro*-conformed ^{111}Cd -MTH cluster prepared from apo-MTH (11), with 6 Cd atoms in two different $\text{Cd}_3(\text{SCys})_9$ clusters. The two independent MTH domains, $\beta\beta$ and $\beta\alpha$, in Zn-enriched media yielded species with a major stoichiometry of 3 Zn(II), confirming that each segment exhibited the same metal-binding capacity, either alone or when linked together. However, comparison of the CD fingerprint of the entire Zn-MTH with that of the sum of Zn- $\beta\beta$ MTH and Zn- $\beta\alpha$ MTH revealed slight differences (Figure 5), which could be explained by a mutual interaction stronger than that reported for mammalian MT (39) between these metal aggregates. The crustacean interdomain region, with two non-charged residues, including a proline, would favor a closer and less flexible position of the domains than in mammalian MT. *In vitro* Zn/Cd replacement in MTH proceeded through a Cd_4Zn_2 -MTH intermediate, in good concordance with *Scylla serrata* MT (40) and the native mixed Cd,Zn-MT species from cadmium-treated Crustacea (15).

Beyond canonical stoichiometry, ESI-MS also revealed a minor Zn_7 -MTH form in the biosynthesized sample, and a minor Cd_6Zn_1 -MTH species from *in vitro* Zn/Cd replacement experiments. The finding of this additional binding site validates *in vitro* data previously reported for apo-MT of *Cancer pagurus* and reinforces the participation of donor atoms other than sulfur in metal coordination (e.g. nitrogen, oxygen) (41). The metal binding behavior of the $\beta\alpha$ MTH polypeptide -the *in vivo* Zn_4 - minor species together with the expected Zn_3 -form, and the Cd_3 - and Cd_3Zn_1 - $\beta\alpha$ MTH mixture obtained after Zn/Cd replacement- provided evidence that the $\beta\alpha$ domain is responsible for this additional binding site, as it mimics the metal binding behavior of the entire MTH. In contrast, Zn/Cd replacement on the unique recombinant Zn_3 - $\beta\beta$ MTH form gave rise to a 1:1 Cd_3 : Cd_4 mixture. Moreover, the lack of a Cd_7 -MTH species after

saturation of Zn-MTH with Cd(II) would be in agreement with the participation of the C-terminal end of the $\beta\beta$ domain in the binding of the fourth Cd(II) in Cd₄- $\beta\beta$ MTH, as this end is only unconstrained in the individual fragment.

Although the *in vivo* Zn-binding capacity of the two single site-directed mutants($\beta\beta$ C9H and $\beta\alpha$ C37H) was restrained similarly when compared to the wild-type forms (Table 2), Zn/Cd replacement proceeded differently. The heterologous expression of $\beta\alpha$ C37H in the presence of Zn(II) rendered a mixture of a major Zn₃- and a minor Zn₂-species (Table 2), which yielded a unique final Cd₁-cluster of similar folding to the wild-type domain (Figures 6E and 7B, Table 3). This behavior fully coincides with that of the homologous Cys41His mutation on the α domain of mouse MT (42). Conversely, when Cd(II) titrations of the Zn- $\beta\beta$ C9H mutant (Figures 6C-D and 7A, Table 3) were compared with the wild-type $\beta\beta$ MTH, different foldings were observed, in support of the relevant role of Cys9 in the formation of the Cd-SCys cluster. Furthermore, the mixture of major Zn₃- and a minor Zn₂-species obtained *in vivo* also yielded a mixture of Cd₁- and Cd₂-species after Zn/Cd replacement. Comparable results were observed for the Cys13His mutation on the β domain of mouse MT (42).

The double mutant $\beta\alpha$ E31C/T34C was designed with the purpose of emulating the Cys-Cys tandem of vertebrate α MT domains. With respect to the wild-type form it showed increased *in vivo*-Zn(II) and *in vitro*-Cd(II) binding capacities (Tables 2 and 3), both imputable to the higher number of Cys residues. However, the CD spectral envelope of the Cd-fully loaded $\beta\alpha$ E31C/T34C species resembled more that of the wild-type peptide (Figures 6E and 7D, Table 3) than the mammalian Cd₄- α MT species. Therefore, the generation of Cys-Cys arrays in a crustacean $\beta\alpha$ MTH domain enhanced its binding capacity, but failed to emulate the folding of the mammalian α MT domain with respect to divalent ions. These observations support the contribution of additional factors other than the number of Cys in the folding and chelating abilities of the MT polypeptides.

Concerning the complexes formed by the entire MTH protein and its independent domains in copper-supplemented media, mixed Cu,Zn aggregates were invariably recovered, probably due to the inability of MTH to form homometallic copper complexes. Additionally, the Cu,Zn-MTH complex showed reduced metal

content when considering the theoretical maximum load. In general, MTH exhibits a copper chelating behavior comparable to that which we have recently described for mammalian MT 1 (25). Also, as for mammalian MT, the essential role of zinc reinforces the hypothesis of MTH being primarily synthesized inside the cell as a Zn-complex, from which zinc could be partially or totally replaced. This would explain why native crustacean MT always contains zinc ions even when induced by other metals (15). The strict requirement of stabilizing zinc ions in copper clusters is consistent with our observations that the copper content of Cu,Zn- $\beta\beta$ MTH is higher when zinc, as well as copper, is present in the culture medium, and also with the reported extreme susceptibility to oxidation of copper-treated *C.maenas* MT (16). The poor response of MTH to copper-rich physiological environments could be overcome by the presence of another copper-specific form, as has been found in *C.sapidus* (21). The zinc-thionein would then be released from the selective pressure of efficient copper binding. Conversely, in mammals no copper-thioneins have been described up to now.

Overall, all the metal binding features have led us to assume that MTH is a zinc-thionein, made of two individual zinc-thionein domains with identical capacity (3 divalent ions) but different metal binding behavior. Also based on our data, the N-terminal segment ($\beta\beta$) would have been more conserved, whereas the C-terminal fragment ($\beta\alpha$) would be much more adaptable, with full correspondence with the mammalian MT domains. This is supported by the following observations: a) a higher *in vivo* copper-binding ability of $\beta\beta$ MTH than that of $\beta\alpha$ MTH, b) the comparable behavior of the crustacean and mammalian individual mutant domains, and c) the capacity of MTH C-terminal domain to yield a minor Zn₄-species *in vivo*. The different Cd(II) connectivities reported for the C-terminal domains of *Callinectes 1* and *Homarus* MT (11, 12), despite sharing the same number and position of cysteine residues, also supports the predicted flexibility of the crustacean $\beta\alpha$ MT domain.

Growing evidence points to two old MT lineages –copper-thioneins vs. zinc-thioneins– already present in the early stages of eukaryotic evolution. Classification of MT would then be better drawn if considering structure/function relationships than based on the limited sequence alignments of this highly heterogeneous protein family. The phylogenetic analysis of *Arthropoda* MT, which includes two non-crustacean copper-thioneins (Figure 3), clearly shows that the *in*

vivo-metal preferences of a MT peptide could be inferred from the protein sequence patterns. By this approach, the crustacean zinc-thioneins cluster together and separate from the crustacean copper-thionein group, which gathers with yeast CUP1 and *Drosophila* MTN, a new *Arthropoda* copper-thionein we have recently characterized (23). The active copper metabolism, which *Arthropoda* require to meet the demands of Cu-containing oxygen-transporters (hemocyanins), would provide a selective pressure for these specific copper-thioneins, while no physiological function has yet been assigned to any *Arthropoda* zinc-thionein. It is tempting to propose that the information for metal preference of a given MT is enclosed in its amino acid sequence. Nevertheless, the low degree of sequence similarity amongst the reported copper-thioneins suggests that this set of instructions is not restricted to the position and number of Cys residues alone, but is also shared by the other non-coordinating residues. The total number of cysteines and polypeptide length would only be a relevant factor for determining the number of metal clusters and metal ions each cluster embraces. In order to validate the classification of MT other than *Arthropoda* as zinc-thioneins or copper-thioneins using this molecular phylogenetic approach, more MT would have to be considered. The recombinant expression assays have allowed us to establish the *in vivo*-chelating preferences of several MT peptides (23, 24, 25, 32, 39, 42). This approach could be extended to provide the bases for the evolutionary analysis of this complex protein superfamily.

Acknowledgements

M.V. and R.B. are indebted to the *Comissionat per a Universitats i Recerca* of the *Generalitat de Catalunya* (CIRIT) for pre-doctoral scholarships. We acknowledge the *Serveis Científico-Tècnics, Universitat de Barcelona* (DNA sequencing, ICP-AES, ESI-MS) and the *Servei d'Anàlisi Química, Universitat Autònoma de Barcelona* (AAS, CD, UV-Vis) for allocating instrument time. We also thank MARESMAR for kindly providing *Homarus americanus* specimens, and A. Leiva and O. Palacios for research assistance.

References

1. Kägi, J. H. R. (1993) in *Metallothionein III Biological Roles and Implications* (Suzuki, K. T., Imura, N., and Kimura, M., Eds.) pp 29-55, Birkhäuser Verlag, Basel.
2. Fisher, E. H., and Davie, E. W. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 3333-3334.
3. Palmiter, R. D. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 8428-8430.
4. Jiang, L.-J., Maret, W., and Vallee, B. L. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 9146-9149.
5. Jacob, C., Maret, W., and Vallee, B. L. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 1910-1914.
6. Otvos, J. D., and Armitage, I. M. (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77, 7094-7098.
7. Robbins, A. H., McRee, D. E., Williamson, M., Collett, S. A., Xoung, N. H., Furey, W. F., Wang, B. C., and Stout, C. D. (1991) *J. Mol. Biol.* 221, 1269-1293.
8. Nielson, K. B., and Winge, D. R. (1985) *J. Biol. Chem.* 260, 8698-8701.
9. Winge, D. R., Nielson, K. B., Gray, W.R., and Hamer D.H. (1985) *J. Biol. Chem.* 260, 14464-14470.
10. Nemer, M., Wilkinson, D. G., Travaglini, E. C., Sternberg, E. J., and Butt, T. R. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 4992-4994.
11. Zhu, Z., DeRose, R. F., Mullen, G. P., Petering, D. H., and Shaw III, C. F. (1994) *Biochemistry* 33, 8858-8865.
12. Narula, S. S., Brouwer, M., Hua, Y., and Armitage, I. M. (1995) *Biochemistry* 34, 620-631.
13. Overnell, J., and Trehwella, E. (1979) *Comp. Biochem. Physiol. C* 64, 69-76.
14. Overnell, J. (1982) *Comp. Biochem. Physiol. B* 73, 555-564.
15. Pedersen, K. L., Pedersen, S. N., Højrup, P., Andersen, J. S., Roepstorff, P., Knudsen, J., and Deplege, M. H. (1994) *Biochem. J.* 297, 609-614.
16. Pedersen, S. N., Pedersen, K. L., Højrup, P., Knudsen, J., and Deplege, M. H. (1998) *Comp. Biochem. Physiol. C* 120, 251-259.
17. Brouwer, M.; Winge, D. R., and Gray, W. R. (1989) *J. Inorg. Biochem.* 35, 289-303.
18. Chou, C. L., Guy, R. D., and Uthe, J. F. (1991) *Sci. Total Environm.* 105, 41-59.

-
19. Brouwer, M., Schlenk, D., Huffman-Ringwood, A., and Hoexum-Brouwer, T. (1992) *Arch. Biochem. Biophys.* 294, 461-468.
 20. Brouwer, M., Enghild, J., Hoexum-Brouwer, T., Thogersen, I., and Truncali, A. (1995) *Biochem. J.* 311, 617-622.
 21. Syring, R. A., Hoexum-Brouwer, T., and Brouwer, M. (2000) *Comp. Biochem. Physiol. C* 125, 325-332.
 22. Dallinger, R., Berger, B., Hunziker, P., and Kägi, J. H. R. (1997) *Nature* 388, 237-238.
 23. Valls, M., Bofill, R., Romero-Isart, N., González-Duarte, R., Abián, J., Carrascal, M., González-Duarte, P., Capdevila, M., and Atrian, S. (2000) *FEBS Lett.* 467, 189-194.
 24. Cols, N., Romero-Isart, N., Bofill, R., Capdevila, M., González-Duarte, P., González-Duarte, R., and Atrian, S. (1999) *Protein Engng.* 12, 265-269.
 25. Bofill, R., Capdevila, M., Cols, N., Atrian, S., and González-Duarte, P. (2001) *J. Biol. Inorg. Chem.*, in press.
 26. Chirgwin, J. M., Przybyla, A. E., MacDonald, R. J., and Rutter, W. J. (1979) *Biochemistry* 18, 5294-5299.
 27. Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, U.S.A.
 28. Thompson, J. D., Higgins, D. G., and Gibson, T. J. (1994) *Nucleic Ac. Res.* 22, 4673-4680.
 29. Fitch, W. M., and Margoliash, E. (1967) *Science* 155, 279-284.
 30. Felsenstein, J. (1989) *Cladistics* 5, 164-166.
 31. Landt, O., Grunert, H. P., and Hahn, U. (1990) *Gene* 96, 125-128.
 32. Capdevila, M., Cols, N., Romero-Isart, N., González-Duarte, R., Atrian, S., and González-Duarte, P. (1997) *Cell. Mol. Life Sci.* 53, 681-688.
 33. Bongers, J., Walton, C. D., Richardson, D. E., and Bell, J. U. (1988) *Anal. Chem.* 60, 2683-2686.
 34. Birchmeier, W., and Christen, P. (1971) *FEBS Lett.* 18, 208-213.
 35. Fabris, D., Zaia, J., Hathout, Y., and Fenselau, C. (1996) *J. Am. Chem. Soc.* 118, 12242-12243.

-
36. Harlow, P., Watkins, E., Thornton, R. D., and Nemer, M. (1989) *Mol. Cel. Biol.* 9, 5445-5455.
 37. Muñoz, A., Petering, D. H., and Shaw III, C. F. (2000) *Inorg. Chem.* 39, 6114-6123.
 38. Zaia, J., Fabris, D., Wei, D., Karpel, R. L., and Fenselau, C. (1996) *Protein Sci.* 7, 2398-2404.
 39. Cols, N., Romero-Isart, N., Capdevila, M., Oliva, B., González-Duarte, P., González-Duarte, R., and Atrian, S. (1997) *J. Inorg. Biochem.* 68, 157-166.
 40. Law, A. Y. C., Cherian, M. G., and Stillman, M.J. (1984) *Biochim. Biophys. Acta* 784, 53-61.
 41. Overnell, J., Good, M., and Vasák, M. (1988) *Eur. J. Biochem.* 172, 171-177.
 42. Romero-Isart, N., Cols, N., Termansen, J., Gelpí, J. Ll., González-Duarte, R., Atrian, S., Capdevila, M., and González-Duarte, P. (1999) *Eur. J. Biochem.* 259, 519-527.

Table 1. Sequence of the oligonucleotides used as primers for the cloning and mutagenic PCR amplifications schematized in Figure 1.

Degenerate oligonucleotides

MHOM1: 5' CCNGRYCCNTGYTG YAA 3'
MHOM2: 5' CANGTYTTNGC RCANTC 3'
MHOM3: 5' GARGGNRRRTGYAARRC 3'

cDNA synthesis oligonucleotides

HND2: 5' CCCGGATCCCCGGGTC CCGTTCGTAAA 3'
AP1: 5' CCATCCTAATACGACTCACTATAGGGC-3'
RACE2: 5' CACGCCTCCTGATCACTT 3'
AP2: 5' ACTCACTATAGGGCTCGAGCGGC 3'
RACE1: 5' CTTTACAACAGGGACCCG 3'

Site-directed mutagenesis oligonucleotides.

BETA2: 5' CGGCGCGT**CG**ACCTAACAGCGGCAGGA 3'
ALFA1: 5' CCCGGATCCGCTCCCTGTGAAAA 3'
ALFA2: 5' CGGCGCGT**CG**ACCTAGGGACAGCAC 3'
HC9H: 5' CCCGGATCCCCGGGTC CCGTGTGTAAGACAAG**CAC**GAGTGTGCC 3'
HC37H: 5' CCCTGTGAAAAGTGTACCTCCGGG**CACA**AGTGTCC 3'
HE31C/T34C: 5' CCCGGATCCGCTCCCTGTT**GT**AAGTGT**TG**CTCCGGG 3'

Mutagenic triplets are shown in bold. Sequences used to generate flanking restriction sites (*Bam*HI at 5' and *Sal*I at 3') are in italics.

Table 2. Molecular masses and zinc-to-protein ratios found for the wild-type MTH, its $\beta\beta$ and $\beta\alpha$ domains and their mutant forms.

Protein	Molecular mass			Zn/protein molar ratio ^d
	apo-protein ^a (Da)	Zn-protein ^b (Da)	calculated masses ^c (Da)	
MTH	6036.1 ± 3.3	6417.3 ± 0.7 (M)	6415.4	6
		6476.2 ± 0.3 (m)	6478.8	7
$\beta\beta$ domain	2914.9 ± 0.1	3104.9 ± 1.8	3103.6	3
$\beta\alpha$ domain	3281.6 ± 1.6	3474.6 ± 0.9 (M)	3474.0	3
		3536.6 ± 3.6 (m)	3537.3	4
$\beta\beta$ C9H mutant	2947.5 ± 0.5	3139.7 ± 1.0 (M)	3138.5	3
		3074.4 ± 0.8 (m)	3075.2	2
$\beta\alpha$ C37H mutant	3316.0 ± 0.9	3503.8 ± 0.6 (M)	3508.0	3
		3441.9 ± 0.3 (m)	3444.6	2
$\beta\alpha$ E31C/T34C mutant	3256.9 ± 1.5	3513.7 ± 0.9 (M)	3513.4	4
		3450.0 ± 1.6 (m)	3450.0	3

^a Experimental molecular masses of the apo-proteins. Calculated masses based on the polypeptide sequence are 6035.1 (MTH), 2913.5 ($\beta\beta$ MTH), 3283.8 ($\beta\alpha$ MTH), 2948.4 ($\beta\beta$ C9HMTH), 3317.8 ($\beta\alpha$ C37HMTH) and 3259.9 ($\beta\alpha$ E31C/T34CMTH).

