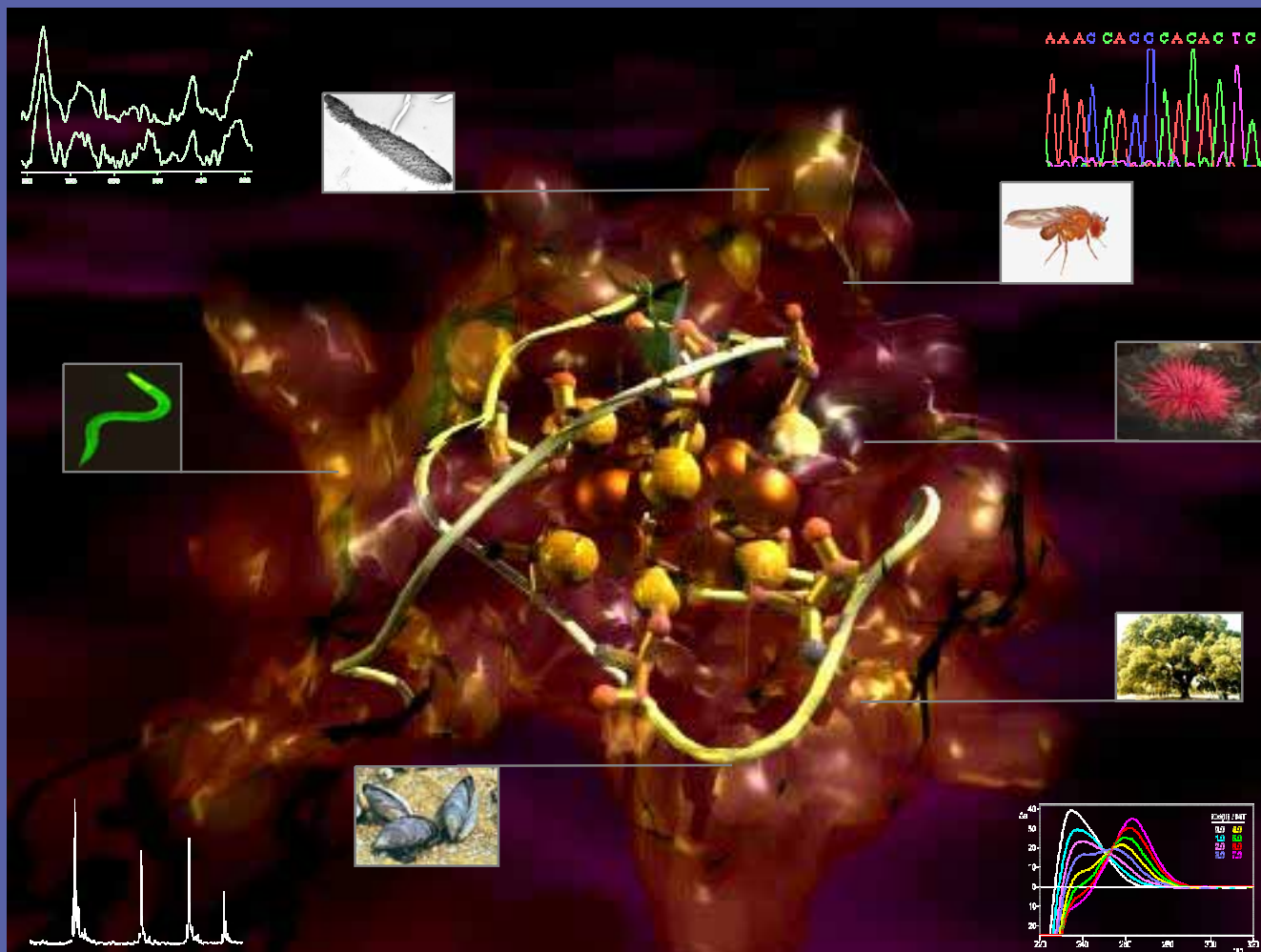


Estudi de la relació estructura/funció en Metal·lotioneïnes d'Invertebrats, Protozous i Plantes



Jordi Domènech Casal

TESI DOCTORAL

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

1- UN ESTUDI *FUNCIONAL* DE LES METAL·LOTIONEÏNES

En l'estudi de la funció d'un gen o proteïna, existeixen dues aproximacions bàsiques:

Una consisteix en alterar la seva estructura o participació en el sistema en què presumptament participa, i veure què succeeix, en cas de succeir alguna cosa (és l'anomenada genètica reversa i consisteix en l'estudi de mutants puntuals o organismes *Knock-Out*). L'altra, de vessant més descriptiva, es centra en estudiar les propietats intrínseques d'aquest gen o proteïna per intentar establir quins són els seus camps d'acció potencials. Mentre la primera corre el risc de topar amb efectes que no tenen res a veure amb el funcionament habitual del sistema, o dificultats en atribuir la xarxa de relacions causa-efecte, la segona corre el risc de descriure allò que són estrictament propietats, i no pas funcions, de l'element estudiat. Habitualment, les dues aproximacions es complementen en qualsevol procés de recerca, i tot i que aquesta tesi està plantejada fonamentalment a descriure les potencialitats funcionals de les MT, planteja també alguns casos d'estudi per anàlisi de mutants.

La metodologia adoptada permet obtenir agregats metall-MT sintetitzats en cèl·lules d'*E.coli* i, per tant, en un ambient fisiològic representatiu de l'ambient en què es sintetitzen aquestes MT en forma nativa. Això suposa que els agregats metall-MT obtinguts són formes estables en ambients intracel·lulars i, per tant, molt més representatius d'aquells que es conformin en els respectius organismes originals que no pas formes obtingudes per síntesi química i/o per reconstitució "*in vitro*" de complexos metàl·lics a partir de pèptids apo als quals s'han afegit metalls. Caldria tenir en compte, però dos aspectes generals relacionats amb aquesta metodologia: 1) Moltes proteïnes presenten habitualment processos de modificació post-traduccional La majoria dels mecanismes pels quals es duen a terme aquests processos en cèl·lules eucariotes (de les que

són originàries les MT estudiades en aquesta tesi) no es troben actius en cèl·lules procariotes (en què s'han sintetitzat els agregats metall-MT estudiats en aquesta tesi). Tot i això, s'ha descrit que aquests processos no prenen habitualment part en la formació dels agregats metall-MT, per la qual cosa podem considerar que aquesta limitació no aplica a l'estudi de MT recombinants, i 2) El procés de síntesi implica l'addició d'altres concentracions de metalls (Zn, Cu o Cd) en el medi, possiblement allunyades de les concentracions en què aquestes MT es trobarien *in vivo*. Tot i això, dades d'altres autors indiquen que el contingut intracel·lular de metalls és molt similar entre diferents organismes (Finney & O'Halloran, 2003).

Tot seguit es discuteixen de manera global els resultats obtinguts en quatre apartats: la relació entre l'estructura i el comportament coordinant de les MT (la seva funció molecular), la relació entre el comportament coordinant i les dades de què es disposa de la "funció fisiològica", el paper dels sulfurs en les MT, i les aportacions metodològiques a l'estudi de les MT.

2- LA RELACIÓ ESTRUCTURA-PROPIETATS COORDINANTS EN MT

Tot seguit es comenta, de forma general i transversal, les relacions que es poden extreure d'aquesta tesi entre els diferents nivells estructurals i les propietats coordinants de les MT estudiades. Aquestes propietats coordinants inclouen tant les preferències de coordinació metàl·lica com la capacitat d'unió a metalls, participació de lligands exògens i estructures primàries, secundàries, terciàries i quaternàries.

2.1- L'estructura primària i les preferències de coordinació metàl·lica

Els principals elements d'estructura primària d'una MT que poden tenir importància en el seu comportament coordinant són la mida, el nombre i la

disposició de les Cys, la presència de les His i el possible paper d'altres aminoàcids.

2.1.1- La mida del pèptid MT i la quantitat de cisteïnes

En aquesta tesi s'ha estudiat el comportament coordinant de pèptids MT amb mides molt diferents, des de la MT de *Tetrahymena*, amb 107 aminoàcids i 31 Cys, fins al fragment C-terminal de QsMT de *Quercus suber*, anomenat pèptid C18, constituït per 18 residus, dels quals 6 són Cys. De forma general, s'aprecia que els pèptids més petits (C18 i N25 de QsMT) presenten comportaments peculiars com la formació de dímers que es poden atribuir a la seva reduïda mida.

La MT més petita coneguda és la de *Neurospora crassa* (NcMT), amb 25 aminoàcids i 7 Cys, que uneix 6 Cu(I) (Lerch, 1980). Els nostres resultats indiquen que C18 (6 Cys) dimeritza quan s'enllaça a Cu(I), mentre N25 (8 Cys) no necessita fer-ho per a unir aquest mateix metall. La dimerització en C18 indicaria que aquest és un pèptid massa petit per conformar agregats Cu(I)-MT estables en un entorn fisiològic, de forma monomèrica.

Aquest resultat confirmaria que la MT de *Neurospora* no només és la MT més petita que es coneix, sinó que possiblement sigui la MT més petita que pot unir Cu sense necessitat de dimeritzar. Els pèptids MT NcMT, C18, N25 mostren preferència cap a coordinació de Cu(I), i tots tenen un contingut inferior a 8 Cys. Al mateix temps, C18 i N25 donen lloc a més d'un agregat quan uneixen Zn o Cd, amb espècies dimèriques, suggerint també inestabilitat cap a la coordinació de metalls divalents.

Els pèptids MT que contenen 9 Cys presenten comportaments diversos: mentre el domini *beta* de la MT1 de mamífer independent (Bofill *et al.*, 1999) i el domini N-terminal independent de la MT de *C.elegans* presenten preferència pel Cu, els dominis independents de la MT de *H.americanus* i C-terminal de *C.elegans* presenten preferència pel Zn (Valls *et al.*, 2001).

Els pèptids MT de mides superiors, com el domini *alfa* de la MT de mamífer (11 Cys) (Bofill *et al.*, 1999) o la MT de *Synechococcus* SmtA (Blindauer *et al.*, 2001) (amb un total de 12 aminoàcids coordinants, 9 Cys i 3 His) presenten, en canvi, especificitat per la unió de Zn. De manera general, doncs, els resultats semblen indicar que els pèptids MT que incloguin menys de 7 Cys no donen lloc a agregats estables de Cu, i que, per altra banda, l'estabilitat i preferència per la unió de Zn s'assoleix en pèptids MT a partir de les 9 Cys en la seva seqüència.

Aparentment, existirien restriccions espacials que marcarien aquestes limitacions. Tot i això, aquestes restriccions no impedeixen que pèptids MT majors de 9 Cys presentin un caràcter de Cu-tioneïnes, com seria el cas de Ce Δ His (forma mutant de la MT2 de *C.elegans* amb 18 Cys), SpMTA d'equinoderm (amb 20 Cys), les isoformes de *Drosophila* MtnA (10 Cys), MtnB, MtnC i MtnD (12 Cys), MT4 de mamífer (20 Cys) (Tio *et al.*, 2004) i CUP1 de llevat (12 Cys) (Winge *et al.*, 1985). En tot cas, les MT silvestres de menys de 11 aminoàcids coordinants tenen en comú la preferència de coordinació de Cu.

2.1.2- Els patrons de cisteïnes

Des del descobriment de les MT, i a mesura que s'ha acumulat informació sobre noves seqüències, s'ha descrit que les Cys estan disposades en patrons espacials diversos, que es poden resumir en Cys-X-Cys, Cys-X-Y-Cys, X-Cys-Cys-Y, Cys-X-Cys-Cys i X-Cys-Cys-Cys-Y, essent X i Y dos aminoàcids diferents. La importància funcional i evolutiva que s'ha donat a la disposició de les Cys en les MT és implícita en la classificació duta a terme per Binz i Kagi (Binz & Kagi, 2001), en què el patró de Cys és el paràmetre principal de descripció i un dels paràmetres més importants de classificació.

És evident que la disposició de les Cys al llarg de la seqüència d'un polipèptid MT ha de condicionar la seva preferència de coordinació envers els diferents ions metàl·lics en el procés de plegament i establiment dels enllaços metall-tiolat.