^b Experimental molecular masses of the Zn-protein complexes. (M) denotes major species and (m) denotes minor species.

^c Calculated masses for neutral species with loss of two protons per zinc bound (35).

^d Zinc per protein molar ratio calculated from the mass difference between holo- and apo-form.

Table 3. Molecular masses found for the Cd- and Cd,Zn-containing species obtained during the titration of the Zn-containing form of wild-type MTH, its $\beta\beta$ and $\beta\alpha$ domains and their mutant forms with Cd(II) at pH 7. The CD features of all of the species have also been included.

Protein	Zn-containing initial species		Cd- and Cd,Zn-containing final species				
	Stoichiometry ^a	CD features (nm) ^b	Cd(II) added	MW ^c (Da)	Stoichiometry ^a	calculated masses (Da) ^d	CD features (nm) ^b
MTH	Zn ₆ -MTH (M)	(+) 238	4	6604.8 ± 4.5	Cd ₄ Zn ₂ -MTH	6603.5	(+) 234, (+) 259
	Zn ₇ -MTH (m)				Cd ₆ -MTH (M)	6697.6	(+) 235, (-) 246, (+) 261.5
					Cd ₆ Zn ₁ -MTH (m)	6761.0	
$\beta\beta$ domain	Zn ₃ - $\beta\beta$ MTH	(+) 235	3.5	3199.5 ± 2.8	Cd ₂ Zn ₁ - $\beta\beta$ MTH	3197.7	(+) 221, (+) 262, (-) 246
					Cd ₃ - $\beta\beta$ MTH	3244.7	(+) 220, (-) 237.5, (+) 265
$\beta\alpha$ domain	Zn ₃ - $\beta\alpha$ MTH (M)	(+) 233	3.5	3612.8 ± 0.4	Cd ₃ - $\beta\alpha$ MTH (M)	3615.1	(+) 255.5
	Zn ₄ - $\beta\alpha$ MTH (m)				Cd ₃ Zn ₁ - $\beta\alpha$ MTH (m)	3678.4	
$\beta\beta$ C9H mutant	Zn ₃ - $\beta\beta$ C9H (M)	(+) 238	4	3279.8 ± 0.2	Cd ₃ - $\beta\beta$ C9H (M)	3279.6	(+) 238
	Zn ₂ - $\beta\beta$ C9H (m)				Cd ₂ - $\beta\beta$ C9H (m)	3169.2	(+) 270
$\beta\alpha$ C37H mutant	Zn ₃ - $\beta\alpha$ C37H (M)	(+) 242.5	4	3648.7 ± 0.6	Cd ₃ - $\beta\alpha$ C37H	3649.1	(+) 255.5
	Zn ₂ - $\beta\alpha$ C37H (m)						
$\beta\alpha$ E31C/T34C mutant	Zn ₄ - $\beta\alpha$ E31C/T34C (M)	(+) 245	5	3701.0 ± 0.2	Cd ₄ - $\beta\alpha$ E31C (M)	3701.5	(+) 263
	Zn ₃ - $\beta\alpha$ E31C/T34C (m)				Cd ₅ - $\beta\alpha$ E31C (m)	3811.9	

^a Metal per protein molar ratio found by ESI-MS. (M) denotes major species and (m) denotes minor species.

^b Position of Cotton maxima.

^c Experimental molecular masses of the Cd- and Cd,Zn-protein complexes.

^d Calculated masses for neutral species with loss of two protons per zinc and cadmium bound (35).

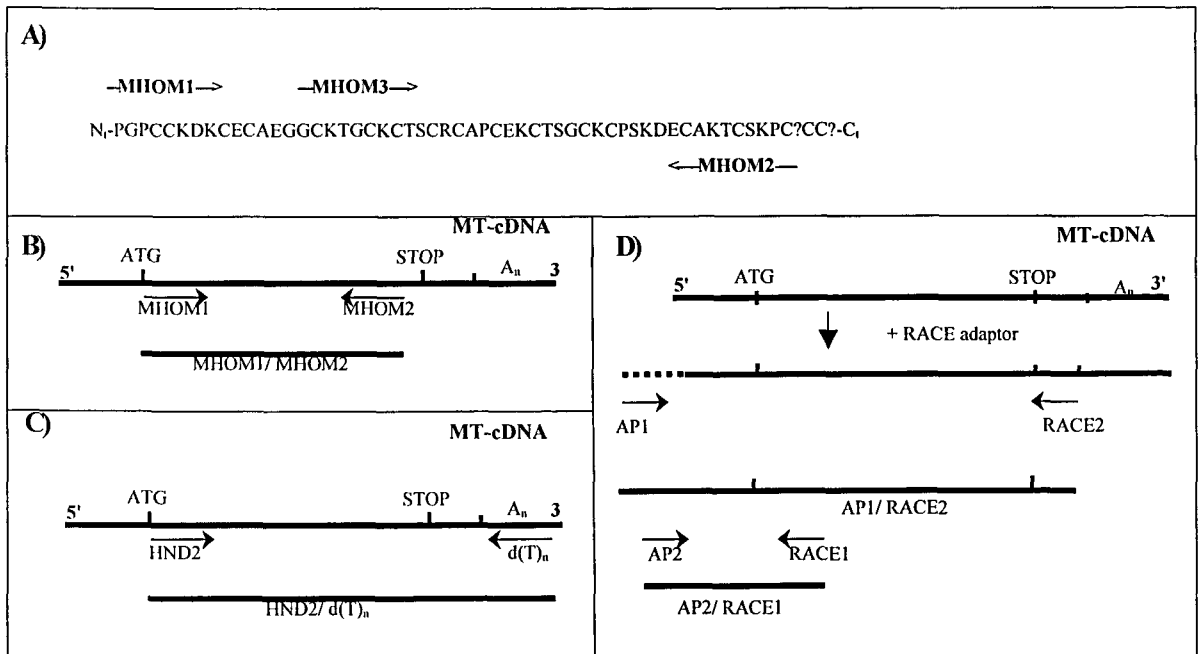


Figure 1. Schematic representation of PCR amplifications leading to *Homarus* MT cDNA sequencing, cloning and mutagenesis. A) Partial amino acid sequence reported by Brouwer *et al.* (ref. 17) and the peptide fragment used to design the degenerate primers MHOM_x. B) to D) PCR reactions performed to determine the full sequence of the *Homarus* cDNA encoding for the metallothionein (MTH). The sequences of the PCR primers are indicated in Table 1.

-27 CACATAAACCACATCAGTATCTTCACCATGCCGGGTCCCTGTTGTAAAGACAAGTGC
MetProGlyProCysCysLysAspLysCys

31 GAGTGTGCCGAGGGCGGGTGTAAAGACGGGGTGTAAAGTGCACATCCTGCCGCTGTGCTCCC
GluCysAlaGluGlyGlyCysLysThrGlyCysLysCysThrSerCysArgCysAlaPro

91 TGTGAAAAGTGTACCTCCGGGTGCAAGTGTCCATCCAAGGATGAGTGCGCCAAGACCTGC
CysGluLysCysThrSerGlyCysLysCysProSerLysAspGluCysAlaLysThrCys

151 TCCAAGCCTTGCAAGTGTGTCCCTAGACCCCTTCCACACTACCAGGGGACAGGGGCGAT
SerLysProCysLysCysCysProEnd

211 GACTAACTCTTAAGTGATCAGGAGGCGTGTAAGAGGAAGAATTGGGAAAGACATAACCA

271 AAGATGGATCCTTGAAGACGCCTTACCAGGGACCAAATTCATGGGACGGGGGGAGGGA

331 AGGGGGTAGAGCAGTGGTTCTCAACCTTGTGTTGCCCCATGCACCCCTTTCACCATATGT

391 CAGAATGTCATTCCCCCCTCTTCCAAAGATTGTCTGCCTCAAAAAGTGCATTCCAAATA

451 ATATGCATATAATACTAAAAATCCTTTATTTTTTCCATATTAGTATCAGTTTCCCCCCCC

511 CCTCCCCCCTGAAAACCTGAGGGGGGAAATCCGCCCTGGTTGAGAACCCTGGGGTA

571 GAGGAACTTTTCATGTGACCAAAGTTCATTAATTAGTCAGCTTATACGAAGTTACTGT

631 GTTTACATTCCACATTCAGTATTTTTGATTACTTGTCAATTTGACTAAATTATTTAGTTGT

691 AAGTTTGCCTTTGGCTGTTTTGTATTTCACCCAAAATATTTCAAGGTTTAATTATGCCA

751 TGAAAAATAAAAAATTAAGTTTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 797

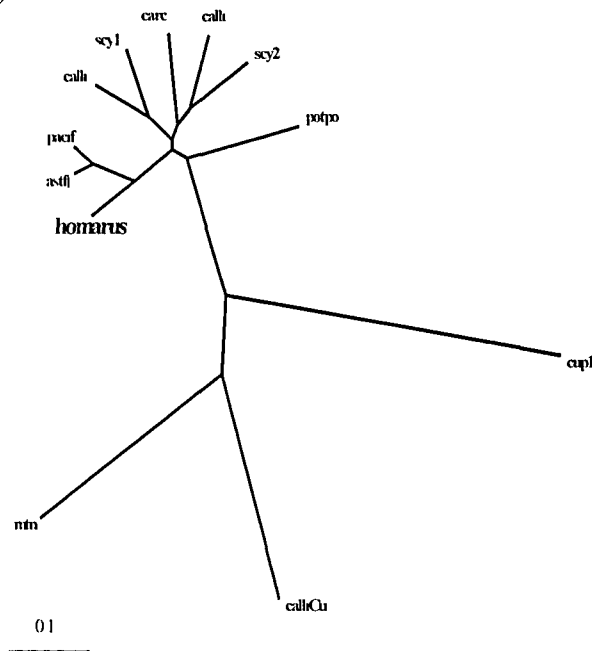
Figure 2. Sequence of the *Homarus* cDNA encoding for MTH. The consensus ribosome-binding and the polyadenylation sites are underlined. The deduced amino acid sequence is shown under the coding triplets. This sequence has been submitted to EMBL Nucleotide Sequence Database and is available under accession number AJ401298.

A)

```

MPCGCGTS--CKCGSGKCCCGSTCNCTTCCPSKQSCSCND-GACGSACQCKT--SCCGADCKCSPCPMK      calliCu
MPCPCGSG--CKCAS-QATKG-SCNCG-----SDCKCG--GDKKSACGCS---ECCA-----          mtn
-PDPCCND-KCECKEAGECKTG--CKCK-----SCRCPDCKCSSECKCTSKEECSKTSKPCSCCP--      calli2
-PDPCCND-KCCKEAGECKTG--CKCT-----SCRCPPEQCSSGCKCANKEDCRKTSKPCSCCP--      scy2
MPDPCCID-KCECKEGGCKAG--CKCT-----SCRCTPCEKCSSGCKCTTKEDCCKTCTKPCSCCP--    carci
-PGPCCND-KCVCQEGGCKAG--CQCT-----SCRCSPCQKCTSGCKCATKEECSKTCTKPCSCCPK-    calli1
-PGPCCND-KCVCKEGGCKEG--CQCT-----SCRCSPEKCSSGCKCANKEECSKTSKACSCCPT-      scy1
-PGPCCND-VCECAAGGCKTG--CVCT-----SCRCSPCDKCTSGCKCPSKEECAKTSKPCSCCP--    astfl
MPGPCCND-QCECAAGGCKTG--CVCT-----SRCQPCDKCTSGCKCPSKEECAKTSKPCRCPP--      pacif
-PGPCCND-KCECAEGGCKTG--CKCT-----SRCAPCEKCTSGCKCPSKDECAKTSKPCCKCP--      homarus
-PDPCCAEGTCECEEGKCKAG--CKCT-----SCRCSPEKCTSECECKSKEECAKNCTKPCSCCP--    potpo
----QNEGHECQCQCQGSCKNN--EQCQK-----SCSCTGCNSDDKPCGN-----KSEETKKSCCSGK    cup1
  
```

B)



C)

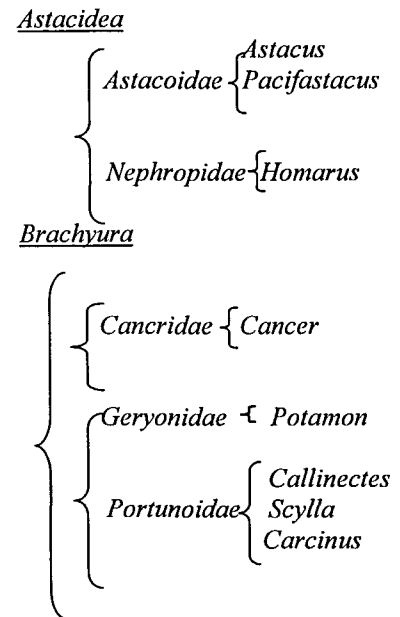


Figure 3. Phylogenetic analysis of Crustacean MT sequences. A) ClustalW alignment using the Blosum62 weight matrix for the multiple alignment construction. Sequences are: calliCu, the *Callinectes sapidus* copper-specific MT; calli1 and calli2, the other two *Callinectes sapidus* MT isoforms; scy1 and scy2, the two *Scylla serrata* MT isoforms; carci, *Carcinus maenas* MT; astfl, *Astacus astacus* MT; pacif, *Pacifastacus leniusculus* MT; homarus, *Homarus americanus* MT; and potpo, *Potamon potamios* MT. Non-crustacean sequences are cup1, *Saccharomyces cerevisiae* MT and mtn, *Drosophila melanogaster* MT. B) Fitch-Margoliash output tree of the ClustalW alignment of sequences. C) Taxonomic relationships among the crustacean species whose MT amino acid sequence is known.

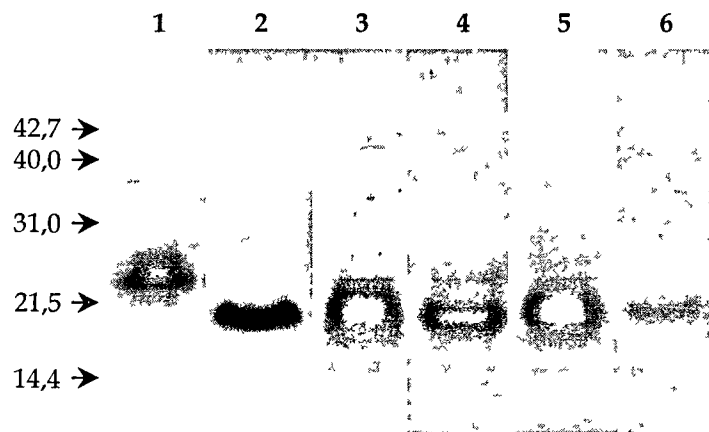


Figure 4. SDS-PAGE in 12.5 % gels stained with Coomassie blue of purified *Homarus* MT forms obtained after thrombin cleavage and FPLC chromatography from the corresponding GST fusions. Lanes are: (1) MTH; (2) $\beta\alpha$ MTH; (3) $\beta\beta$ MTH; (4) Single mutant $\beta\beta$ C9H; (5) Single mutant $\beta\alpha$ C37H; and (6) Double mutant $\beta\alpha$ E31C/T34C. Molecular weight marker migration is shown by arrows (in kDa).

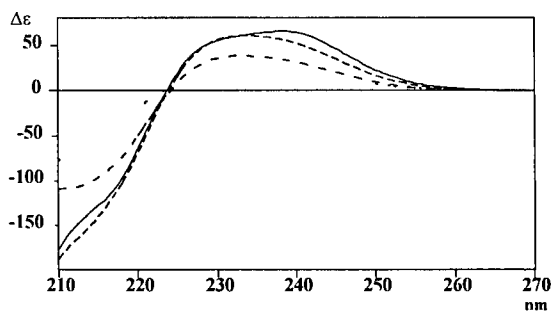


Figure 5. Comparison of the circular dichroism spectra of the *in vivo*-synthesized Zn-MTH species (solid line) with that corresponding to the sum of the circular dichroism spectra (dashed line) of the *in vivo*-synthesized Zn- $\beta\beta$ MTH (dotted line) and Zn- $\beta\alpha$ MTH (dashed-dotted line) species.