Alhora, cadascun d'aquests ions metàl·lics veuran més satisfets els seus requeriments en quant a les geometries de coordinació tot depenent de la disposició de les Cys al llarg del pèptid. En aquest sentit, els primers estudis realitzats en el nostre grup amb anterioritat a aquesta tesi, posaren de manifest que les metal·lotioneïnes MT1 de mamífer (Bofill *et al.*, 2001) i MTH de llamàntol (Valls *et al.*, 2001), que presenten doblats Cys-Cys en la seva seqüència, manifestaven un comportament de Zn-tioneïna, mentre la MT de *Drosophila* MtnA (Valls *et al.*, 2000), i el domini *beta* de la MT1 de mamífer (Cols *et al.*, 1999), que presentaven patrons de distribució de Cys del tipus Cys-X-Cys i una absència total de doblats Cys-Cys, manifestaven caràcter de Cu-tioneïna. Aquesta correspondència entre la preferència pel Zn i els doblats Cys-Cys, a més, es corresponia amb la visió, generalment acceptada, que el domini *beta* de la MT de mamífer constituïria un domini evolutivament més "primitiu" amb preferència pel Cu, mentre el domini *alfa* (amb doblats de Cys) constituïria un domini més "modern", amb preferència cap al Zn. Tot i així, la bibliografia posà de manifest des d'un primer moment que CUP1 de llevat era una Cu-tioneïna, malgrat presentar doblats Cys-Cys (Hamer *et al.*, 1985; Winge *et al.*, 1985), i, paral·lelament a aquesta tesi, estudis realitzats per altres membres del grup de recerca han determinat que MT4 de mamífer (amb doblats de Cys) mostra preferència pel Cu. Addicionalment, la presència d'un mateix patró cisteínic, els triplets Cys-Cys-Cys, estava associada a especialització funcional pel Cu en *C.sapidus* (Syring *et al.*, 2000), i per a metalls divalents en el gènere *Tetrahymena* (Santovito *et al.*, 2001).

Així doncs, sembla que els patrons de Cys, encara que relacionats amb les preferències de coordinació metàl·lica, no en són els únics determinants.

En aquesta tesi s'ha estudiat el comportament coordinant de 9 MT i de 6 formes mutants. Dels 15 pèptids estudiats, només 4, MtnA (descriu parcialment abans

per Valls *et al.* (2000), C18 i N25 de QsMT (sense doblats Cys i amb caràcter de Cu-tioneïna) i TpMT1 de *Tetrahymena* (amb doblats Cys i caràcter de Zn-tioneïna) mostren preferències coordinants que responen a l'associació entre la presència/absència de doblats Cys i les preferències coordinants descrites anteriorment. Les MT SpMTA d'equinoderm, MtnB, MtnC i MtnD de *Drosophila*, presenten doblats Cys, i tot i això són Cu-tioneïnes. En la forma mutant Ce Δ His de la MT de *C.elegans* en què s'ha deleccionat la His, la presència de doblats Cys-Cys no és suficient com per a determinar una preferència pel Zn. La MT MT-10-IV de *M.edulis*, malgrat no presentar ni un sol doblat Cys-Cys en la seva seqüència, és la MT que, entre totes les estudiades en aquesta tesi, mostra majors graus d'estructuració i de preferència pel Zn. Les nostres dades semblen indicar que la presència/absència de doblats Cys-Cys, tot i poder ser un factor implicat en la determinació de les preferències coordinants, no les determina de forma unívoca. En el cas de la MT de *Tetrahymena*, la relació entre els patrons d'expressió i la presència/absència de triplets de Cys en les diferents MT d'aquest gènere sembla indicar que la presència de triplets podria estar associada a l'especificitat funcional cap a unió de metalls divalents. Les nostres dades indiquen que TpMT1 (amb triplets Cys-Cys-Cys) és una Zn-tioneïna i semblen estar d'acord amb aquesta associació.

2.1.3- Les histidines

Com s'ha ja comentat en la introducció, d'entre els aminoàcids no cisteínics amb capacitat d'unió a metalls, en destaca la His, un aminoàcid del que s'ha ja provat la seva capacitat d'unió a metalls en alguns agregats metall-MT (Romero-Isart *et al.*, 1999; Blindauer *et al.*, 2001).

En aquesta tesi s'han dut a terme estudis amb CeMT2 de *C.elegans* i QsMT de *Quercus suber*, que contenen una His, situada, respectivament, a l'extrem C-terminal i en la zona central/espaiador. Tot i que en els dos casos s'ha demostrat que la

His juga un paper en la coordinació metàl·lica, el paper d'aquest aminoàcid sembla ésser molt diferent per a les dues MT.

La participació de la His en QsMT sembla estar restringida a la coordinació de Cd. En Cu-QsMT no s'aprecien diferències entre la forma silvestre i el mutant N25-C18 (que està mancat de la zona central o *espaiador*), cosa que suggereix que l'espaiador i la His que hi està inclosa no juguen un paper en la unió a metalls ni l'estructuració de l'agregat. En Zn-QsMT les anàlisis dels espectres Raman i CD no aporten cap indicatiu de la participació de la His en la unió a metalls. És només en les síntesis de Cd-QsMT que la participació d'aquesta His en la coordinació metàl·lica, és evidenciada tant per inequívocues senyals del seu espectre Raman, com per absorbàncies al CD que ja s'havien observat anteriorment en pèptids MT1 en què alguna Cys havia estat mutada a His (Romero-Isart *et al.*, 1999). En les diverses síntesis de Cd-QsMT s'han obtingut continguts metàl·lics similars, però existeixen diferències en els seus CD que es poden atribuir a diferents participacions de la His. Això indicaria que la His és un lligand opcional de QsMT que aporta una variabilitat estructural que no afecta la capacitat quelatant total de la proteïna.

En el cas de *C.elegans*, la His sembla jugar un paper molt més fonamental. En la forma mutant Ce Δ His (amb deleció per la His terminal), el CD dels agregats de Zn indica diferències estructurals importants respecte la forma silvestre. Tot i així, per a Zn i Cd, encara que la His sembla jugar un paper en la formació de dímers (com es comenta més endavant) la seva pèrdua no sembla afectar la capacitat coordinant.

L'efecte més determinant, però, és el que s'observa en la unió de Cu, ja que la pèrdua de la His provoca un canvi en les preferències de coordinació metàl·lica del pèptid. Mentre la forma silvestre CeMT2 mostra caràcter de Zn-tioneïna (ja que en sintetitzar-la en medi enriquit amb Cu en resulten agregats heterometàl·lics) la forma mutant Ce Δ His s'obté com a agregat

homometàl·lic de Cu. Aquesta diferència indica un paper crucial de la His en la determinació de les preferències coordinants de CeMT2.