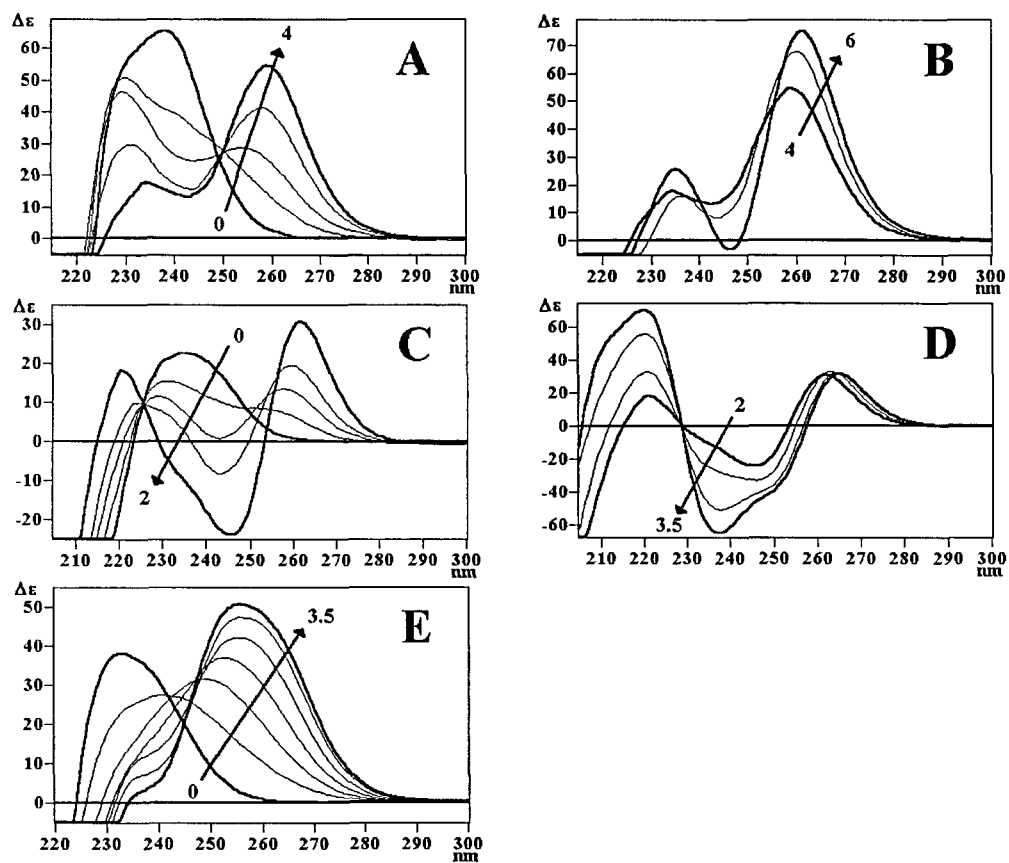


Figure 6. Circular dichroism spectra corresponding to the titration of *in vivo*-synthesized Zn-MTH (A, B), Zn- $\beta\beta$ MTH (C, D) and Zn- $\beta\alpha$ MTH (E) with Cd(II) at pH 7. Arrows show the evolution of the spectra when the indicated number of Cd(II) equivalents was added.

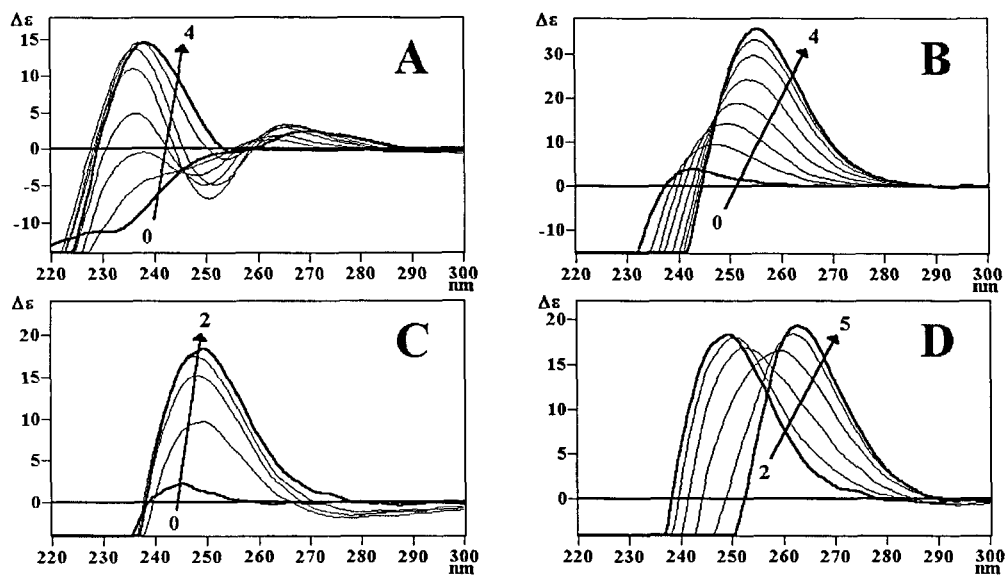


Figure 7. Circular dichroism spectra corresponding to the titration of *in vivo*-synthesized Zn- β C9HMTH (A), Zn- β C37HMTH (B) and Zn- β E31C/T34CMTH (C, D) with Cd(II) at pH 7. Arrows show the evolution of the spectra when the indicated number of Cd(II) equivalents was added.

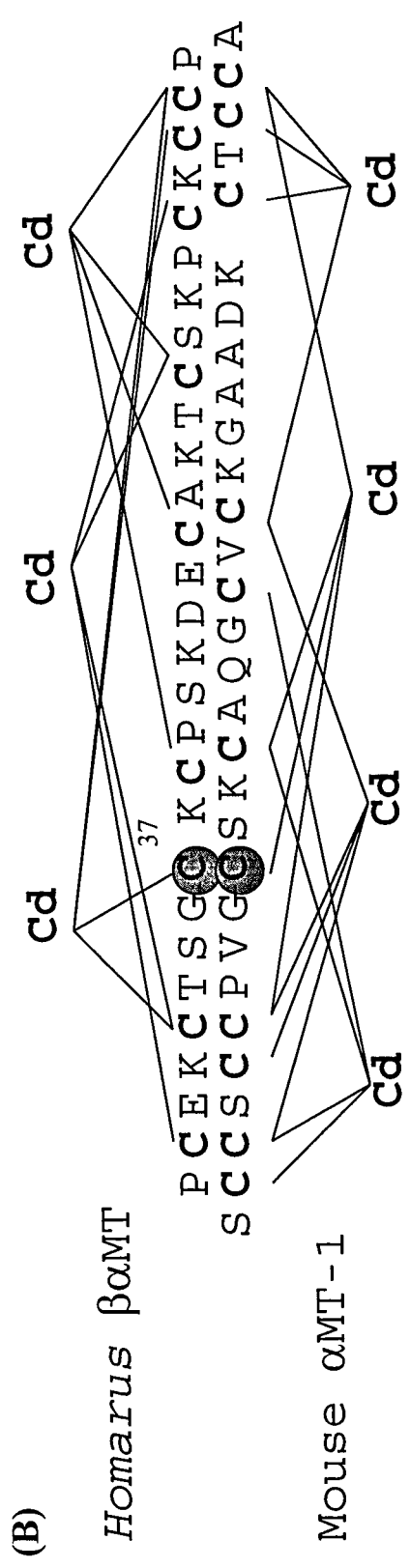
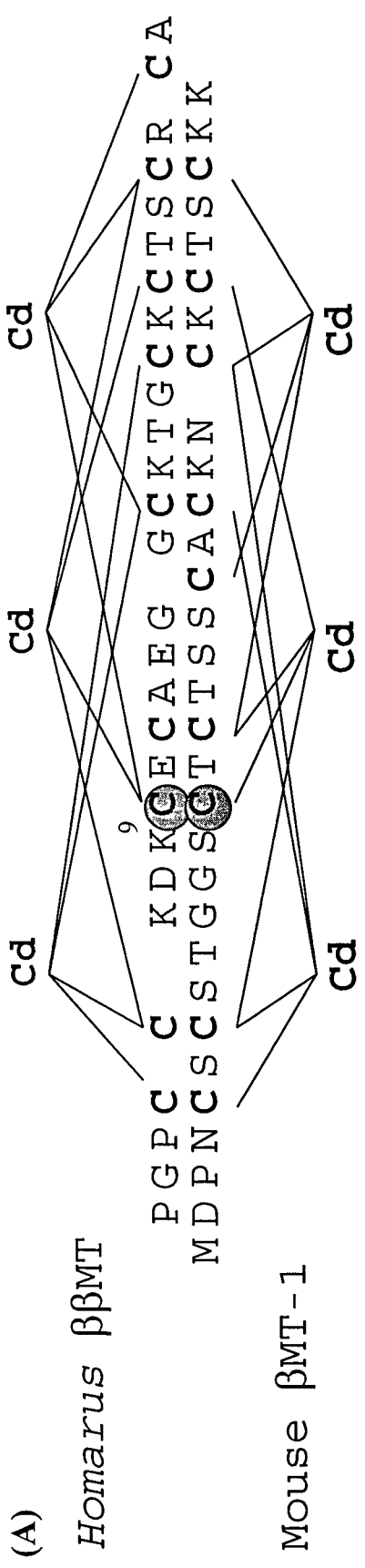


Figure 8. Schematic comparison of the connectivities between cysteine residues and cadmium ions in the N-terminal ($\beta\beta$ or β) (A) and C-terminal ($\beta\alpha$ or α) (B) domains of american lobster (*Homarus americanus*) and mouse-1 metallothioneins, respectively, according to ref. 11. The Cys-to-His substitutions in the *H.americanus* $\beta\beta$ C9HMTH and $\beta\alpha$ C37HMTH peptides are encircled in dark, as well as the corresponding positions of the site-directed mutants reported for mouse MT 1 (ref. 42). The lower panel (C) indicates, in open circles, the positions in the *H.americanus* $\beta\alpha$ domain where two residues have been mutated to cysteine in order to create Cys-Cys doublets.

3. DISCUSSIÓ DELS RESULTATS

En aquest capítol es pretén donar una visió de perspectiva dels resultats descrits en aquesta Tesi, els quals responen a l'objectiu comú de determinar el paper estructural del Zn(II) en el plegament de diverses MT en presència de Cu(I) *in vivo*. Així, s'analitzara la significació dels resultats descrits en els cinc articles de que consta aquesta Tesi, fent èmfasi tant en el que aquests resultats han aportat de nou en el camp de les metal·lotionineses com en el que concretament han permès de concloure sobre el comportament *in vivo* de les MT estudiades. Els articles s'agrupen en tres blocs diferenciats, d'acord amb els objectius fixats en el punt 1.6 de la Introducció. El primer bloc està constituït pels articles numerats 1, 2 i 3 i versa sobre les propietats de la MT recombinant de ratolí, el segon tracta sobre la MT recombinant de mosca (article 4) i el darrer es centra en l'estudi de la MT recombinant de lincolnatol i inclou tant l'article 5 com els resultats corresponents al seu comportament *in vitro* en presència de Cu(I), els quals són en aquesta secció objecte de redacció d'un únic article. Addicionalment, es compara la informació obtinguda amb els estudis de les MT complementari als dos ja existents actualment.

3. DISCUSSIÓ DELS RESULTATS

3.1. Estudi del paper estructural del Zn(II) en el plegament de la MT de ratolí en presència de Cu(I) *in vivo*

Per tal d'esbrinar el possible paper del Zn(II) en la MT de ratolí quan emllaça ions Cu(I) *in vivo* es necessari un coneixement previ del comportament *in vitro* d'aquesta proteïna en presència de Cu(I). Així, els resultats obtinguts *in vitro* amb Cu(I) han permès observar que el fragment βMT recombinant de ratolí dona lloc a la formació d'espècies amb la mateixa estequiometria i estructura (Cu₂-βMT, Cu-βMT i Cu₃-βMT) independentment de la forma inicial de partida de la proteïna (forma holera a pH 7, o forma apo, a pH3) després del reemplaçament total dels ions Zn(II) per ions Cu(I) a pH 7. Aquestes dades mostren que el Zn(II) no determina cap efecte planilla en l'estructura del fragment βMT quan aquest ha interaccionat 6 o més equivalents de Cu(I).

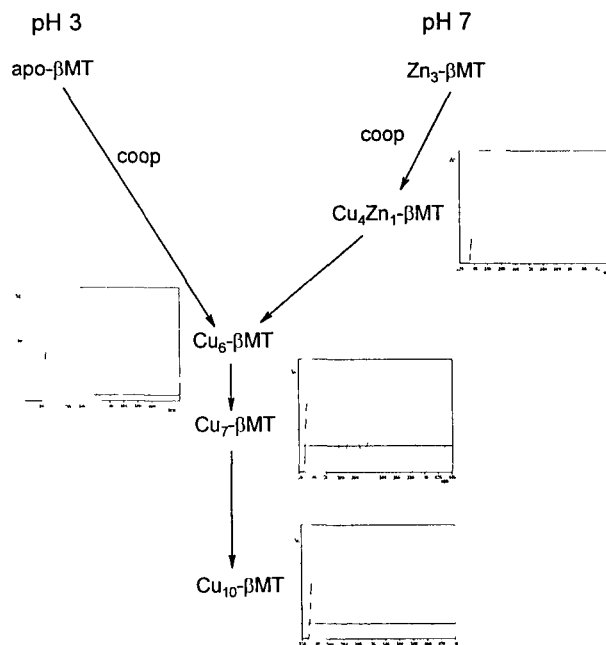
3. DISCUSSIÓ DELS RESULTATS

En aquest capítol es pretén donar una visió de perspectiva dels resultats descrits en aquesta Tesi, els quals responen a l'objectiu comú de determinar el paper estructural del Zn(II) en el plegament de diverses MT en presència de Cu(I) *in vivo*. Així, s'analitzarà la significació dels resultats descrits en els cinc articles de què consta aquesta Tesi, fent èmfasi tant en el que aquests resultats han aportat de nou en el camp de les metal·lotioneïnes com en el que concretament han permès de concloure sobre el comportament *in vivo* de les MT estudiades. Els articles s'agrupen en tres blocs diferenciats, d'acord amb els objectius fixats en el punt 1.6 de la Introducció. El primer bloc està constituït pels articles numerats 1, 2 i 3 i versa sobre les propietats de la MT recombinant de ratolí, el segon tracta sobre la MT recombinant de mosca (article 4) i el darrer es centra en l'estudi de la MT recombinant de llamàntol i inclou tant l'article 5 com els resultats corresponents al seu comportament *in vitro* en presència de Cu(I), els quals són en aquests moments objecte de redacció d'un sisè article. Addicionalment, es compara la informació obtinguda per a cadascuna de les diferents MT i es proposa un nou criteri general de classificació de les MT complementari als dos ja existents actualment.

3.1. Estudi del paper estructural del Zn(II) en el plegament de la MT de ratolí en presència de Cu(I) *in vivo*.

Per tal d'esbrinar el possible paper del Zn(II) en la MT de ratolí quan enllaça ions Cu(I) *in vivo* és necessari un coneixement previ del comportament *in vitro* d'aquesta proteïna en presència de Cu(I). Així, els resultats obtinguts *in vitro* amb Cu(I) han permès observar que el fragment β MT recombinant de ratolí dona lloc a la formació d'espècies amb la mateixa estequiometria i estructura (Cu_6 - β MT, Cu_7 - β MT i Cu_{10} - β MT) independentment de la forma inicial de partida de la proteïna (forma holo, a pH 7, o forma apo, a pH3) després del reemplaçament total dels ions Zn(II) per ions Cu(I) a pH 7. Aquestes dades mostren que el Zn(II) no determina cap efecte plantilla en l'estructura del fragment β MT quan aquest ha incorporat 6 o més equivalents de Cu(I).

En l'Esquema 3.1 s'indica el camí de reacció seguit per aquest fragment al llarg de la valoració amb Cu(I) a cadascun dels dos valors de pH estudiats, al mateix temps que s'ha inserit l'empremta espectral de DC de cadascuna de les espècies formades.



Esquema 3.1. Esquema dels camins de reacció seguits durant l'addició de Cu(I) al fragment βMT recombinant de ratolí a pH 3 i a pH 7, amb la inserció dels espectres de DC de les espècies formades

Cal destacar que l'elevat grau de puresa del fragment βMT de ratolí obtingut a partir de la tècnica de l'ADN recombinant^{39c} ens ha permès caracteritzar per mètodes espectroscòpics (DC, UV-Vis) i espectromètrics (ESI-MS) les espècies $\text{Cu}_6\text{-}\beta\text{MT}$ i $\text{Cu}_7\text{-}\beta\text{MT}$ amb un grau de detall molt superior al trobat per d'altres autors.^{63b, 65a} Alhora, cal indicar que la formació cooperativa de l'espècie intermetàl·lica $\text{Cu}_4\text{Zn}_1\text{-}\beta\text{MT}$ a pH 7 no s'havia descrit amb anterioritat. Com a tall d'exemple, en la Figura 3.1 es mostra la diferència existent entre els espectres de DC obtinguts en aquest treball durant la valoració d' $\text{apo-}\beta\text{MT}$ recombinant de ratolí amb Cu(I) a pH 3 i els obtinguts per d'altres autors en una valoració anàloga d' $\text{apo-}\beta\text{MT}$ de rata obtinguda per síntesi química en fase sòlida.^{63a}

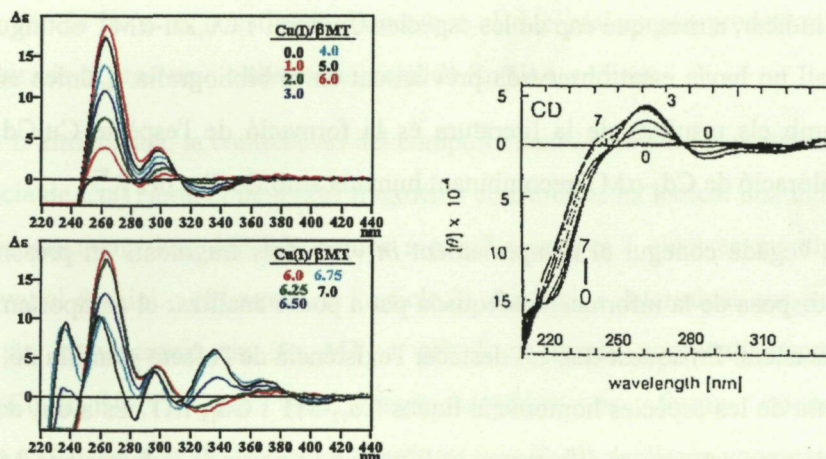


Figura 3.1. Comparació dels espectres de DC obtinguts durant la valoració d'apo-βMT recombinant de ratolí amb Cu(I) a pH 3 (requadres en color) amb els obtinguts per d'altres autors en una valoració anàloga d'apo-βMT de rata obtinguda per síntesi química en fase sòlida^{65a} (requadre en blanc i negre).

Un cop conegut el comportament *in vitro* del fragment βMT de ratolí en presència de Cu(I), s'ha analitzat el comportament del fragment αMT en condicions anàlogues. En aquest cas s'ha revelat la importància de la presència o absència de Zn(II) inicialment coordinat a la proteïna en l'estructura que aquesta adquireix en presència de Cu(I). Aquest fenomen, que ja hem anomenat com a efecte plantilla del Zn(II), comporta que l'estructura de les espècies homometàl·liques Cu₇-αMT i Cu₉-αMT depengui de la forma de partida de la proteïna (holo o apo), tal com es pot apreciar en la Taula 3.1.

Espècie	pH 3	pH 7
Cu ₇ -αMT		
Cu ₉ -αMT		

Taula 3.1. Comparació dels espectres de DC de les espècies Cu₇-αMT i Cu₉-αMT obtingudes a partir d'apo-MT a pH 3 i a partir de Zn₄-αMT a pH 7.

Cal indicar, a més, que cap de les espècies Cu- α MT i Cu,Zn- α MT obtingudes en aquest treball no havia estat observada prèviament en la bibliografia. L'única analogia detectada amb els resultats de la literatura és la formació de l'espècie Cu₄Cd₁- α MT durant la valoració de Cd₄- α MT recombinant humana amb Cu(I) a pH 7.⁸⁷

Una vegada conegut el comportament *in vitro* dels fragments en presència de Cu(I) ja es disposa de la informació adequada per a poder analitzar el comportament de la proteïna sencera. En aquest cas, cal destacar l'existència de l'efecte plantilla del Zn(II) en l'estructura de les espècies homometàl·liques Cu₁₂-MT i Cu₁₅-MT. És a dir, aquestes espècies presenten estructures diferents si es formen bé a partir de la forma apo-MT o bé a partir de Zn₇-MT. L'experiment que es resumeix a continuació ho posa de manifest (Figura 3.2).

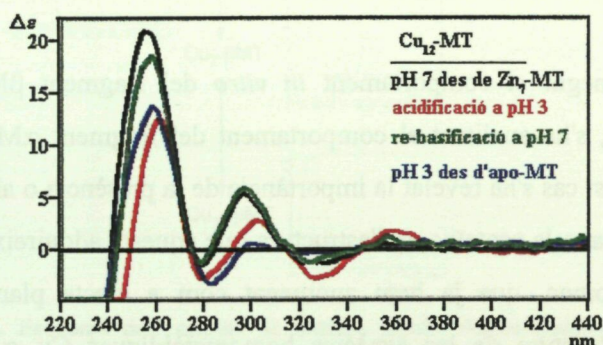


Figura 3.2. Comparació dels espectres de DC corresponents a l'espècie Cu₁₂-MT de ratolí obtinguda a partir de Zn₇-MT a pH 7 (en negre) i a partir d'apo-MT a pH 3 (en blau). També es mostra l'efecte de l'acidificació fins a pH 3 (en vermell) i la posterior re-basificació fins a pH 7 (en verd) de l'espècie Cu₁₂-MT obtinguda a pH 7.

En aquesta figura es pot observar que si la solució que conté l'espècie Cu₁₂-MT obtinguda a partir de Zn₇-MT a pH 7 (en negre) s'acidifica fins a pH 3 (en vermell) té lloc un petit desplaçament de la banda gaussiana centrada a 257 nm i una lleugera disminució de la intensitat d'aquesta banda i dels exciton couplings centrats a 312 i 350 nm; ara bé, la posterior re-basificació fins a pH 7 (en verd) pràcticament provoca el retorn a l'espectre de DC de partida. En canvi, l'espècie Cu₁₂-MT obtinguda a partir d'apo-MT a pH 3 (en blau) està mancada d'excitons couplings en la zona de 300-380 nm, fet que indica que presenta una estructura diferent de la dels tres casos anteriors. Així doncs, l'estructura de Cu₁₂-MT no es veu modificada significativament per l'alteració del

87. M. Kurasaki, F. Yamasaki, M. Suzuki-Kurasaki, Y. Kojima, *Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol.*, 1996, 92, 225.

pH un cop ja ha estat constituïda, donat que el que bàsicament predetermina la seva estructura és la presència o absència inicial de Zn(II) coordinat.

D'altra banda, la comparació del comportament *in vitro* de la proteïna sencera en presència de Cu(I) amb el dels seus fragments constitutius ha indicat una independència de comportament dels dominis només a pH 7 i sempre i quan es mantingui Zn(II) coordinat al domini α (Figura 8 de l'article 3). Així, s'ha determinat que en la primera etapa de la valoració de Zn₇-MT a pH 7 es forma cooperativament l'espècie $(Zn_4)^\alpha(Cu_4Zn_1)^\beta$ -MT, que en l'etapa següent es forma cooperativament $(Cu_3Zn_2)^\alpha(Cu_4Zn_1)^\beta$ -MT, i que els subsegüents ions Cu(I) s'enllacen cooperativament als dos dominis formant l'espècie $(Cu_4Zn_1)^\alpha(Cu_6)^\beta$ -MT. Així, si bé la hipòtesi de la independència de dominis ja havia estat postulada per d'altres autors amb anterioritat,^{63b} les distribucions metàl·liques per dominis en les espècies mixtes de Cu i Zn trobades en aquest treball mai no havien estat descrites i indiquen la possibilitat d'existència d'agregats mixtos de Cu i Zn tant en el domini α com en el β . L'existència *in vitro* de MT amb dominis heterometàl·lics només ha estat descrita en la bibliografia en el cas de $(Cu_3Zn_2)^\alpha(Cu_6)^\beta$ -MT i $(Cu_6Cd_4)^\alpha(Cu_6)^\beta$ -MT de ratolí.^{35e} En cap cas, doncs, no s'havia descrit la presència d'un domini β MT heterometàl·lic en aquestes condicions.

D'altres resultats importants obtinguts *in vitro* per a la proteïna sencera permeten concloure que: a) en contra de la hipòtesi àmpliament acceptada segons la qual el Cu(I) presenta una afinitat clarament preferencial per a unir-se al domini β ,⁶³ aquesta és només parcial, però no absoluta, i b) les espècies homometàl·liques de Cu(I) possiblement no presenten l'àmpliament acceptada estructura bidominal, sinó que estan constituïdes per un sol domini. Així, per exemple, en el cas paradigmàtic de l'espècie Cu₁₂-MT, obtinguda tant a pH 3 com a pH 7, les dades espectroscòpiques no permeten deduir la seva distribució metàl·lica, contràriament a la distribució $(Cu_6)^\alpha(Cu_6)^\beta$ -MT proposada en la bibliografia.^{35, 88} Les dues conclusions anteriors, a més, ens permeten arribar a una darrera conclusió: el sistema clàssic d'obtenció del fragment β MT per addició de 6 ions Cu(I) a apo-MT i posterior digestió amb subtilisina del suposat domini apo- α present en la proteïna sencera⁸⁹ no és vàlid, donat que hem observat que l'addició de 6 equivalents de Cu(I) a apo-MT resulta en la distribució del Cu(I) en tota la proteïna i no

88. A.R. Green, M.J. Stillman, *Inorg. Chim. Acta*, **1994**, *226*, 275.

89. D.R. Winge, *Methods Enzymol.*, **1991**, *205*, p. 438-447.

exclusivament en el seu domini β . Per últim, cal indicar que en aquest treball s'ha determinat la formació *in vitro* de diverses espècies Cu-MT i Cu,Zn-MT per primera vegada.

El comportament *in vitro* de les proteïnes recombinants de ratolí en presència de Cu(I) permet entendre les seves propietats coordinants *in vivo*. Així, l'expressió de MT de ratolí i els seus fragments en un medi ric en Cu ha donat lloc a espècies de la mateixa estequiometria i estructura que les obtingudes en els respectius estudis realitzats *in vitro*. Ara bé, mentre que en el cas del fragment β MT s'han obtingut espècies homometàl·liques de Cu(I), en els altres dos casos s'han obtingut espècies mixtes que contenen Cu(I) i Zn(II). Així, en el cas del fragment β s'ha obtingut una mescla de Cu₆- β MT al 25% i Cu₇- β MT al 75%, en el del fragment α una mescla de Cu₄Zn₁- α MT (40%), Cu₃Zn₁- α MT (20%) i Cu₇- α MT (40%) i en el de la proteïna sencera una única espècie (Cu₃Zn₂) ^{α} (Cu₄Zn₁) ^{β} -MT. És evident, doncs, que el Zn(II) és essencial per al plegament *in vivo* de la MT de ratolí i el seu fragment α en presència de Cu(I), ja que no s'observa la formació única d'espècies homometàl·liques de Cu(I); en canvi, en el cas del fragment β el Zn(II) no hi té cap paper, ja que només es formen espècies homometàl·liques de Cu(I). De fet, una anàlisi detallada dels resultats obtinguts *in vitro* ja permetia preveure aquests comportaments *in vivo*, donat que l'existència de l'efecte plantilla del Zn(II) en el cas de la proteïna sencera i el seu fragment α indicava el paper clau del Zn(II) en l'estructuració d'aquestes proteïnes en presència de Cu(I), a diferència del que tenia lloc per al fragment β . En definitiva, doncs, els resultats obtinguts *in vivo* corroboren el que ja insinuaven els estudis efectuats *in vitro*.

D'altra banda, una comparació dels resultats obtinguts *in vivo* per als fragments aïllats amb els corresponents a la proteïna sencera permet observar una pèrdua de capacitat coordinant de Cu(I) quan els dos dominis estan units en una sola estructura proteica. Per tant, l'estructura bidominal que presenta l'espècie Cu₇Zn₃-MT obtinguda *in vivo* [(Cu₃Zn₂) ^{α} (Cu₄Zn₁) ^{β} -MT] no va necessàriament lligada al fet que els seus dos dominis constitutius es comportin d'una manera absolutament independent. Per últim, cal indicar que aquest és el primer estudi en què s'aïllen separatament les espècies formades *in vivo* per part dels fragments α i β d'una MT de mamífer en presència de Cu(I). Pel que fa a la proteïna sencera, si bé alguns autors havien aïllat espècies Cu,Zn-MT natives d'òrgans de mamífer,^{7a, b, e, g, h} cap d'aquests no havia obtingut l'espècie

Cu₇Zn₃-MT ni havia observat la presència dels dos dominis contenint alhora Cu(I) i Zn(II).

Els resultats anteriors permeten donar resposta a les preguntes formulades en el primer objectiu d'aquesta Tesi. D'una banda, s'ha establert sense ambigüitat les estequiometries de les espècies formades *in vivo* en presència de Cu(I) per part de la MT de ratolí i els seus fragments, i fins i tot s'ha determinat l'abundància relativa de cadascuna de les espècies en les mescles obtingudes en el cas dels fragments. D'altra banda, s'ha posat de manifest que efectivament el Zn(II) és no només important per al plegament *in vivo* de la MT de ratolí en presència de Cu(I), sinó que de fet és essencial, ja que es forma una única espècie que conté alhora Cu(I) i Zn(II). A més, aquest resultat està d'acord amb la hipòtesi que en les cèl·lules de mamífer la MT es sintetitza inicialment com a Zn₇-MT,⁹⁰ i que posteriorment aquest ió metàl·lic és desplaçat parcialment per d'altres metalls presents en altes concentracions en el medi, donant lloc a la formació d'agregats metàl·lics mixtos estabilitzats per la presència de Zn(II). Alhora, el Zn(II) alliberat en aquest procés seria el responsable de l'activació de la síntesi de més MT, d'acord amb l'observació efectuada recentment per Bittel *et al.*⁸

90. A.Y.C. Law, M.G. Cherian, M.J. Stillman, *Biochim. Biophys. Acta*, **1984**, *784*, 53.

3.2. Estudi del paper estructural del Zn(II) en el plegament de la MT de mosca (*Drosophila*) en presència de Cu(I) *in vivo*.

En el moment de començar aquest estudi només existia un treball en la bibliografia sobre les característiques estructurals d'una MT d'un insecte,²⁴ *Orchesella cincta*, la qual fou aïllada després de la seva inducció per Cd i resultà estar evolutivament força allunyada de la resta de MT d'invertebrats conegudes. Així doncs, l'estudi de les propietats coordinants de la forma al·lèlica MTN1 de *Drosophila* envers diversos metalls presentava molt d'interès, ja que havia de permetre augmentar el coneixement actual sobre les MT d'insecte.

Al llarg d'aquest treball s'ha expressat per primera vegada una MT d'insecte mitjançant la tècnica de l'ADN recombinant en presència de Zn(II), la qual ha resultat en una mescla d'espècies poc quirals (Fig. 1A de l'article 4) i parcialment oxidades. Els estudis realitzats *in vitro* indiquen que MTN s'estructura millor en presència de Cd(II) que en presència de Zn(II) (Fig. 2A-B de l'article 4), i que l'augment de quiralitat és encara superior en presència de Cu(I) (Fig. 2C-D de l'article 4). En definitiva, el grau de plegament que aconsegueix MTN en presència dels diferents ions metàl·lics segueix l'ordre Cu > Cd > Zn, que precisament és també l'ordre de capacitats que presenten aquests metalls per a induir l'ARN missatger d'aquesta proteïna.⁹¹ D'altra banda, l'espècie obtinguda en l'expressió de MTN en presència de Cu és Cu₈-MTN, la qual és idèntica a l'espècie majoritària que s'obté després del desplaçament total de Zn(II) per Cu(I) *in vitro* (Fig. 1B de l'article 4). Així doncs, del conjunt de resultats obtinguts es dedueix que el Zn(II) no presenta cap paper en el plegament *in vivo* de MTN en presència de Cu(I).

D'altra banda, una anàlisi més a fons de l'espècie Cu₈-MTN obtinguda *in vivo* permet observar que existeix una forta similitud entre l'estequiometria d'aquesta espècie i la de l'espècie Cu₇-MT nativa de CUP1 de *Sac. cerev.*,^{10d} donat que ambdues presenten 10 Cys coordinants. Aquesta similitud esdevé encara major si es té en compte que si es dialitza la solució que conté l'espècie Cu₈-MTN obtinguda *in vivo* s'obté una espècie Cu₇-MTN minoritària, fet que indica la presència d'ions Cu(I) coordinats de diferent manera, uns en regions més internes i compactes, i d'altres en regions més externes,

91. M. Durliat, F. Bonneton, E. Boissonneau, M. André, M. Wegnez, *Biometals*, 1995, 8, 339.

anàlogament al proposat per a la CUP1 de *Sac. cerev.*^{10d} A més, una comparació de l'estructura de l'espècie Cu₈-MTN amb la de les espècies Cu₆-βMT i Cu₇-βMT de mamífer^{41b} (Figura 3 de l'article 4) permet postular que Cu₈-MTN presenta un plegament molt similar al de Cu₆-βMT, amb unitats CuS₃, però amb la presència addicional d'alguns ions Cu(I) coordinats digonalment a Cys.

L'estudi filogenètic de comparació de seqüències de diferents MT potencialment relacionades amb MTN (Taula 2A de l'article 4) ha indicat que el motiu X-Cys-Cys-X característic dels dominis de seqüència tipus α de les MT de vertebrats aparegué al llarg de l'evolució després dels dominis de seqüència tipus β. Alhora, la generació d'arbres filogenètics a partir de 3 algorismes diferents (Taula 2B de l'article 4) ha assignat a la mateixa branca MTN1 de *Drosophila*, CRS5 de *Sac.cerev.*, MT de *N.crassa* i els extrems N-t de MT 1 de ratolí i de MT de cranc. Per tant, l'origen de la duplicació d'una MT de seqüència tipus β primigènia per a donar lloc a MT bidominals de seqüència tipus β-β (en els crustacis) o β-α (en els mamífers)⁹² cal buscar-lo en les MT monodominals de *Drosophila* (al·lel MTN1) i de *N.crassa* i en la MT bidominal de *Sac.cerev.* (CRS5). A més, es pot proposar l'ampliació del segment central CXCXXXCXC definit inicialment com a característic de les seqüències tipus β⁹² a C-X-C-X₅₋₈-C-X₁₋₂-C-X₂₋₃-C-X-C.

En resum, MTN representa la descoberta d'una MT d'un organisme pluricel·lular evolutivament relacionada amb les MT d'organismes molt més primitius, com les MT de la família dels fongs, les quals estan constituïdes per un i en alguns casos dos dominis de seqüència tipus β d'elevada afinitat per al Cu(I). És a dir, MTN pot ser considerada com la relíquia evolutiva en els insectes d'una metal·lotioneïna d'un sol domini de característiques similars a les de les MT de fongs. Així doncs, MTN és la primera MT de metazou descoberta que presenta una elevada afinitat envers el Cu(I), i constitueix un pas evolutiu comprès entre les MT monodominals ancestrals de seqüència tipus β de protozous i les MT bidominals de metazous. D'aquesta conclusió es despren, a més, que no és impensable que en un futur es pugui trobar una segona MT de *Drosophila* més llarga constituïda per dos dominis, semblantment a les MT de la resta de metazous. De fet, l'existència de MTO de *Drosophila*, de 43 residus i amb 12

92. M. Nemer, D.G. Wilkinson, E.C. Travaglini, E.J. Sternberg, T.R. Butt, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1985, 82, 4994.

Cys, dues de les quals en la disposició Cys-Cys característica dels dominis tipus α , podria apuntar cap a aquesta direcció.

3.3. Estudi del paper estructural del Zn(II) en el plegament de la MT de llamàntol (*Homarus americanus*) en presència de Cu(I) *in vivo*.