En ésser purificades en forma nativa d'organismes sotmesos a altes concentracions de Cd, les isoformes CeMT1 i CeMT2 mostren un contingut metàl·lic diferent. Així, d'acord amb la literatura, CeMT1 (amb 4 His) uneix Cd i Zn, mentre que CeMT2 (amb només una His) uneix només Cd (You *et al.*, 1999).

També s'ha descrit a la bibliografia que la presència d'His a la zona C-terminal és important també per determinar l'especificitat funcional de SmtA de cianobacteri i participa en la unió a metalls i processos de dimerització en la MT de pollastre (Villarreal *et al.*, 2006), i conseqüentment, els nostres resultats, indiquen que en les MT que inclouen His en la seva seqüència l'estudi de la seva participació en la constitució d'agregats metàl·lics és indispensable

2.2- Altres lligands: lligands exògens

Malgrat que els elements dels diferents nivells estructurals (estructura primària, secundària, terciària i quaternària) determinarien d'una manera important les propietats coordinants, existeixen indicis de la participació de lligands exògens en agregats metall-MT. Lligands exògens com el compostos inorgànics que contenen fòsfor (Palumaa, *et al.*, 1993), clorurs (Maret *et al.*, 2002) i sulfur (Capdevila *et al.*, 2005) són els principals exemples d'un camp no del tot ben explorat en les MT.

Els agregats metall-MT sintetitzats *in vivo* en *E.coli* contenen ions sulfur (S²⁻)

Les MT són proteïnes que estan funcionalment i estructuralment molt properes a les fitoquelatines (PC), fins al punt que en algun cas, aquestes darreres van estar incloses en la primera classificació de les MT. Fins al moment actual, a part de la seva síntesi enzimàtica, una de les principals diferències entre les PC i les MT era la presència d'ions sulfur en els agregats PC-metall sintetitzats *in vivo* (Winge, *et al.*,

1992). Els agregats metall-sulfur d'aquest tipus reben el nom de *crystallites*. L'estructura d'aquests *crystallites* estaria basada en els sulfurs actuant de pont entre dos ions metàl·lics, tal com es veu a la Fig. 29 (Winge *et al.*, 1985; Hayashi, *et al.*, 1986). Durant la caracterització dels agregats Cd-QsMT d'aquesta tesi s'obtingueren alguns resultats aparentment incoherents: els espectres de CD mostraven absorbàncies entre 260 i 320 nm, que no es corresponien amb les esperades per a la coordinació Cd-tiolat, i l'estequiometria mitjana dels agregats calculada per ICP-AES no es corresponia amb els resultats calculats a partir d'ESI-MS.

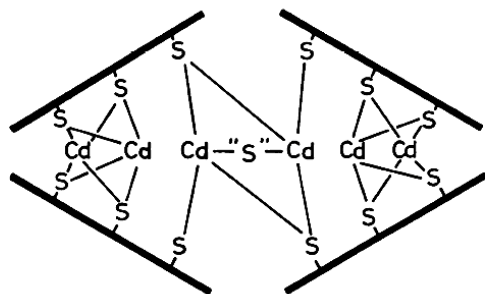


Fig. 29- Estructura del *cluster* metàl·lic de les Cd-PC de *S.pombe*. Esquema extret de (Hayashi *et al.*, 1986). Les línies gruixudes representen les PC, les línies primes representen els enllaços Cd-Sulfur i Cd-tiol que mantenen l'agregat unit.

L'estudi de l'espectre de CD mostrà que absorpcions similars a les detectades en els agregats Cd-QsMT s'havien observat prèviament en agregats Cd-MtnA (Valls *et al.*, 2000), i havien estat associades a complexos Cd-fitoquelatina que contien sulfurs. Les absorbàncies detectades al CD, doncs, indicaven que els agregats Cd-QsMT podien contenir ions sulfur actuant com a lligands del Cd, que podien explicar els estranys resultats obtinguts.

El desenvolupament de nous protocols d'anàlisi (ICPàcid, GC-FPD) i la reinterpretació de les dades (ESI-MS) considerant la presència dels ions sulfur permeté confirmar aquesta hipòtesi i establir la presència d'ions sulfur no només en QsMT, sinó de manera general en totes les MT estudiades. Els resultats obtinguts en aquesta tesi indiquen que els agregats

metall-MT sintetitzats heteròlogament en *E.coli* contenen ions sulfur. Tot i que en un primer moment, la presència de sulfur fou detectada exclusivament en els agregats amb Cd, els resultats presentats en aquesta tesi posen en evidència que els ions sulfur són també presents en agregats Zn-MT i Cu-MT, tot i que els agregats Cd-MT són els que ne presenten una major quantitat, i els agregats Cu-MT són els que en tenen un menor contingut. El senyal espectroscòpic al CD dels sulfurs varia en funció del metall a què es troben enllaçats. Mentre en els agregats Cd-MT s'ha establert una sèrie d'absorcions característiques de l'enllaç S-Cd entre 260 i 300 nm, en els agregats Zn-MT, només s'han detectat absorpcions molt lleus en la zona entre els 250 i els 270 nm. En els agregats Cu-MT, la complexitat dels espectres de CD fa difícil atribuir les absorpcions a la interacció sulfur-Cu(I). Les empremtes de CD de forma general i els espectres Raman en el cas concret de QsMT indiquen que els ions sulfur estan en aquests agregats interaccionant directament amb metalls, i que podrien estar units als metalls d'una forma similar a la que aquests ions s'uneixen al ferro en la ferredoxina (Fig. 30) o al cadmi en les fitoquelatines. En el cas de Cd-QsMT, l'estudi per espectrometria Raman ha permès determinar que els ions sulfur presents en l'agregat presenten no una, sinó diverses geometries d'unió dins d'un mateix agregat.

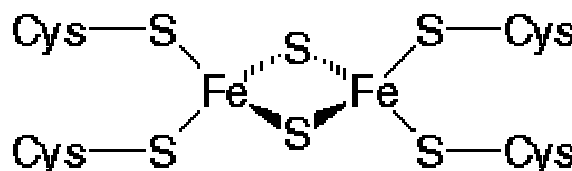


Fig. 30- Estructura del *cluster* metàl·lic de la ferredoxina. Extret de (Bertini *et al.*, 1995).