És plenament conegut que el coure és essencial per als pigments respiratoris en els crustacis. D'altra banda, es creu que les MT tenen un paper clau en l'homeòstasi de Cu en aquesta espècie animal.⁹³ No obstant, no existeix en la bibliografia cap estudi en què s'hagi analitzat la possible presència de Zn(II) en les Cu-MT de crustaci obtingudes després de l'administració de Cu als seus teixits o òrgans. Ara bé, existeixen diversos estudis d'aïllament de MT en crustacis tractats amb Cd(II) que indiquen que aquestes proteïnes contenen també Cu(I) o bé Cu(I) i Zn(II) a part de Cd(II).⁹⁴ Per tant, aquest fet era indicatiu d'una possible relació *in vivo* entre el Cu(I) i els metalls divalents en les MT de crustaci. És per aquest motiu que ens va semblar interessant estudiar el possible paper estructural del Zn(II) en la formació *in vivo* de Cu-MT de crustaci.

Tal i com s'ha indicat anteriorment, l'estudi del comportament *in vivo* en presència de Cu(I) requereix un coneixement previ del comportament *in vitro* de la proteïna. D'altra banda, també és convenient estudiar el seu comportament *in vitro* en presència de metalls divalents, per tal de corroborar la puresa de la proteïna obtinguda, donat que els estudis estructurals sobre les MT de crustaci de la bibliografia han estat efectuats en aquestes condicions (apartat 1.2.3 de la Introducció). Els resultats obtinguts s'inclouen en el darrer article de què consta aquesta Tesi Doctoral, i representen el primer estudi de les propietats coordinants envers metalls monovalents i divalents de la MT d'*Homarus americanus* (MTH) i els seus fragments constitutius obtinguts mitjançant la tècnica de l'ADN recombinant.

L'expressió de MTH en un medi ric en Zn(II) ha donat lloc a l'espècie majoritària Zn₆-MTH, mentre que els fragments constitutius obtinguts separatament donen lloc a espècies amb una estequiometria principal de 3 Zn(II)/proteïna. Les espècies finals obtingudes *in vitro* després de l'addició de Cd(II) a les proteïnes recombinants de Zn(II) mantenen en termes generals les estequiometries metall/proteïna de partida respectives.

93. M. Brouwer, D.R. Winge, W.R. Gray, *J. Inorg. Biochem.*, **1989**, *35*, 289.

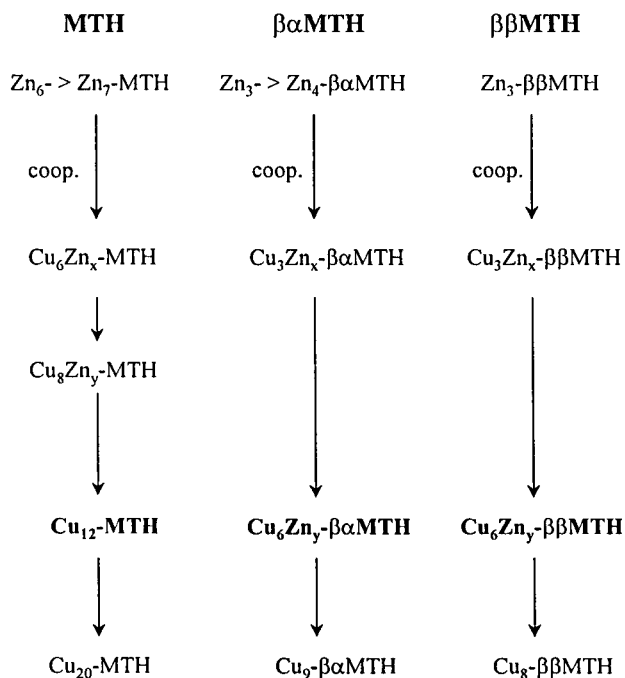
94. a) R.W. Olafson, R.G. Sim, K.G. Boto, *Biochem. Physiol.*, **1979**, *62B*, 407. b) J. Overnell, E. Trehwella, *Comp. Biochem. Physiol.*, **1979**, *64C*, 69. c) J. Overnell, *Comp. Biochem. Physiol.*, **1982**, *73B*, 547. d) C.L. Chou, R.D. Guy, J.F. Uthe, *Sci. Total Environm.*, **1991**, *105*, 41. e) Z. Zhu, M. Goodrich, A.A. Isab, C.F. Shaw III, *Inorg. Chem.*, **1992**, *31*, 1662. f) K.L. Pedersen, S.N. Pedersen, P. Hojrup, J.S. Andersen, P. Roepstorff, J. Knudsen, M.H. Deplege, *Biochem. J.*, **1994**, *297*, 609.

Cal indicar, a més, la presència minoritària d'un setè lloc d'unió per a Zn(II) i Cd(II) en MTH. En definitiva, les estequiometries principals M^{II}_6 -MTH, M^{II}_3 - $\beta\beta$ MTH i M^{II}_3 - $\beta\alpha$ MTH obtingudes concorden amb la de l'estructura $(\text{Cd}_3\text{-}\beta\beta)(\text{Cd}_3\text{-}\beta\alpha)$ -MTH descrita per a la proteïna nativa de llamàntol,^{37b} mentre que la presència en MTH d'un setè lloc de coordinació per a Cd(II) està d'acord amb resultats anàlegs trobats per a la MT de *Cancer pagurus*.³⁸ Així doncs, tots aquests resultats validen el sistema d'expressió heteròloga utilitzat en aquest treball.

Una anàlisi més detallada dels resultats obtinguts en presència de metalls divalents ens permet d'extreure conclusions addicionals: a) els dos dominis en Zn_6 -MTH es pleguen de forma independent l'un de l'altre, si bé existeixen certes interaccions entre aquests (Figura 5 de l'article 5), les quals són més fortes que en el cas dels dos dominis de Zn_7 -MT de ratolí,^{39d} b) la formació *in vitro* de l'espècie intermèdia Cd_4Zn_2 -MTH, amb un espectre de DC molt similar al de l'espècie nativa $\text{Cd}_{4,6}\text{Zn}_{2,4}$ -MT de *Scylla serrata*,⁹⁰ confirma la hipòtesi suggerida per Law *et al.* que la síntesi *in vivo* de Cd,Zn-MT en els crustacis prové del desplaçament parcial per part del Cd(II) del Zn(II) present en una espècie homometàl·lica Zn-MT inicial,⁹⁰ c) la similitud de comportament del fragment $\beta\alpha$ MTH aïllat respecte el de MTH indica que el setè metall divalent en MTH es situa en el domini $\beta\alpha$, alhora que es creu possible la participació de lligands més durs que el S, com N o O, en la seva coordinació, i d) el fragment $\beta\beta$ MTH pot coordinar un quart Cd(II) a prop del seu extrem C-t quan es troba aïllat, però no pot quan forma part de la proteïna sencera, perquè aleshores aquesta posició de coordinació es veu impedita. A més, aquesta interacció entre dominis podria explicar la no additivitat del comportament dels fragments $\beta\beta$ i $\beta\alpha$ saturats amb Cd(II) respecte del de MTH saturada amb Cd(II), a diferència del que passa en la MT de mamífer.^{39d}

Un cop validat el sistema d'expressió utilitzat en la síntesi de les proteïnes de crustaci, es van estudiar les seves propietats coordinants *in vitro* envers Cu(I). A continuació s'exposaran els principals resultats obtinguts a través de les espectroscòpies d'UV-Vis, DC i emissió, els quals són en aquests moments objecte de redacció d'un sisè article. Així, la tècnica de DC ha indicat que totes les proteïnes s'estructuren de manera significativa en presència de Cu(I), mentre que l'espectroscòpia d'emissió tant a T ambient com a 77K (vegeu Annex I) ha indicat que la màxima compacitat de la proteïna s'obté per 12 equivalents de Cu(I) afegits en el cas de la proteïna sencera i per 6

equivalents de Cu(I) en el cas dels fragments aïllats. Si bé podria semblar que aquests resultats indiquen una additivitat de comportament dels fragments aïllats respecte la proteïna sencera, les dades de DC desmenteixen aquesta possibilitat. En definitiva, el conjunt de les mesures espectroscòpiques efectuades permetria de traçar el següent esquema sobre el comportament *in vitro* de MTH i els seus fragments constitutius envers Cu(I):



Esquema 3.2. Esquema dels camins de reacció seguits durant l'addició de Cu(I) a pH 7 a les proteïnes recombinants MTH, ββMTH i β α MTH obtingudes en un medi ric en Zn(II). En negreta s'indiquen les espècies de màxim nivell de compacitat observades per espectroscòpia d'emissió.

D'altra banda, donada la similitud existent en el nombre i disposició de les Cys del domini ββ de les MT de crustaci i del domini β de les MT de mamífer (Figura 8 de l'article 5), hom es podria preguntar si el tipus d'estructuració assolida *in vitro* per aquestes proteïnes en presència de Cu(I) és també similar. No obstant, una comparació dels espectres de DC corresponents a les valoracions de les respectives proteïnes amb Cu(I)^{41b} indica que si bé s'observa alguna lleu similitud, no es pot concloure que l'estructuració adquirida per part de ββMTH sigui anàloga a la del fragment βMT de ratolí.

El comportament *in vitro* de MTH i els seus fragments envers Cu(I) ha permès analitzar les seves propietats coordinants *in vivo*. L'expressió d'aquestes proteïnes en un medi ric en Cu ha donat en tots els casos proteïnes mixtes de Cu(I) i Zn(II), i fins i tot en el cas de MTH el contingut de Zn(II) és superior al de Cu(I). A més, cal indicar que el fragment $\beta\beta$ MTH expressat en un medi 50% Zn / 50% Cu s'obté amb major contingut en Cu(I) que quan s'expressa en un medi 100% Cu. D'altra banda, si bé no s'ha pogut determinar el grau d'oxidació de les proteïnes obtingudes, donat que el mètode d'Ellman no és vàlid en el cas de les Cu-MT⁹⁵ (vegeu Annex II), la relació molar (Zn+Cu)/proteïna obtinguda per ICP-AES en el cas de la proteïna sencera indica un grau d'oxidació gens menyspreable. Addicionalment, cal destacar que les dificultats d'estructuració que presenta MTH ha complicat la interpretació de les dades d'UV-Vis i de DC enregistrades *in vivo*, de manera que no ha estat possible de comparar aquestes dades amb les dades obtingudes *in vitro* en presència de Cu(I).

A pesar dels inconvenients ara esmentats, els resultats obtinguts mostren clarament que ni MTH ni els seus fragments no poden formar *in vivo* espècies homometàl·liques de Cu, sinó que per contra necessiten el Zn(II) per a estructurar-se. Aquesta presència de Zn(II) està d'acord amb la hipòtesi que la MT és sintetitzada *in vivo* primerament com a Zn-MT,⁹⁰ que posteriorment aquest metall és substituït per d'altres de més tous, com Cu(I), en funció de les concentracions presents en l'organisme. Per aquest motiu MTH i els seus fragments s'expressen perfectament en presència de Zn(II), i el fragment $\beta\beta$ MTH coordina més Cu(I) que quan s'expressa en un medi 50% Zn / 50% Cu que quan es fa en un medi 100% Cu, donat que la major disponibilitat de Zn(II) en el medi mixte ajuda a la proteïna a estructurar-se amb Cu(I). Aquests resultats, doncs, posen en dubte la possible rellevància de MTH en l'homeòstasi de Cu.

L'estudi sobre les dues formes mutants simples es féu per tal de determinar la contribució de les Cys individuals substituïdes en l'evolució de la capacitat coordinant de MTH envers els diversos metalls d'interès. Les proteïnes expressades, $\beta\beta$ C9HMTH i $\beta\alpha$ C37HMTH, presenten mutacions individuals de Cys per His en posicions anàlogues

95. D.R. Winge. In: *Methods Enzymol.*, J.F. Riordan, B.L. Vallee, eds., Academic Press, San Diego, 1991, 205, p. 458-469.

a les formes mutades de ratolí β C13HMT i α C41HMT,⁹⁶ respectivament (Figura 8 de l'article 5). L'efecte d'aquestes mutacions en l'expressió de les proteïnes recombinants de llamàntol corresponents en un medi ric en Zn(II) és l'aparició d'una menor capacitat coordinant de Zn(II) en comparació amb els respectius fragments no mutats (o silvestres). En canvi, pel que fa a la variació del comportament *in vitro* en presència de Cd(II), aquesta depèn clarament de la Cys substituïda. Així, en el cas de la mutació C37H en β α MTH, l'espècie saturada amb Cd(II) corresponent a la forma mutada manté pràcticament la mateixa estequiometria i estructura que la corresponent forma silvestre saturada amb Cd(II), mentre que en el cas de la mutació C9H en β β MTH la forma mutada presenta menor capacitat coordinant de Cd(II) i s'estructura de manera diferent que la corresponent forma silvestre. Així doncs, la mutació C37H en β α MTH és conservativa, mentre que la mutació C9H en β β C9H no ho és, anàlogament al que passava per a les formes mutades α C41H i β C13H en la MT de ratolí,⁹⁶ respectivament. Per tant, la Cys en posició 9 en el fragment β β MTH és clau a l'hora de determinar l'estructuració de la proteïna en presència de Cd(II). D'altra banda, l'expressió d'aquestes formes mutants en un medi ric en Cu dona lloc a espècies que contenen Cu(I) i Zn(II) alhora, anàlogament al que passava per a les respectives formes silvestres.

El doble mutant E31C/T34C β α MTH fou dissenyat per a emular els doblets Cys-Cys característics del fragment α MT de mamífer (Figura 8 de l'article 5), l'estudi del qual ha resultat en un increment de la capacitat coordinant de Zn(II) i Cd(II) en comparació amb la corresponent forma silvestre. No obstant, aquest mutant no ha aconseguit emular l'estructuració de Cd₂- α MT de mamífer, fet que indica la possible importància d'altres factors que el nombre i disposició de les Cys a l'hora de determinar la forma de plegament de les MT davant els metalls pesants. Pel que fa a la seva expressió en un medi ric en Cu, aquesta ha resultat en la formació d'una proteïna mixta de Cu(I) i Zn(II).

Les múltiples anàlisis de seqüència realitzades (Figura 3 de l'article 5) han permès identificar dues línies evolutives antigues i separades en les MT de crustaci: les anomenades Zn-tioneïnes, o MT específiques de Zn(II), que representarien la quasi totalitat de les MT de crustaci conegudes en aquest moment, i les anomenades

96. N. Romero-Isart, N. Cols, J. Termansen, J.Ll. Gelpí, R. González-Duarte, S. Atrian, M. Capdevila, P. González-Duarte, *Eur. J. Biochem.*, 1999, 259, 519.

Cu-tioneïnes, o MT específiques de Cu(I), l'únic exemple del qual es té constància fins al moment és la isoforma CalliCu de *Callinectes sapidus* (vegeu descripció més detallada dels conceptes de Zn-tioneïna i de Cu-tioneïna al final d'aquest apartat). Així doncs, la informació sobre la preferència envers Zn(II) o Cu(I) *in vivo* ha d'estar d'alguna manera encriptada en la seqüència aminoacídica de les MT. D'altra banda, el petit grau d'homologia trobat entre les seqüències de les Cu-tioneïnes estudiades fa pensar que aquesta informació no només rau en el nombre i disposició de les Cys, sinó també en els altres residus no coordinants. Aquesta hipòtesi està d'acord amb l'observació recent que l'estructura, estabilitat i reactivitat dels agregats metall-tiolat en les MT depèn de la seva seqüència aminoacídica completa.⁹⁷

En conclusió, el conjunt de les dades obtingudes en aquesta Tesi Doctoral permet de proposar un nou criteri de classificació de les MT complementari als dos ja existents i més proper a la funcionalitat *in vivo* de les proteïnes enfront dels metalls fisiològics, a partir de la introducció del concepte de Cu-tioneïna i de Zn-tioneïna. Així, les Cu-tioneïnes serien les MT que resulten en la formació exclusiva d'espècies homometàl·liques de Cu(I) quan són expressades per tècniques recombinants en presència de Cu, mentre que les Zn-tioneïnes necessitarien la presència de Zn(II) per a estructurar-se *in vivo* en presència de Cu(I), donant lloc a la formació d'espècies mixtes de Cu(I) i Zn(II). Segons els resultats obtinguts aquí, MTN de *Drosophila* és una Cu-tioneïna, mentre que MT de ratolí i MTH de llamàntol són Zn-tioneïnes. De fet, d'acord amb la hipòtesi que les MT són sintetitzades inicialment a dins la cèl·lula com a les formes totalment carregades amb Zn(II), les Cu-tioneïnes presentarien la capacitat d'intercanviar totalment el Zn(II) per Cu(I), mentre que les Zn-tioneïnes només ho farien parcialment.

97. A. Muñoz, D.H. Petering, C.F. Shaw III, *Inorg. Chem.*, **2000**, *39*, 6114.

CONCLUSIONS

1. La proteïna Zn₂-MT recombinant de ratolí i els seus fragments constituents Zn₁-βMT i Zn₁-αMT donen lloc en presència de Cu(I) *in vitro* a la formació d'espècies homometal·liques de Cu(I) de la mateixa estequiometria, independentment de la forma de partida de la proteïna (apo, a pH 3, o bé holo, a pH 7). En el cas del fragment β les espècies que tenen la mateixa estequiometria també presenten la mateixa estructura. En canvi, en el cas de la proteïna sencera i el seu fragment α la presència de Zn(II) coordinat inicialment a la proteïna, (forma holo) predetermina l'estructura de les espècies homometal·liques Cu₂-MT i Cu₂-αMT que es formen, indicant un efecte plantilla del Zn(II).
2. La presència de Zn(II) enllaçat al α-sítio α és indispensable per que els dos dominis de la MT recombinant de ratolí es comportin *in vitro* de manera independent en presència de Cu(I), mentre que la pèrdua d'aquest Zn(II) comporta la pèrdua de la independència dels dominis i de la característica estructura bidominal de la proteïna. Els resultats obtinguts *in vitro* indiquen, a més, una preferència relativa però no absoluta del Cu(I) envers el domini β, invalidant el procés clàssic d'obtenició de βMT a partir d'apo-MT per reacció amb Cu(I).
3. L'expressió per primera vegada de MT de ratolí i els seus fragments constituents α i β en un medi ric en Cu ha donat lloc a la formació d'espècies homometal·liques de Cu(I) en el cas del fragment β i d'espècies mixtes de Cu(I) i Zn(II) en els altres dos casos, indicant el paper primordial del Zn(II) en l'estructuració *in vivo* de la MT de ratolí en presència de Cu(I). Els detalls que acompanyen a la formació de l'espècie (Cu,Zn)₂[(Cu,Zn)₂]₂MT indiquen, a més, que la proteïna sencera s'estructura *in vivo* en dos dominis diferenciables però no absolutament independents.
4. L'estudi per primer cop de les propietats coordinants de MTN de *Drosophila* en presència de Zn(II), Cu(I) i Zn(II) permeten de concloure que el grau de plegament que adquireix la proteïna segueix l'ordre Zn < Cd < Cu. D'altra banda, l'expressió de MTN en un medi ric en Zn resulta en la formació d'una espècie Cu₂-MTN amb un plegament molt similar al de Cu₂-βMT de ratolí i amb la presència addicional d'algunes unitats lineals Cu₂SCys₂.

CONCLUSIONS

1. La proteïna Zn₇-MT recombinant de ratolí i els seus fragments constitutius Zn₃-βMT i Zn₄-αMT donen lloc en presència de Cu(I) *in vitro* a la formació d'espècies homometàl·liques de Cu(I) de la mateixa estequiometria, independentment de la forma de partida de la proteïna (apo, a pH 3, o bé holo, a pH 7). En el cas del fragment β les espècies que tenen la mateixa estequiometria també presenten la mateixa estructura. En canvi, en el cas de la proteïna sencera i el seu fragment α la presència de Zn(II) coordinat inicialment a la proteïna (forma holo) predetermina l'estructura de les espècies homometàl·liques Cu_x-MT i Cu_x-αMT que es formen, indicant un efecte plantilla del Zn(II).
2. La presència de Zn(II) enllaçat al domini α és indispensable per què els dos dominis de la MT recombinant de ratolí es comportin *in vitro* de manera independent en presència de Cu(I), mentre que la pèrdua d'aquest Zn(II) comporta la pèrdua de la independència dels dominis i de la característica estructura bidominal de la proteïna. Els resultats obtinguts *in vitro* indiquen, a més, una preferència relativa però no absoluta del Cu(I) envers el domini β, invalidant el procés clàssic d'obtenció de βMT a partir d'apo-MT per reacció amb Cu(I).
3. L'expressió per primera vegada de MT de ratolí i els seus fragments constitutius α i β en un medi ric en Cu ha donat lloc a la formació d'espècies homometàl·liques de Cu(I) en el cas del fragment β i d'espècies mixtes de Cu(I) i Zn(II) en els altres dos casos, indicant el paper primordial del Zn(II) en l'estructuració *in vivo* de la MT de ratolí en presència de Cu(I). Els detalls que acompanyen a la formació de l'espècie (Cu₇Zn₂)^α(Cu₄Zn₁)^β-MT indiquen, a més, que la proteïna sencera s'estructura *in vivo* en dos dominis diferenciables però no absolutament independents.
4. L'estudi per primer cop de les propietats coordinants de MTN de *Drosophila* en presència de Zn(II), Cd(II) i Cu(I) permeten de concloure que el grau de plegament que adquireix la proteïna segueix l'ordre Zn < Cd < Cu. D'altra banda, l'expressió de MTN en un medi ric en Cu resulta en la formació d'una espècie Cu₈-MTN amb un plegament molt similar al de Cu₆-βMT de ratolí i amb la presència addicional d'algunes unitats lineals Cu(SCys)₂.

5. La comparació de la seqüència aminoacídica de MTN amb la de diverses MT de crustaci, fong i mamífer ha permès ampliar el segment central CXCXXXCXC definit inicialment com a característic de MT de seqüència tipus β a C-X-C-X_{5,8}-C-X_{1,2}-C-X_{2,3}-C-X-C. A més, MTN representa la descoberta de la primera MT de metazou d'elevada afinitat envers el Cu evolutivament relacionada amb les MT de fongs, i constitueix un pas evolutiu comprès entre les MT monodominials ancestrals de seqüència tipus β dels protozous i les MT bidominials dels metazous.
6. L'expressió de la MT d'*Homarus americanus* (MTH) en un medi ric en Zn(II) ha donat lloc a la formació d'una espècie Zn₆-MTH majoritària i d'una espècie Zn₇-MTH minoritària. La comparació d'aquests resultats amb els obtinguts en l'expressió en presència de Zn(II) dels dos fragments constitutius de MTH, $\beta\beta$ i $\beta\alpha$, ha permès observar que el setè Zn(II) en MTH es troba coordinat al domini $\beta\alpha$ i que ambdós dominis s'estructuren bàsicament de manera independent en la proteïna sencera.
7. A diferència del que té lloc per a Zn₇-MT de ratolí, l'addició *in vitro* de Cd(II) o Cu(I) a l'espècie Zn-MTH biosintetitzada trenca la independència de comportament dels dominis. En el cas de les valoracions de MTH i els seus fragments constitutius amb Cd(II) bàsicament té lloc un desplaçament estequiomètric de Zn(II) per Cd(II), mentre que en les valoracions amb Cu(I) s'observa la màxima capacitat per als fragments després de l'addició de 6 equivalents de Cu(I) i després de 12 equivalents en el cas de la proteïna sencera.
8. S'han expressat per primer cop les formes mutants simples $\beta\beta$ C9HMTH i $\beta\alpha$ C37HMTH i el doble mutant $\beta\alpha$ E31C/T34CMTH en un medi ric en Zn(II). L'estudi d'aquestes espècies i de les que es formen per substitució del Zn(II) per Cd(II) indiquen la pèrdua de capacitat coordinant de les formes mutants simples i l'increment de capacitat coordinant del doble mutant respecte les proteïnes silvestres corresponents. Aquests estudis també han permès determinar el paper clau de la Cys9 del fragment $\beta\beta$ en l'estructuració d'aquest domini en presència de metalls divalents.

9. L'expressió per primera vegada de MTH, els seus fragments constitutius i les tres formes mutades en un medi ric en Cu indica que el Zn(II) és essencial per a la formació d'espècies que continguin Cu(I), ja que en tots els casos s'obtenen espècies mixtes Cu_xZn_y -MTH. D'altra banda, les anàlisis de seqüència efectuades sobre les MT de diversos crustacis, fongs i insectes ha permès separar en dos grups clarament diferenciats les MT específiques per a Cu(I) de les que no ho són. El conjunt d'ambdós estudis permet concloure que MTH és una tioneïna de zinc malgrat els antecedents bibliogràfics sobre la seva afinitat envers el coure.

10. En definitiva, tots els resultats obtinguts permeten proposar una nova classificació de les MT, la qual, en base al seu comportament *in vivo* envers els metalls essencials, en fa possible la divisió en dos grans grups: les tioneïnes de zinc i les tioneïnes de coure. Així, les MT que resulten en la formació exclusiva d'espècies homometal·liques de Cu(I) quan són expressades en un medi ric en Cu són tioneïnes de coure. En canvi, les que resulten en la formació d'espècies intermetal·liques Cu_xZn_y -MT quan són expressades en les mateixes condicions són tioneïnes de zinc. Així, MTN de *Drosophila* és una tioneïna de coure, ja que el Zn(II) no té cap paper en el seu plegament *in vivo* en presència de Cu(I). Per contra, MT de ratolí i MTH de llamàntol són tioneïnes de zinc perquè aquest metall és indispensable per al seu plegament *in vivo* en presència de Cu(I).

Referències

1. M.C. Linder, C.A. Gosse, *Biochemistry of Copper*, Plenum Press, New York, 1991.
2. W. Kaim, B. Schwedenski, in: *Bioinorganic Chemistry. Inorganic Elements in the Chemistry of Life*, ed. by John Wiley & Sons Ltd., Chichester, 1994, p. 187-214.
3. K. Davies, *Nature*, 1993, 361, 58.
4. B. Sarkar, *Chem. Rev.*, 1999, 99, 2535.
5. H.X. Deng, A. Hemati, J.A. Tainer, Z. Iqbal, A. Cayabyah, W.Y. Hung, L.D. Getzoff, P. Hu, B. Herzfeldt, R.F. Roos, C. Wagner, G. Deng, E. Soriano, C. Smyrn, H.E. Parge, A. Ahmed, A.D. Roses, B.A. Hallewell, M.A. Pericak-Vance, T. Siddique, *Science*, 1993, 261, 1047.
6. D.R. Winge, C.T. Dameron, G.N. George, *Laboratory in Inorganic Biochemistry*, 1994, 10, p. 1-44.
7. a) I. Bremner, B. Young, *Biochem. J.*, 1976, 155, 631. b) I. Bremner, B. Young, *Biochem. J.*, 1976, 157, 517. c) D.R. Winge, R. Premakumar, K.V. Rajagopalan, *Arch. Biochem. Biophys.*, 1978, 183, 466. d) J.D. Gyos, I.M. Armitage, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1980, 77, 7094. e) R.W. Briggs, I.M. Armitage, *J. Biol. Chem.*, 1982, 257, 1259. f) D.H. Petering, J. Loftsgaarden, J. Schneider, B. Fowler, *Environ. Health Persp.*, 1984, 54, 73. g) I.L. Abrahams, I. Bremner, G.P. Diakun, C.D. Garner, *J. Am. Chem. Soc.*, 1986, 108, 236, 585. h) P. Chen, P. Omlor, C.F. Shaw III, K.T. Suzuki, *J. Biol. Chem.*, 1996, 271, 389.
8. D. Britel, T. Dalton, S.L.A. Samson, L. Godama, G.K. Andrews, *J. Biol. Chem.*, 1998, 273, 7127.
9. R.K. Mehra, D.R. Winge, *J. Cell. Biochem.*, 1991, 45, 30.
10. a) J. Bordax, M.H.J. Koch, H.J. Hartmann, U. Weser, *Inorg. Chim. Acta*, 1983, 78, 113. b) S.S. Narula, R.K. Mehra, D.R. Winge, I.M. Armitage, *J. Am. Chem. Soc.*, 1991, 113, 9354. c) S.S. Narula, D.R. Winge, I.M. Armitage, *Biochemistry*, 1993, 32, 6773. d) C.W. Peterson, S.S. Narula, I.M. Armitage, *FEBS Lett.*, 1996, 379, 85. e) I. Bertini, H.J. Hartmann, T. Klein, G. Liu, C. Luchinat, U. Weser, *Eur. J. Biochem.*, 2000, 267, 1008.
11. M. Margoshes, B. Vallee, *J. Am. Chem. Soc.*, 1957, 79, 4813.
12. a) J.H.R. Kagi, B.L. Vallee, *J. Biol. Chem.*, 1960, 235, 3460. b) J.H.R. Kagi, B.L. Vallee, *J. Biol. Chem.*, 1961, 236, 2435.
13. A. Nordberg, *Toxicol.*, 1998, 46, 243.
14. a) T.M. Valák, J.H.R. Kagi, *Metal Ions in Biological Systems*, 1983, 15, 213. b) P. Kille, A. Hemming, F.A. Lönney, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1994, 1205, 151. c) M.J. Stillman, *Coordination Chemistry Reviews*, 1995, 144, 461.
15. a) E.C. Foulkes, ed. *Biological Roles of Metallothionein*, Elsevier, 1982. b) J.F. Riordan, B.L. Vallee, eds. *Methods Enzymol.*, vol. 205, Academic Press, San Diego, 1991. c) M.J. Stillman, C.F. Shaw III, K.T. Suzuki, eds. *Metallothioneins*, VCH, New York, 1992.

Referències

1. M.C. Linder, C.A. Goode, *Biochemistry of Copper*, Plenum Press, New York, **1991**.
2. W. Kaim, B. Schwederski. In: *Bioinorganic Chemistry. Inorganic Elements in the Chemistry of Life*, ed. by John Wiley & Sons Ltd., Chichester, **1994**, p. 187-214.
3. K. Davies, *Nature*, **1993**, *361*, 98.
4. B. Sarkar, *Chem. Rev.*, **1999**, *99*, 2535.
5. H.X. Deng, A. Hentati, J.A. Tainer, Z. Iqbal, A. Cayabyab, W.Y. Hung, E.D. Getzoff, P. Hu, B. Herzfeldt, R.P. Roos, C. Wagner, G. Deng, E. Soriano, C. Smyth, H.E. Parge, A. Ahmed, A.D. Roses, R.A. Hallewell, M.A. Pericak-Vance, T. Siddique, *Science*, **1993**, *261*, 1047.
6. D.R. Winge, C.T. Dameron, G.N. George, *Advances in Inorganic Biochemistry*, **1994**, *10*, p. 1-48.
7. a) I. Bremner, B. Young, *Biochem. J.*, **1976**, *155*, 631. b) I. Bremner, B. Young, *Biochem. J.*, **1976**, *157*, 517. c) D.R. Winge, R. Premakumar, K.V. Rajagopalan, *Arch. Biochem. Biophys.*, **1978**, *188*, 466. d) J.D. Otvos, I.M. Armitage, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1980**, *77*, 7094. e) R.W. Briggs, I.M. Armitage, *J. Biol. Chem.*, **1982**, *257*, 1259. f) D.H. Petering, J. Loftsgaarden, J. Schneieder, B. Fowler, *Environ. Health Persp.*, **1984**, *54*, 73. g) I.L. Abrahams, I. Bremner, G.P. Diakun, C.D. Garner, S.S. Hasnain, I. Ross, M. Vašák, *Biochem. J.*, **1986**, *236*, 585. h) P. Chen, P. Onana, C.F. Shaw III, D.H. Petering, *Biochem. J.*, **1996**, *317*, 389.
8. D. Bittel, T. Dalton, S.L.A. Samson, L. Gedamu, G.K. Andrews, *J. Biol. Chem.*, **1998**, *273*, 7127.
9. R.K. Mehra, D.R. Winge, *J. Cell. Biochem.*, **1991**, *45*, 30.
10. a) J. Bordas, M.H.J. Koch, H.J. Hartmann, U. Weser, *Inorg. Chim. Acta*, **1983**, *78*, 113. b) S.S. Narula, R.K. Mehra, D.R. Winge, I.M. Armitage, *J. Am. Chem. Soc.*, **1991**, *113*, 9354. c) S.S. Narula, D.R. Winge, I.M. Armitage, *Biochemistry*, **1993**, *32*, 6773. d) C.W. Peterson, S.S. Narula, I.M. Armitage, *FEBS Let.*, **1996**, *379*, 85. e) I. Bertini, H.J. Hartmann, T. Klein, G. Liu, C. Luchinat, U. Weser, *Eur. J. Biochem.*, **2000**, *267*, 1008.
11. M. Margoshes, B. Vallee, *J. Am. Chem. Soc.*, **1957**, *79*, 4813.
12. a) J.H.R. Kägi, B.L. Vallee, *J. Biol. Chem.*, **1960**, *235*, 3460. b) J.H.R. Kägi, B.L. Vallee, *J. Biol. Chem.*, **1961**, *236*, 2435.
13. M. Nordberg, *Talanta*, **1998**, *46*, 243.
14. a) M. Vašák, J.H.R. Kägi, *Metal Ions in Biological Systems*, **1983**, *15*, 213. b) P. Kille, A. Hemmings, E.A. Lunney, *Biochimica et Biophysica Acta*, **1994**, *1205*, 151. c) M.J. Stillman, *Coordination Chemistry Reviews*, **1995**, *144*, 461.
15. a) E.C. Foulkes, ed. *Biological Roles of Metallothionein*, Elsevier, **1982**. b) J.F. Riordan, B.L. Vallee, eds. *Methods Enzimol.*, vol. 205, Academic Press, San Diego, **1991**. c) M.J. Stillman, C.F. Shaw III, K.T. Suzuki, eds. *Metallothioneins*, VCH, New York, **1992**.