Respecte el contingut de sulfurs, en PC s'ha observat un fenomen particular: la coexistència d'agregats metall-PC que

contenen sulfurs i agregats metall-PC que no en contenen (Reese *et al*, 1988). En les PC, la presència de sulfurs és un factor que s'ha associat a un increment de la capacitat quelatant (Hayashi *et al*, 1986) i la capacitat detoxificadora per translocació a vacuola en plantes (Hall, 2002). Això suggereix que en les PC els sulfurs no serien un element estructural imprescindible (com passa en les ferredoxines), sinó que més aviat n'incrementarien les capacitats funcionals.

En les MT, els nostres resultats indiquen també la coexistència en una mateixa mostra d'agregats metall-MT amb ions sulfur i sense. Tot i això, la presència d'ions sulfur no sembla incrementar significativament les capacitats quelatants de les MT d'invertebrats i *T.pyrifformis* analitzades en aquesta tesi. Només en el cas de QsMT s'aprecien increments de capacitat coordinant d'ions Cd(II) respecte a la d'ions Zn(II) de forma concomitant a l'increment del contingut d'anions sulfur d'aquests complexos.

La presència generalitzada, la coexistència d'espècies amb i sense sulfur i el fet que en general aquests no afectin la capacitat coordinant de la proteïna indiquen que els sulfurs en les MT aportarien propietats funcionals no relacionades d'una manera crucial amb l'estructuració dels agregats metall-MT, tot i poder col·laborar en la seva l'estabilitat.

Tot i que els nostres resultats demostren clarament que les MT tenen la propietat d'incorporar ions sulfur en els seus agregats, i que aquesta incorporació pot tenir efectes estructurals i funcionals, fins al moment no s'havien descrit aquesta característica després de quasi 50 anys d'estudi de les MT. En constatar aquest fet, es generen dues qüestions:

1) si aquesta és una propietat general de les MT, perquè no ha estat detectada amb anterioritat? La majoria dels estudis realitzats fins ara amb MT s'han dut a terme amb complexos *reconstituïts*. Aquests són agregats metall-MT constituïts *in vitro* mitjançant l'addició a la MT demetalada del metall amb el que es desitja obtenir l'agregat. La MT demetalada s'obté

mitjançant l'acidificació d'agregats metall-MT purificats de teixit nadiu o procedents de síntesi heteròloga. Aquest procés d'obtenció de la MT demetalada suposaria la pèrdua dels ions sulfur que estiguin units a l'agregat metall-MT original. En altres casos, tot i que s'ha treballat amb agregats metall-MT nadius, aquests han estat obtinguts després d'exhaustius processos de purificació cromatogràfica, al llarg dels quals les espècies que contenen ions sulfur poden haver estat descartades, per constituir pics minoritaris, o allunyar-se de les propietats que hom pressuposa per als agregats metall-MT.

Per tant, en les metodologies emprades rutinàriament per als estudis estructurals i de comportament coordinant, es poden haver perdut els agregats originals que contenen sulfur.

Adicionalment, cal afegir també, que la quantitat d'ions sulfur continguts en els agregats és en general, prou baixa com perquè aquests passin desapercebuts, i que aquesta només ha estat excepcionalment elevada en els agregats Cd-QsMT i Cd-TpMT1.

2) contenen els agregats metall-MT formats en l'organisme aquests ions sulfur? La síntesi heteròloga permet obtenir agregats metall-MT fisiològicament més representatius que aquells que s'obtenen mitjançant la reconstitució o valoració *in vitro*. Tot i així, la síntesi heteròloga de MT en *E.coli* implica per a la cèl·lula un estrès metabòlic afegit a l'estrès metàl·lic al que és sotmesa en suplementar els medis amb els metalls. És un fet conegut que els mecanismes de defensa davant la toxicitat per metalls impliquen en *E.coli* una alteració del metabolisme del sofre que podria implicar variacions en els nivells intracel·lulars de sulfur. Així doncs, respecte a la significació fisiològica d'aquests resultats, és pertinent preguntar-se si la presència d'ions sulfur en els agregats metall-MT obtinguts pot ser una conseqüència de nivells alterats d'ions sulfur a l'interior de *E.coli* durant la síntesi o si és una característica intrínseca dels complexos metall-MT, que es dona

independentment del tipus cel·lular on té lloc la seva síntesi.

Per a respondre aquestes preguntes, en el grup de recerca en què s'ha dut a terme aquesta tesi ja s'han iniciat experiments destinats a purificar MT natives dels seus teixits originals per a determinar si els complexos metall-MT contenen lligands sulfur també en els teixits originals.

Queda, doncs, per determinar si la presència de sulfur és només una capacitat química dels agregats metall-MT o bé una característica funcional definitiva d'aquesta família que havia restat amagada fins ara, i, en aquest cas, quina seria la funció de la incorporació d'aquests ions sulfur.

En tot cas, les dades que aporta aquest treball permeten assegurar que les MT són capaces d'incorporar ions sulfur en els seus agregats de Zn, Cu o Cd formats *in vivo*, que aquesta incorporació confereix propietats espectroscòpiques i estructurals peculiars, i que en el cas de QsMT, l'increment de la quantitat d'ions sulfur s'associa a un increment de la capacitat quelatant.

Els ions clorur (Cl⁻) podrien completar l'esfera de coordinació dels metalls enllaçats per les MT

En treballs per espectroscòpia de NMR, altres investigadors havien proposat la possibilitat que els ions clorur participessin en els agregats metall-MT de MT2 de mamífer obtinguts per reconstitució *in vitro* (Maret *et al.*, 2002).

En els estudis presentats aquí, s'ha proposat la participació d'ions clorur en els agregats metall-MT obtinguts *in vivo* per a MT-10-IV de *M.edulis*, TpMT1 de *T.pyrififormis*, les MT MtnB, MtnC i MtnD de *D.melanogaster*, i algunes formes mutants de QsMT, la MT de planta. En totes aquestes MT, absorbàncies especials al CD, a 230 nm pels agregats de Zn, i a 240 nm pels agregats de Cd, indicaven la participació de cromòfors particulars. Els estudis realitzats amb MtnB de *D.melanogaster* han permès associar aquestes absorbàncies a la participació d'ions clorur en els agregats.

Aquesta participació en el CD ha estat detectada també en MT1 de mamífer i en el seu domini *alfa* isolat per altres investigadors del grup de recerca (Villarreal *et al.*, 2005). Tot i que els ions clorur semblen jugar un paper estructurador en els agregats, no s'aprecien diferències de capacitat coordinant de la MT entre els agregats amb i sense clorurs.