16. a) J.H.R. Kägi, M.Nordberg, eds. *Metallothionein*, Birkhäuser Verlag, Basel, 1979. b) J.H.R. Kägi, Y. Kojima, eds. *Metallothionein II*, Birkhäuser Verlag, Basel, 1987. c) K.T. Suzuki, N. Imura, M. Kimura, eds. *Metallothionein III*, Birkhäuser Verlag, Basel, 1993. d) C.D. Klaassen, ed. *Metallothionein IV*, Birkhäuser Verlag, Basel, 1999.
17. a) B.L. Vallee, W. Maret. In *Metallothionein III*, Birkhäuser Verlag, Basel, 1993, p. 1-27. b) J. Kay, A. Cryer, B.M. Darke, P. Kille, W.E. Lees, C.G. Norey, J.M. Stark, *Int. J. Biochem.*, 1991, 23, 1.
18. M.G. Cherian, H.M. Chan. In *Metallothionein III*, Birkhäuser Verlag, Basel, 1993, p. 87-109.
19. S. Silver, *Biodeterior. Biodegr.*, 1991, 8, 308.
20. P.A. Binz, J.H.R. Kägi. In *Metallothionein IV*, Birkhäuser Verlag, Basel, 1999, p. 7-13.
21. Y. Wang, E.A. Mackay, M. Kurasaki, J.H.R. Kägi, *Eur. J. Biochem.*, 1994, 225, 449.
22. E. Piccini, W. Staudenmann, V. Albergoni, R. De Gabrieli, P. James, *Eur. J. Biochem.*, 1994, 226, 853.
23. C. Gruber, S. Stürzenbaum, P. Gehrig, R. Sack, P. Hunziker, B. Berger, R. Dallinger, *Eur. J. Biochem.*, 2000, 267, 573.
24. P.J. Hensbergen, M.H. Donker, M.J. Van Velzen, D. Roelofs, R.C. Van der Schors, P.E. Hunziker, N.M. Van Straalen, *Eur. J. Biochem.*, 1999, 259, 197.
25. S.R. Stuzenbaum, P. Kille, A.J. Morgan, *FEBS Let.*, 1998, 431, 437.
26. J. Villanueva, E.M. Ratilla, K. Kirimura, S. Usami. In *5th ISABC Meeting*, Corfu, Greece, 1999, Abstracts Book WU-79A.
27. M. Vašák, A. Galdes, H. Allen, O. Hill, J.H.R. Kägi, I. Bremner, B.W. Young, *Biochemistry*, 1980, 19, 416.
28. J.D. Otvos, D.H. Petering, C.F. Shaw III, *Comments Inorg. Chem.*, 1989, 9, 1.
29. a) J.D. Otvos, I.M. Armitage, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1980, 77, 7094. b) Y. Boulanger, C.M. Goodman, C.P. Forte, S.W. Fesik, I.M. Armitage, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1983, 80, 1501. c) A. Arseniev, P. Schultze, E. Wörgötter, W. Braun, G. Wagner, M. Vašák, J.H.R. Kägi, K. Wüthrich, *J. Mol. Biol.*, 1988, 201, 637. d) M. Good, R. Hollestein, P.J. Sadler, M. Vašák, *Biochemistry*, 1988, 27, 7163. e) A. Arseniev, P. Schultze, E. Wörgötter, W. Braun, G. Wagner, M. Vašák, J.H.R. Kägi, K. Wüthrich, *J. Mol. Biol.*, 1988, 201, 637. f) P. Schultze, E. Wörgötter, W. Braum, G. Wagner, M. Vašák, J.H.R. Kägi, K. Wüthrich, *J. Mol. Biol.*, 1988, 203, 251. g) B.A. Messerle, A. Schäffer, M. Vašák, J.H.R. Kägi, K. Wüthrich, *J. Mol. Biol.*, 1990, 214, 765. h) B.A. Krizek, B.T. Amann, V.J. Kilfoil, D.L. Merkle, J.M. Berg, *J. Am. Chem. Soc.*, 1991, 113, 4518. i) J.D. Otvos, K. Liu, H. Li, G. Shen, M. Basti, *Experientia Supplementum. Metallothionein*, 1993, 57. j) K. Zangger, G. Oz, J.D. Otvos, I.M. Armitage, *Prot. Sci.*, 1999, 8, 2630.
30. A.H. Robbins, D.E. McRee, M. Williamson, S.A. Collett, N.H. Xuong, W.F. Furey, B.C. Wang, C.D. Stout, *J. Mol. Biol.*, 1991, 221, 1269.
31. D.R. Winge, K.A. Miklossy, *J. Biol. Chem.*, 1982, 257, 3471.

32. J.H.R. Kägi, A. Schäffer, *Biochemistry*, **1988**, *27*, 8509.
33. B.A. Messerle, A. Schäffer, M. Vašák, J.H.R. Kägi, K. Wüthrich, *J. Mol. Biol.*, **1992**, *225*, 433.
34. W. Braun, M. Vašák, A.H. Robbins, C.D. Stout, G. Wagner, J.H.R. Kägi, K. Wüthrich, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1992**, *89*, 10124.
35. a) K.B. Nielson, C.L. Atkin, D.R. Winge, *J. Biol. Chem.*, **1985**, *260*, 5342. b) G.N. George, D. Winge, C.D. Stout, S.P. Cramer, *J. Inorg. Biochem.*, **1986**, *27*, 213. c) A. Presta, M. J. Stillman, *Chirality*, **1994**, *6*, 521. d) M.J. Stillman, A. Presta, Z. Gui, D.T. Jiang, *Metal-Based Drugs*, **1994**, *1*, 1. e) A. Presta, A.R. Green, A. Zelazowski, M.J. Stillman, *Eur. J. Biochem*, **1995**, *227*, 226. f) H. Li, J.D. Otvos, *Biochemistry*, **1996**, *35*, 13929. g) A. Presta, D.A. Fowle, M.J. Stillman, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, **1997**, 977.
36. R. Riek, B. Precheur, Y. Wang, E.A. Mackay, G. Wider, P. Guntert, A. Liu, J.H.R. Kägi, K. Wüthrich, *J. Mol. Biol.*, **1999**, *291*, 417.
37. a) J.D. Otvos, R.W. Olafson, I.M. Armitage, *J. Biol. Chem.*, **1982**, *257*, 2427. b) Z. Zhu, E.F. De Rose, G.P. Mullen, D.H. Petering, C.F. Shaw III, *Biochemistry*, **1994**, *33*, 8858. c) Z. Zhu, D.H. Petering, C.F. Shaw III, *Inorg. Chem.*, **1995**, *34*, 4477. d) S.S. Narula, M. Brouwer, Y. Hua, I.M. Armitage, *Biochemistry*, **1995**, *34*, 620.
38. J. Overnell, M. Good, M. Vašák, *Eur. J. Biochem.*, **1988**, *172*, 171.
39. a) Núria Romero Isart, *Treball de Recerca*, Facultat de Ciències, UAB, **1995**. b) M. Capdevila, N. Romero, N. Cols, S. Atrian, M.J. Stillman, R. González-Duarte, P. González-Duarte, *Anales de Química, Int. Ed.*, **1996**, *92*, 199. c) M. Capdevila, N. Romero, N. Cols, S. Atrian, R. González-Duarte, P. González-Duarte, *Cell. Mol. Life Sci.*, **1997**, *53*, 681. d) N. Cols, N. Romero, M. Capdevila, B. Oliva, S. Atrian, R. González-Duarte, P. González-Duarte, *J. Inorg. Biochem.*, **1997**, *68*, 157. e) S. Atrian, R. Bofill, M. Capdevila, N. Cols, P. González-Duarte, R. González-Duarte, A. Leiva, O. Palacios, N. Romero-Isart. In *Metallothionein IV*, Birkhäuser, Verlag, Basel, **1999**, p. 55-61. f) N. Cols, N. Romero-Isart, R. Bofill, M. Capdevila, P. González-Duarte, R. González-Duarte, S. Atrian, *Prot. Engng.*, **1999**, *12*, 265.
40. Àngels Leiva Presa, *Treball de Recerca*, Facultat de Ciències, UAB, **1997**.
41. a) Òscar Palacios Bonilla, *Treball de Recerca*, Facultat de Ciències, UAB, **1997**. b) R. Bofill, O. Palacios, M. Capdevila, N. Cols, R. González-Duarte, S. Atrian, P. González-Duarte, *J. Inorg. Biochem.*, **1999**, *73*, 57.
42. M.G. Cherian, S.B. Howell, N. Imura, C.D. Klaassen, J. Koropatnik, J.S. Lazo, M.P. Waalkes, *Toxic. Appl. Pharm.*, **1994**, *126*, 1.
43. K.T. Tamai, E.B. Gralla, L.M. Ellerby, J.S. Valentine, D.J. Thiele, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1993**, *90*, 8013.
44. S.K. De, M.T. McCaster, G.K. Andrews, *J. Biol. Chem.*, **1990**, *265*, 15267.
45. a) B.L. Vallee, *Neurochem. Int.*, **1995**, *27*, 23. b) R.D. Palmiter, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1998**, *95*, 8428. c) W. Maret, *J. Nutrition*, **2000**, *130*, 1455S. R.D. Palmiter, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1998**, *95*, 8428.
46. W.E.N.D. Evering, S. Haywood, I. Bremner, A.M. Wood, J. Trafford, *Chem. Biol. Interactions*, **1991**, *78*, 297.
47. W. Maret, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1994**, *91*, 237.

48. R.D. Palmiter, S. Findley, *EMBO J.*, **1995**, *14*, 639.
49. T. Wlostowski, *Biometals*, **1993**, *6*, 71
50. R.H. Burdon, *Free Rad. Biol. Med.*, **1995**, *18*, 775.
51. J. Zeng, R. Heuchel, W. Schaffner, J.H.R. Kägi, *FEBS Let.*, **1991**, *279*, 310.
52. E.J. Kasarskis, W.D. Ehmann, W.R. Markesbery, *Essential and Toxic Trace Elements in Human Health and Disease: an update*, In Prasad S.A. Ed., New York, **1993**, p. 299-310.
53. S.L. Kelley, A. Basu, B.A. Teicher, M.P. Hacker, D.H. Hamer, J.S. Lazo, *Science*, **1988**, *241*, 1813.
54. a) X. Yu, Z. Wu, C. Fenselau, *Biochemistry*, **1995**, *34*, 3377. b) J. Zaia, L. Jiang, M.S. Han, J.R. Tabb, Z. Wu, D. Fabris, C. Fenselau, *Biochemistry*, **1996**, *35*, 2830.
55. a) Y. Uchida, K. Takio, K. Titani, Y. Ihara, M. Tomonaga, *Neuron.*, **1991**, *7*, 3337. b) R.D. Palmiter, S.D. Findley, T.E. Whitmore, D.M. Durnam, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1992**, *89*, 6333. c) S. Tsuji, H. Kobayashi, Y. Uchida, Y. Yhara, T. Miyatake, *EMBO J.*, **1992**, *11*, 4843.
56. J.C. Erickson, A.K. Sewell, L.T. Jensen, D.R. Winge, R.D. Palmiter, *Brain Res.*, **1994**, *649*, 247.
57. C.J. Quaipe, S.D. Findley, J.C. Erickson, G.J. Froelick, E.J. Kelly, B.P. Zambrowicz, R.D. Palmiter, *Biochemistry*, **1994**, *33*, 7250.
58. a) J. Hidalgo, L. Campmany, M. Borràs, J.S. Garvey, A. Armario, *Am. J. Physiol.*, **1988**, E518. b) C.T. Aravindakumar, J. Ceulemans, M. De Ley, *Biochem. J.*, **1999**, *344*, 253. c) R.I. Viner, T.D. Williams, L. Schöneich, *Biochemistry*, **1999**, *38*, 12408.
59. Paul Anthony Presta, *PhD. Theses*, University of Western Ontario, Faculty of Graduate Studies, **1995**.
60. K. Zangger, G. Öz, J.D. Otvos, I.M. Armitage, *Prot. Sci.*, **1999**, *8*, 2630.
61. D.R. Winge, C.T. Dameron. In *Metallothionein III*, Birkhäuser Verlag, Basel, **1993**, p. 381-397.
62. a) M.J. Stillman, W. Cai, A.J. Zelazowski, *J. Biol. Chem.*, **1987**, *262*, 4538. b) M.J. Stillman, A.J. Zelazowski, *J. Biol. Chem.*, **1988**, *263*, 6128.
63. a) K.B. Nielson, D.R. Winge, *J. Biol. Chem.*, **1984**, *259*, 4941. b) K.B. Nielson, D.R. Winge, *J. Biol. Chem.*, **1985**, *260*, 8698. c) F.J. Kull, H.F. Reed, T.E. Elgren, T.L. Ciardelli, D.E. Wilcox, *J. Am. Chem. Soc.*, **1990**, *112*, 2291. d) P. Chen, A. Muñoz, D. Nettesheim, C.F. Shaw III, D.H. Petering, *Biochem. J.*, **1996**, *317*, 395.
64. B.A. Messerle, M. Bos, A. Schäffer, M. Vašák, J.H.R. Kägi, K. Wüthrich, *J. Mol. Biol.*, **1990**, *214*, 781.
65. a) Y.J. Li, U. Weser, *Inorg. Chem.*, **1992**, *31*, 5526. b) S. Matsumoto, S. Nakayama, Y. Nishiyama, Y. Okada, K.S. Min, S. Onosaka, K. Tanaka, *Chem. Pharm. Bull.*, **1992**, *40*, 2694. c) S. Matsumoto, Y. Nishiyama, Y. Okada, K.S. Min, S. Onosaka, K. Tanaka, *Chem. Pharm. Bull.*, **1992**, *40*, 2701.
66. J.L. Jiang, M. Vašák, B.L. Vallee, W. Maret, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2000**, *97*, 2503.

67. K.I. Rhee, K.S. Lee, P.C. Huang, *Prot. Engng.*, **1990**, *3*, 221.
68. a) J.H.R. Kägi, *Methods Enzymol.*, **1991**, *205*, p. 613-626. b) J.D. Otvos, X. Liu, H. Li, G. Shen, M. Basti. In *Metallothionein III*, Birkhäuser Verlag, Basel, **1993**, p. 57-74.
69. G.L. Ellman, *Archives Biochem. Biophys.*, **1959**, *82*, 70.
70. K.D. Kroncke, K. Fehsel, T. Schmidt, F.T. Zenke, I. Dasting, J.R. Wesener, H. Bettermann, K.D. Breunig, V. Kolb-Bachofen, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1994**, *200*, 1105.
71. A. Richter, U. Weser, *Inorg. Chim. Acta*, **1988**, *151*, 145.
72. Y. Nishiyama, S. Nakayama, Y. Okada, K. S. Min, S. Onosaka, K. Tanaka, *Chem. Pharm. Bull.*, **1990**, *38*, 2112.
73. a) H.J. Hartmann, Y.J. Li, U. Weser, *Biometals*, **1992**, *5*, 187. b) A.K. Sewell, L.T. Jensen, J.C. Erickson, R.D. Palmiter, D.R. Winge, *Biochemistry*, **1995**, *34*, 4740.
74. a) M. Beltramini, K. Lerch, *Biochemistry*, **1983**, *22*, 2043. b) U. Weser, H.J. Hartmann, *Biochim. Biophys. Acta*, **1988**, *953*, 1. c) Z. Sayers, P. Brouillon, C.E. Vorgias, H.F. Nolting, C. Hermes, M.H.J. Koch, *Eur. J. Biochem.*, **1993**, *212*, 521.
75. a) P.K. Pan, F. Hou, C.W. Cody, P.C. Huang, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1994**, *202*, 621. b) C.W. Cody, P.C. Huang, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1994**, *202*, 954.
76. Y. Wang, D. Hess, P.E. Hunziker, J.H.R. Kägi, *Eur. J. Biochem.*, **1996**, *241*, 835.
77. M. Vašák, J.H.R. Kägi, H.A.O. Hill, *Biochemistry*, **1981**, *20*, 2852.
78. C.K. Jørgensen, *Prog. Inorg. Chem.*, **1970**, *12*, 101.
79. A.B.P. Lever, *Inorganic Electronic Spectroscopy (2nd ed.)*, Elsevier, **1984**, p. 218-223.
80. E.L. Eliel, S.H. Wilen, *Stereochemistry of Organic Compounds*, John Wiley & Sons, New York, **1994**, p. 992-1080.
81. H. Willner, M. Vašák, J.H.R. Kägi, *Biochemistry*, **1987**, *26*, 6287.
82. L. Esteban, *La Espectrometría de Masas en Imágenes*, ACK Editores, **1993**, p. 175-185.
83. P.A. Brady, J.K.M. Sanders, *New J. Chem.*, **1998**, 411.
84. X. Yu, M. Wojciechowski, C. Fenselau, *Anal. Chem.*, **1993**, *65*, 1355.
85. R. Lobinski, H. Chassaingne, J. Szpunar, *Talanta*, **1998**, *46*, 271.
86. J. Bongers, C.D. Walton, D.E. Richardson, J.U. Bell, *Anal. Chem.*, **1988**, *60*, 2683.
87. M. Kurasaki, F. Yamasaki, M. Suzuki-Kurasaki, Y. Kojima, *Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol.*, **1996**, *92*, 225.
88. A.R. Green, M.J. Stillman, *Inorg. Chim. Acta*, **1994**, *226*, 275.
89. D.R. Winge, *Methods Enzymol.*, **1991**, *205*, p. 438-447.
90. A.Y.C. Law, M.G. Cherian, M.J. Stillman, *Biochim. Biophys. Acta*, **1984**, *784*, 53
91. M. Durliat, F. Bonneton, E. Boissonneau, M. André, M. Wegnez, *Biometals*, **1995**, *8*, 339.

92. M. Nemer, D.G. Wilkinson, E.C. Travaglini, E.J. Sternberg, T.R. Butt, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1985**, 82, 4994.
93. M. Brouwer, D.R. Winge, W.R. Gray, *J. Inorg. Biochem.*, **1989**, 35, 289.
94. a) R.W. Olafson, R.G. Sim, K.G. Boto, *Biochem. Physiol.*, **1979**, 62B, 407. b) J. Overnell, E. Trewhella, *Comp. Biochem. Physiol.*, **1979**, 64C, 69. c) J. Overnell, *Comp. Biochem. Physiol.*, **1982**, 73B, 547. d) C.L. Chou, R.D. Guy, J.F. Uthe, *Sci. Total Environm.*, **1991**, 105, 41. e) Z. Zhu, M. Goodrich, A.A. Isab, C.F. Shaw III, *Inorg. Chem.*, **1992**, 31, 1662. f) K.L. Pedersen, S.N. Pedersen, P. Højrup, J.S. Andersen, P. Roepstorff, J. Knudsen, M.H. Delepege, *Biochem. J.*, **1994**, 297, 609.
95. D.R. Winge. In: *Methods Enzymol.*, J.F. Riordan, B.L. Vallee, eds., Academic Press, San Diego, **1991**, 205, p. 458-469.
96. N. Romero-Isart, N. Cols, J. Termansen, J.Ll. Gelpí, R. González-Duarte, S. Atrian, M. Capdevila, P. González-Duarte, *Eur. J. Biochem.*, **1999**, 259, 519.
97. A. Muñoz, D.H. Petering, C.F. Shaw III, *Inorg. Chem.*, **2000**, 39, 6114.

Annex I. Espectroscòpia d'emissió aplicada a l'estudi de metal-lotioneïnes de Cu(I)

Es ben conegut que els tiolats de metalls d¹⁰, tant en forma cristal·lina com amorfa, són sovint luminescents a temperatures baixes.¹ Per tant, és d'esperar que les MT de Cu(I) també presentin luminescència. Efectivament, Beltramini i Lerch van ser els primers en observar la luminescència taronja de Cu-MT de llevat a temperatura ambient l'any 1981.² Estudis posteriors han demostrat que l'excitació en la zona 250-310 nm de les Cu-MT de mamífer tant a temperatura ambient³ com a temperatures criogèniques (77 K)^{4,5,6,7} de les Cu-MT de llevat a temperatura ambient^{8,9} provoca luminescència en la zona 550-650 nm. Així doncs, la luminescència a 550-650 nm pot ser considerada com una propietat general de les MT de Cu(I). D'altra banda, el temps de vida mitjà d'aquestes emissions és generalment de l'ordre de 100 microsegons.^{10,11}

Stillman *et al.* han observat que durant la valoració de Zn-MT nativa de fetge de conill amb Cu(I) a pH 7 la intensitat d'emissió depèn principalment de dos factors: la relació molar Cu(I):Cys i la temperatura en la qual es realitza l'experiment,¹² el darrer factor a causa del fet que aquest pot condicionar el camí de reacció en funció de si es treballa en condicions de control cinètic (10 °C) o termodinàmic (40 °C).

ANNEXOS

A més, es coneix que les molècules de solvent bloquegen la micelitat d'emissió dels agregats Cu-S (efecte *quenching*) i que com més compacta és una estructura menys accessible és a les molècules de solvent. També la presència d'oxigen atmosfèric en dissolució desactiva el fenomen d'emissió, de manera que totes les operacions de manipulació de mostra han de ser efectuades en condicions anaeròbiques estrictes. Per tant, el resultat *quenching* o quencing entre la intensitat d'emissió i els mols de Cu(I) afegits creix de manera proporcional al grau de compactat que estigui adquirint la MT, sempre i quan es treballi en condicions anaeròbiques estrictes.

1. J.M. Anglin, W.H. Jones, A.I. Raz, R.M. Sayre, *Photochem Photobiol.*, 1971, 13, 276.
2. M. Beltramini K. Lerch, *Anal. Lett.*, 1981, 127, 201.
3. a) M.J. Stillman, *J. Inorg. Nucl. Energy Chem.*, 1984, 19, 163; b) K. Mungler, U.A. German, M. Beltramini, D. Nischewitz, G. Böhler, Eberle, J.H.R. Klug, K. Lerch, *J. Biol. Chem.*, 1985, 260, 10032; c) E. Guevara, J. Beltramini, A.R. Green, E. Ough, M.J. Stillman, *Inorg. Chim. Acta* 1988, 131, 133; d) M.J. Stillman, E. Guevara, in *Molecular Enzymol.*, J.F. Riordan, H.L. Vallee, eds., Academic Press, San Diego, 1988, p. 349; e) M.J. Stillman, in *Metalloproteins*, M.J. Stillman, Ed., John & J. Wiley, eds., 1989, New York, 1991, p. 55-127; f) A.R. Green, A. Trevis, Z. Guevara, M.J. Stillman, *Inorg. Chim. Acta*, 1994, 214, 439.
4. a) N.J. Stillman, *J. Inorg. Nucl. Energy Chem.*, 1989, 237, 263; b) M.J. Stillman, A.J. Zdzienicka, J. Szymanski, *J. Inorg. Nucl. Chem.*, 1989, 263, 275.
5. J.R. Casas-Figol, N. Ho, M. Hogen, S.A. Cooper, *Anal. Lett.*, 1993, 266, 201.

Annex I. Espectroscòpia d'emissió aplicada a l'estudi de metal·lotioneïnes de Cu(I)

És ben conegut que els tiolats de metalls d¹⁰, tant en forma cristal·lina com amorfa, són sovint luminescents a temperatures baixes.¹ Per tant, és d'esperar que les MT de Cu(I) també presentin luminescència. Efectivament, Beltramini i Lerch van ser els primers en observar la luminescència taronja de Cu-MT de llevat a temperatura ambient l'any 1981.² Estudis posteriors han demostrat que l'excitació en la zona 250-310 nm de les Cu-MT de mamífer tant a temperatura ambient³ com a temperatures criogèniques (77 K)^{3d, e, 4} i de les Cu-MT de llevat a temperatura ambient^{3d, e, 5} provoca luminescència en la zona 550-650 nm. Així doncs, la luminescència a 550-650 nm pot ser considerada com una propietat general de les MT de Cu(I). D'altra banda, el temps de vida mitja d'aquestes emissions és generalment de l'ordre de 100 microsegons.^{3d, e}

Stillman *et al* han observat que durant la valoració de Zn₇-MT nativa de fetge de conill amb Cu(I) a pH 7 la intensitat d'emissió depèn principalment de dos factors: la relació molar Cu(I):Cys i la temperatura en la qual es realitza l'experiment,^{3f} el darrer factor a causa del fet que aquest pot condicionar el camí de reacció en funció de si es treballa en condicions de control cinètic (10 °C) o termodinàmic (40 °C).

A més, es coneix que les molècules de solvent bloquegen la intensitat d'emissió dels agregats Cu-S (efecte *quenching*) i que com més compacta és una estructura menys accessible és a les molècules de solvent. També la presència d'oxigen atmosfèric en dissolució desactiva el fenomen d'emissió, de manera que totes les operacions de manipulació de mostra han de ser efectuades en condicions anaeròbiques estrictes. Per tant, el rendiment quàntic o quocient entre la intensitat d'emissió i els mols de Cu(I) afegits creix de manera proporcional al grau de compacitat que estigui adquirint la MT, sempre i quan es treballi en condicions anaeròbiques estrictes.

1 J H Anglin, W H Batten, A I Raz, R M Sayre, *Photochem Photobiol*, **1971**, *13*, 279

2 M Beltramini, K Lerch, *FEBS Let*, **1981**, *127*, 201

3 a) M J Stillman, J A Szymanska, *Biophys Chem*, **1984**, *19*, 163 b) K Munger, U A Germann, M Beltramini, D Niedermann, G Baitella-Eberle, J H R Kagi, K Lerch, *J Biol Chem*, **1985**, *260*, 10032 c) Z Gasyna, A Zelazowski, A R Green, E Ough, M J Stillman, *Inorg Chim Acta* **1988**, *153*, 115 d) M J Stillman, Z Gasyna In *Methods Enzymol*, J F Riordan, B L Vallee, eds, Academic Press, San Diego, **1991**, *205*, 540 e) M J Stillman In *Metallothioneins*, M J Stillman, C F Shaw, K T Suzuki, eds, VCH, New York, **1992**, p 55-127 f) A R Green, A Presta, Z Gasyna, M J Stillman, *Inorg Chem*, **1994**, *33*, 4159

4 a) M J Stillman, Z Gasyna, A J Zelazowski, *FEBS Let*, **1989**, *257*, 283 b) M J Stillman, A J Zelazowski, J Szymanska, Z Gasyna, *Inorg Chim Acta*, **1989**, *161*, 275

5 J R Casas-Finet, S Hu, D Hamer, R L Karpel, *FEBS Let*, **1991**, *281*, 205

En el cas concret de la MT de mamífer, Stillman *et al.* han observat que la intensitat d'absorció màxima es dona per 12 equivalents de Cu(I) afegits independentment de la temperatura de treball,^{3f} és a dir, que l'espècie Cu₁₂-MT és la que posseeix l'estructura més compacta de totes les que es formen al llarg de la valoració. A més, tant a 10 °C com a 40 °C la intensitat d'emissió decreix exponencialment a partir del 12è equivalent de Cu(I) afegit, fet que indica que els dos agregats Cu-S presents en l'espècie Cu₁₂-MT s'obren i ràpidament esdevenen accessibles al solvent quan s'afegeixen més equivalents de Cu(I).^{3f}

Pel que fa a l'enregistrament d'espectres d'emissió a 77 K, aquests han de ser normalitzats per llur àrea total, donat que la intensitat d'emissió en estat sòlid depèn de la forma i mida dels microcristalls obtinguts, normalment força variables quan es treballa amb solucions proteiques aquoses. Les lectures d'emissió a 77 K (fosforescència) poden proporcionar informació addicional respecte les lectures a temperatura ambient i, a més, permeten calcular fàcilment el temps de vida mitja ($t_{1/2}$) per a cadascuna de les transicions observables.

En molts casos, els espectres d'emissió enregistrats a 77 K permeten l'observació de bandes no observables a temperatura ambient. Així, Vašák *et al.* han pogut observar per a la Cu-MT de mamífer a 77 K una banda a 425 nm corresponent a transicions d-s intermetàl·liques a dins dels agregats Cu-S, a part de la banda a 610 nm característica de la transferència de càrrega dels lligands tiolat als àtoms de Cu.⁶ Mentre que la transició al voltant de 610 nm és observable a temperatura ambient, la transició més energètica no ho és. El motiu d'aquest fenomen és la diferència en els temps de vida mitja dels estats excitats responsables de cadascuna de les emissions. En els tiolats metàl·lics i, per tant, també en les MT, les transicions intermetàl·liques normalment presenten uns temps de vida mitja sensiblement inferiors als corresponents a les transicions lligand-metall. Aquest fet explicaria l'absència de la banda a 425 nm a temperatura ambient, ja que els processos de desactivació del corresponent estat excitat a través dels xocs amb les molècules de solvent són ràpids i n'impedeixen la seva observació. En canvi, a 77 K les molècules de solvent són molt més estàtiques i, en conseqüència, com que l'energia tèrmica és molt baixa la desactivació és pràcticament nul·la.

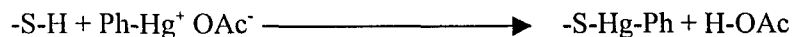
6. D.L. Pountney, I. Schauwecker, J. Zarn, M. Vašák, *Biochem.*, 1994, 33, 9699.

D'altra banda, és conegut que la intensitat de la banda a 425 nm és major com més propers es troben entre si els àtoms de Cu.⁶ Així doncs, la relació d'intensitats d'emissió normalitzades a 610 i 425 nm (I_{610}/I_{425}) ens permetrà saber com de propers estan els àtoms de Cu entre si. Per tant, com més petita sigui aquesta relació més propers estaran els àtoms metàl·lics. En el cas de voler comparar diferents espècies Cu-MT a partir del corresponent valor I_{610}/I_{425} , és necessari que els temps de vida mitja de les dues transicions siguin comparables per a les diferents espècies, donat que la intensitat d'emissió d'una transició determinada depèn del valor de $t_{1/2}$ del respectiu estat excitat. En el cas que així sigui, es podrà saber, per exemple, quina espècie Cu-MT presenta els àtoms de Cu més propers entre si.

Resumint, cal destacar l'extremada sensibilitat que presenta la tècnica d'emissió a temperatura ambient envers el grau de formació dels agregats Cu-S en les MT i la seva capacitat d'excloure molècules de solvent. Així doncs, l'anàlisi de les variacions de les intensitats d'emissió al llarg de qualsevol valoració de MT o fragments amb Cu(I) permet disposar d'informació útil per a poder conèixer el grau de plegament de la proteïna en els diferents estadis de la valoració. D'altra banda, la fosforescència a 77 K proporciona informació addicional sobre les distàncies entre àtoms de Cu. És per aquests motius que es va decidir d'emprar la tècnica d'espectroscòpia d'emissió en aquest treball.

Annex II. Determinació electroquímica del grau d'oxidació de metal·lotioneïnes de Cu(I)

Durant el treball experimental desenvolupat durant aquesta Tesi es va presentar la necessitat de determinar el grau d'oxidació de les metal·lotioneïnes expressades en un medi ric en Cu. Donat que el mètode d'Ellman només és vàlid per a la determinació del grau d'oxidació de proteïnes que continguin metalls divalents com Zn(II) o Cd(II), però no monovalents com Cu(I),¹ es van cercar mètodes alternatius en el cas de les Cu-MT. L'única alternativa viable que es va trobar és el mètode desenvolupat per D.H. Petering i G. Palmer,² consistent en una valoració voltamperomètrica amb acetat de fenilmercuri (Ph-Hg-OAc) de la proteïna dissolta en Tris/HCl 10 mM i KCl 0.1 M a pH 8.6 sota condicions anaeròbiques. Aquests autors partiren de la base que només els grups -SH reduïts de les Cys podien reaccionar estequiomètricament amb el Ph-Hg-OAc per tal de donar el corresponent derivat de fenilmercuri, mentre que els grups S-S no havien de reaccionar:



D'aquesta manera, van poder determinar el grau d'oxidació d'una ferredoxina que contenia 5 Cys coordinades a un àtom de Fe a partir de la monitorització del senyal originat pel Ph-Hg⁺ en excés present a partir del punt d'equivalència de la valoració, que apareixia a -0.5 V en un elèctrode de gotes de mercuri (EGM) respecte l'elèctrode de Calomelans saturat (ECS).² Així doncs, el nombre de mols d'acetat de fenilmercuri gastat corresponia al nombre de mols de Cys reduïdes. Posteriorment, els mateixos autors varen aplicar aquesta tècnica per a la determinació del grau d'oxidació d'una Cu,Zn-MT nativa de fetge de vedell.³

No obstant, la validació d'aquest mètode per a Zn₄-αMT recombinant de ratolí obtinguda en el nostre grup de recerca, d'oxidació coneguda a partir del mètode d'Ellman, va resultar insatisfactori, donant lloc a diferents valors del punt

-
1. D.R. Winge. In: *Methods Enzymol.*, J.F. Riordan, B.L. Vallee, eds., Academic Press, San Diego, 1991, 205, p. 458-469.
 2. D.H. Petering, G. Palmer, *Arch. Biochem. Biophys.*, 1970, 141, 456.
 3. P. Chen, P. Onana, C.F. Shaw III, D.H. Petering, *Biochem. J.*, 1996, 317, 389.

d'equivalència en funció de les condicions del medi de reacció. Així, en un medi Tris/HCl 10 mM, KCl 0.1 M (pH 7) s'obtingué el punt d'equivalència per 13 equivalents d'acetat de fenilmercuri. Donat que aquest valor era superior al valor esperable d'11, es va creure que potser existien impediments estèrics que dificultaven la coordinació dels grups Ph-Hg⁺ a les Cys. Per això es repetí l'experiment afegint guanidina 3M al medi, per tal de desnaturalitzar la proteïna i afavorir la coordinació de l'agent valorant a les Cys. No obstant, el punt d'equivalència tornà a ser el mateix que en el cas anterior. Llavors es decidí d'afavorir l'alliberament del Zn(II) de la proteïna per tal de facilitar encara més la coordinació del fenilmercuri, de manera que es treballà amb un medi CH₂ClCOO⁻/CH₂ClCOOH 10 mM, KCl 0.1 M (pH 3), i en presència també de guanidina 3M. En aquest cas, però, s'obtingueren valors del nombre de Cys reduïdes menors que el trobat pel mètode d'Ellman.

Es feren llavors valoracions a pH 7 de les Cu,Zn-MT de llamàntol obtingudes al llarg d'aquesta Tesi Doctoral, però totes varen resultar insatisfactòries, donant uns valors dels punts d'equivalència que no permetien explicar els continguts de Zn i Cu trobats per ICP-AES. En canvi, proves efectuades amb glutatió, cisteïna, Zn₃-βMT recombinant i Cu₆-βMT reconstituïda de ratolí resultaren exitoses: en els dos primers casos s'obtingueren sempre punts d'equivalència per 1 equivalent d'agent valorant afegit independentment del pH del medi i de la presència o no de KCl, mentre que en els dos darrers casos s'obtingué un valor reproduïble de 9.5 Cys reduïdes per proteïna, que concordava força satisfactòriament amb el valor deduït pel mètode d'Ellman de 9 Cys reduïdes per proteïna.

Després d'analitzar tots aquests resultats, es va arribar a la conclusió que només en el cas de MT que no presenten doblats Cys-Cys en la seva seqüència (i.e., el fragment βMT de ratolí o MTN de *Drosophila*) es pot assegurar que la reacció de coordinació de Ph-Hg⁺ a les Cys transcorre de manera estequiomètrica, independentment del metall inicialment coordinat a la proteïna (Zn i/o Cu). En aquests casos, doncs, es pot determinar el grau d'oxidació de la proteïna mitjançant aquest mètode. Desgraciadament, un cop s'hagué arribat a aquesta conclusió no restava MTN expressada en un medi ric en Cu per tal de poder-ne determinar el seu grau d'oxidació,

tot i que les dades d'ICP semblaven indicar un grau d'oxidació nul o molt baix.⁴ Contràriament, en el cas de la presència de doblets Cys-Cys (i.e., totes les MT de llamàntol sintetitzades i la MT de ratolí i el fragment α) no es pot determinar amb certesa el grau d'oxidació de la proteïna, ja que l'estequiometria de la reacció de coordinació de Ph-Hg⁺ depèn de les condicions del medi, probablement a causa de la possibilitat de coordinació pontal d'algun dels àtoms de Hg a dues Cys contigües.



4. N. Cols, N. Romero-Isart, R. Bofill, M. Capdevila, P. González-Duarte, R. González-Duarte, S. Atrian, *Prot. Engng.*, **1999**, *12*, 265.



Servei de Biblioteques

Reg 150076056 --

Sg TUAB/5542 --