Segons altres autors (Maret *et al.*, 2002), els ions clorur podrien estar interaccionant també amb les Lys de la MT, jugant així un possible paper d'interferència en la unió de la MT amb l'ATP. Aquesta proposta suggereix un paper biològic per a la participació dels ions clorur en els agregats. La presència d'ions clorur en els agregats ha estat detectada per CD, però no per ESI-MS. Per a contrastar la seva presència amb altres tècniques, actualment s'estan realitzant estudis per espectroscòpia Raman per tenir indicis més clars de la participació d'aquests ions en els agregats. Els primers resultats indiquen que, efectivament, els agregats de Zn de MTO i MT-10-IV, i els Cd-TpMT1 (*Tetrahymena*) presenten ions clorurs formant part de la seva estructura.

El fet que en canviar l'eluent de la columna de purificació de Tris-HCl (amb ions clorur lliures) a Tris-HClO₄ (amb ions perclorat lliures) també canviï el DC dels agregats resultants indica que la incorporació d'aquests ions no necessàriament té lloc en la formació de l'agregat *in vivo*, sinó que podria existir intercanvi d'ions clorur/perclorat en el procés de purificació. En tot cas, les MT de *M.edulis*, *T.pyrififormis* i *D.melanogaster*, demostren tenir una predisposició especial a incorporar aquests ions, comparades amb la resta de les MT estudiades en aquesta tesi, en què no s'han detectat indicis de la participació d'aquests lligands.

2.3- L'estructura secundària, una característica funcional?

Tal com s'ha comentat en la introducció, algunes MT presenten elements d'estructura secundària en regions de la proteïna que poden determinar característiques funcionals. No obstant això,

la presència d'aquests elements i la seva influència en la funcionalitat ha estat tradicionalment considerada mínima o menyspreable en la família de les MT.

Les espectroscòpies Raman i IR són tècniques usades habitualment per a estudiar els elements d'estructura secundària de pèptids. Les dades que hem obtingut mitjançant l'aplicació d'aquesta tècnica indiquen que la MT de planta QsMT presenta elements d'estructura secundària en els seus agregats de Zn o Cd, principalment *beta-sheets* i *beta-turns*. Les particularitats estructurals d'aquests elements i els càlculs de predicció d'estructura secundària indiquen que la disposició d'aquests elements no seria uniforme al llarg de la seqüència de QsMT. La nostra hipòtesi és que les regions *beta-sheet* estarien situades en l'espaiador de QsMT i participarien no només en l'estructuració dels agregats, sinó, possiblement, en la interacció de l'espaiador amb altres elements cel·lulars, cosa que conferiria a aquests elements de un paper clau en la detoxificació metàl·lica, tal com es comenta més endavant.

Altres autors han suggerit que els elements d'estructura secundària podrien tenir una importància clau en la definició d'afinitats i estructuració amb els metalls en les MT (Vergani *et al.*, 2005).

Els estudis presentats en aquesta tesi pel que fa a l'estructura secundària inclouen només el cas de QsMT, que té una estructura primària particularment diferent a la resta de MT estudiades. Per aquesta raó es fa impossible fer extrapolacions a la resta de MT. Tot i això, les dades de la bibliografia i estudis preliminars realitzats per Raman i IR amb les MT de *C.elegans*, *M.edulis*, *S.purpuratus*, *D.melanogaster* i *T.pyrififormis* indiquen que la presència d'elements d'estructura secundària en MT no només no seria un factor residual en la seva estructuració, sinó que presentaria diferències importants entre diferents MT.

2.4- L'estructura terciària al llarg de les MT

L'heterogeneïtat estructural de les MT suposa tan diversitat d'estructures 3D com diversitat en el nombre de dominis peptídics, que defineixen *clusters* metàl·lics independents.

Fins aquest moment, estan acceptats dos models de plegament generals: les MT formades per dos dominis i dos *clusters* metàl·lics (que anomenarem en aquesta discussió MT bidominials), i les MT formades per un sol domini i un sol *cluster* metàl·lic (que anomenarem monodominials). Noves propostes inclouen un tercer model multidominal, amb més de dos dominis, que formarien cadascun un *cluster* metàl·lic, i un quart model: les MT formades per dos dominis peptídics i un sol *cluster* metàl·lic (que anomenarem codominials).

-El primer cas, les MT bidominials, és el descrit per als agregats amb ions divalents de les MT de vertebrats, equinoderms i crustacis, les estructures de les quals han estat descrites bé per NMR, bé per difracció de Raigs X (Furey *et al.*, 1987; Wagner *et al.*, 1987; Robbins *et al.*, 1991). El nombre de Cys total de les MT d'aquest grup oscil·la entre 18 i 20 Cys. Aquest primer cas comprèn tres disposicions principals: estructura *beta-alfa* (9 Cys + 11 Cys), la típica de les MT de vertebrat; estructura *alfa-beta* (11 Cys + 9 Cys), la típica de la MT d'equinoderm; i, finalment, estructura *beta-beta* (9 Cys + 9 Cys), la típica de les MT de crustaci.

Dues de les MT estudiades en aquesta tesi podrien formar part del grup de les MT bidominials: CeMT2 de *C.elegans* i MT-10-IV de *M.edulis*.

Tenint en compte que la majoria de MT d'estructura determinada i que tenen entre 17 i 20 Cys, es pleguen en 2 *clusters* amb ions divalents, les MT MT-10-IV de *M.edulis* (21 Cys) i CeMT2 de *C.elegans* (18 Cys) serien, molt probablement, MT bidominials, tal com ho han considerat altres autors, que han assumit per en el primer cas, una distribució del tipus *beta-alfa* similar a la de vertebrats (Vergani *et al.*, 2005), i en el

segon cas una distribució del tipus *beta-beta* similar a la de crustacis (You *et al.*, 1999). Per testar la possible analogia estructural de CeMT2 amb les MT de crustaci (MT bidominal 9 Cys + 9 Cys), hem estudiat el comportament dels putatius dominis aïllats de CeMT2, CeC i CeN. Amb el Zn i el Cu, els resultats indiquen que CeC i CeN no presenten comportaments additius respecte el de CeMT2 amb cap dels 3 metalls, de manera que es pot assumir que aquestes dues regions no s'estructuren de forma independent en CeMT2 amb aquests metalls. En canvi, els nostres resultats amb el Cd no permeten descartar la possibilitat de amb aquest metall els dos dominis s'estructurin independentment en CeMT2. Per tant, si bé la mida, i el nombre de Cys suggereixen que CeMT2 seria una MT bidominal, els nostres resultats indiquen que el model de plegament de CeMT2 no s'assembla en tots els casos al descrit per a les MT de crustaci.

-El segon cas descrit són les MT monodominials, de les quals la MT de llevat CUP1 (12 Cys), n'és la principal representant. També la MT de *N.crassa* (7 Cys) s'estructuraria en un sol domini. En aquesta tesi s'han estudiat les MT de *D.melanogaster* i el contingut de Cys d'aquestes MT (10-12 Cys) estaria d'acord amb una estructuració en un sol domini.

Tot i així, cap de les nostres dades permet establir conclusions definitives sobre l'estructura terciària de les MT de *Drosophila*.

-Les MT multidominials, una hipòtesi que pren força: en l'estudi de l'estructura primària de MT de mol·lusc, altres autors han associat les regions d'algunes MT de mol·lusc a la formació d'agregats amb més de dos dominis, als que s'han atribuït estructures anàlogues als dominis *alfa* i *beta* de vertebrat, que haurien aparegut gràcies a duplicacions internes (Tanguy & Moraga, 2001; Jenny *et al.*, 2006).

El mecanisme de duplicació interna és també el proposat per a les MT de *Tetrahymena*, que presenten regions de la proteïna repetides. La similitud d'aquestes regions entre elles i el seu nombre de Cys

(d'entre 8 i 11) són indicatius que aquestes regions podrien constituir dominis independents. Malauradament, les dades de què disposem fins al moment no ens permeten deduir en quants dominis s'estructura TpMT1.

-Per a les MT de planta, s'ha hipotetitzat l'estructuració tridimensional en codomini. Com s'ha descrit a la introducció, les MT de planta presenten majoritàriament una estructura primària en forma de dos dominis rics en Cys separats per un domini sense Cys. Tot i que no es disposa de dades estructurals, a la bibliografia es presenten dos models hipotètics: un model en forma de pinça, en què els dos dominis rics en Cys interactuen per formar un únic *cluster* metàl·lic, i un model bidominal en què cada domini ric en Cys forma un *cluster* metàl·lic independent. Les nostres dades recolzen un model en forma de pinça per a QsMT quan coordina Zn, Cu i Cd. Segons aquest model, l'espaiador tindria la funció de facilitar la interacció dels dos dominis cisteïnics entre si. El paper de l'espaiador en l'estructuració dels agregats no sembla ser crític per a la coordinació de Cu, però sí per a Zn i Cd, on seria decisiu per al processament intracel·lular dels corresponents agregats metàl·lics.

Altres autors han establert que la inserció d'aminoàcids entre els dominis independents de la MT de mamífer n'afecta la capacitat detoxificadora en llevats (Rhee, *et al.*, 1990), de manera que la configuració en forma de pesa podria implicar inestabilitat estructural *in vivo*.

En tot cas, cal observar també la possibilitat que les estructures "pinça" i "pesa" fossin dues estructures alternants en les MT de planta, corresponents a diferents estats funcionals.

2.5- Les estructures quaternàries en les MT

En la caracterització dels agregats metall-MT obtinguts per a formes mutants de QsMT, s'obtingueren resultats d'espectrometria de masses difícils d'explicar: alguns dels pics obtinguts no es corresponien amb cap dels valors esperats per al pèptid unit a metalls. Les relacions

m/z obtingudes semblaven correspondre a un pèptid de mida molt major a l'esperada. L'anàlisi de la forma Apo dels pèptids indicava que la mostra contenia només un pèptid, amb la massa esperada. Per tant, el que observàvem als espectres de la forma holo (metalada) havia de ser una combinació de diverses unitats, del pèptid i dels metalls. Addicionalment, els pics m/z observats en la mostra holo es corresponien a alguns dels valors que s'obtidrien de dividir la massa dels possibles agregats per 1.5. Aquest valors eren impossibles, ja que la càrrega d'ionització no podia ser fraccionària, i s'havia de correspondre a un nombre natural. Després de l'observació de diversos pics m/z similars en els agregats de N25 i C18, s'arribà a la conclusió que els pics observats podien correspondre a una massa d'exactament el doble de l'esperada dividida per 3, ja que els valors obtinguts serien idèntics als obtinguts en dividir la massa dels possibles agregats per 1.5 ($1m/1.5 = 2m/3$).

Un cop refets els càlculs considerant la possibilitat de la presència de formes dimèriques a la mostra (massa doble de l'esperada), tots els pics m/z obtinguts en els espectres de masses dels agregats N25 i C18 es pogueren interpretar, concloent-se que els agregats Zn-N25, Cd-N25, Zn-C18, Cu-C18 i Cd-C18 contenien formes dimèriques. L'estudi en profunditat dels agregats indica que aquestes formes dimèriques estarien formades per ponts metàl·lics, un mecanisme de dimerització que podem considerar fisiològicament significatiu.

Aquests resultats demostren que el procés de síntesi heteròloga i purificació dels agregats no impedeix la formació d'agregats dimèrics del tipus metall-MT estables. L'aplicació del mateix mètode de deconvolució als espectres ESI-MS de la resta d'agregats metall-MT estudiats ha revelat la presència de dímers també en els agregats Cu-CeC, Zn-CeMT2 i Cd-CeMT2, essent Zn-CeMT2 i Cd-CeMT2 els dos únics agregats de formes silvestres de MT en què s'han identificat formes dimèriques en aquesta tesi.

La presència de la His en l'extrem C-terminal, a més a més de produir-se a CeMT2, es produeix també a dues altres MT, SmtA i la MT de pollastre, per a les quals s'ha proposat la seva capacitat de dimerització a través de la His (Cook *et al.*, 1998; Villarreal *et al.*, 2006). El fet que en els agregats Zn-Ce Δ His i Cd-Ce Δ His (pèptid CeMT2 al que s'ha eliminat la His) la capacitat de dimerització desaparegui, és indicatiu que en CeMT2 la dimerització es produeix també a través de la His, possiblement per un mecanisme similar al proposat per a la MT de pollastre (Fig. 31). Els únics casos en què s'han detectat formes dimèriques en agregats metall-MT sintetitzats en situacions que reproduïen la formació dels agregats *in vivo* són els de CkMT i CeMT2, que comparteixen la presència de His en el seu extrem C-terminal, i SmtA, on la His és el penúltim residu. Aquest fet indica que la dimerització a través d'His C-terminals seria un mecanisme específic de dimerització en les MT.

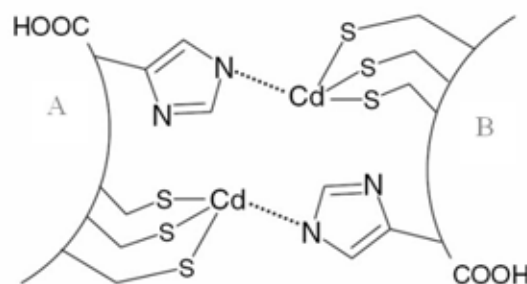


Fig. 31- Mecanisme de dimerització proposat per a la MT de pollastre, en què dos pèptids MT (A i B) formen dímers mediats per la unió a metall a través d'His. Imatge modificada de (Villarreal *et al.*, 2006).

A la introducció s'ha comentat que la significació biològica de les MT dimèriques o polimèriques és controvertida. Deixant a part el cas de les MT amb His, fins al moment actual, els dímers MT s'han detectat només en situacions anòmales (sobrecàrrega metàl·lica *in vitro*, oxidació de les Cys, formes de MT mutants,...).

El fet que no es detectin espècies dimèriques en un sistema de síntesi, purificació i anàlisi que ha demostrat la seva capacitat de fer-ho en pèptids similars indueix a pensar que les altres MT sintetitzades i estudiades per aquests processos, no només en aquesta tesi sinó en altres treballs precedents, no formen espècies dimèriques estables *in vivo*. Els nostres resultats no exclouen la possibilitat que en situació fisiològica es puguin formar formes dimèriques transitòries, ni que la interacció amb sistemes cel·lulars pugui provocar una acumulació i polimerització de la MT amb si mateixa o amb altres molècules. Tot i això, els nostres resultats demostren que la majoria de MT estudiades en aquesta tesi, en ésser sintetitzades en medi fisiològic, no tenen formes dímers, i que la dimerització no és una propietat estructural intrínseca de les MT, sinó que es centra en aquelles MT que tenen His en la seva estructura primària. Aquesta conclusió es pot extrapolar a una gran quantitat de MT que han estat estudiades pel mateix sistema i en conjunt amb les dades presents aquí, constitueixen una bona representació de la família de les MT.

3- LES PROPIETATS COORDINANTS I L'ESPECIALITZACIÓ FUNCIONAL

Malgrat l'ampli panorama de possibles funcions de les MT, resulta inqüestionable que aquestes han d'estar relacionades amb la unió a metalls. Des d'aquest punt de vista, s'ha atribuït a les MT dos papers fonamentals: l'homeòstasi de Zn i Cu (metalls fisiològics) i la detoxificació (ja sigui de metalls intrínsecament tòxics, com el Cd, o de metalls fisiològics a nivells de concentració tòxics).

El fet que en la majoria d'organismes estudiats existeixi més d'una isoforma de MT és indicatiu de que pot existir una certa especialització d'aquestes en la unió a metalls i, per tant, les preferències d'unio a metalls podrien tenir una relació estreta amb les capacitats funcionals de cada MT. En aquest apartat s'intentaran relacionar les

preferències de coordinació metàl·lica (o funció a nivell molecular) de les MT estudiades en aquesta tesi amb la seva funció.

L'insecte *Drosophila melanogaster* té 4 isoformes MT que presenten patrons d'expressió diversos. Mentre MtnA és fortament induït per Cu, MtnB ho és per Cd (Lastowski-Perry, *et al.*, 1985; Debec *et al.*, 1985; Mokdad *et al.*, 1987; Silar *et al.*, 1990). Soques de *D.melanogaster* defectives en les diferents isoformes confirmen que, efectivament, MtnA s'associa a la detoxificació de Cu, i MtnB s'associa a detoxificació del Cd (Egli *et al.*, 2006b).

El comportament coordinant de les 4 MT es correlaciona bé amb les seves capacitats funcionals: tot i que les 4 isoformes són Cu-tioneïnes, MtnB és la isoforma que té més capacitat d'unio a Cd. Igualment, les isoformes MtnC i MtnD, que presenten una capacitat d'unio a metalls reduïda, són les dues isoformes que en ser delecionades en *D.melanogaster* provoquen menors alteracions en la resistència a la toxicitat per metalls. Les dades obtingudes ens duen a proposar que el sistema MT en *D.melanogaster* presenta especialització funcional, almenys parcialment, en la unió de Cd i Cu, d'acord amb les propietats coordinants de cadascuna de les seves isoformes.

L'equinoderm *S.purpuratus* presenta dues isoformes MT, SpMTA i SpMTB, i els seus patrons d'inducció per metalls suggereixen una funció homeostàtica per a SpMTA i una funció detoxificadora per a SpMTB (Nemer *et al.*, 1984; Wilkinson & Nemer, 1987; Nemer *et al.*, 1991; Nemer *et al.*, 1995). Els nostres resultats indiquen que SpMTA d'equinoderm presenta característiques de Cu-tioneïna.

El mol·lusc *M.edulis* presenta dos tipus de MT, Mt10 i Mt20, amb diferents patrons d'expressió. Mentre les Mt10 s'expressen en resposta a l'exposició a Zn i baixes concentracions de Cd, les Mt20 s'expressen en resposta a Cd (Barsyte, *et al.*, 1999; Soazig & Marc, 2003; Ciocan & Rotchell, 2004), suggerint una especialització en què les Mt20 durien a terme un paper en

detoxificació i les Mt10 en homeòstasi de metalls. Els nostres resultats indiquen que la MT-10-IV de *M.edulis* presenta preferències coordinants pel Zn i capacitat d'incorporar Cu formant diversos tipus d'agregats. Durant la valoració d'agregats Zn-MT-10-IV amb Cd(II), MT-10-IV manifesta una reticència a desplaçar el Zn(II) que suggeriria un paper important d'aquest ió en els seus agregats metàl·lics. Aquests resultats recolzen per a MT-10-IV un paper centrat en l'homeòstasi, més que no pas en la detoxificació metàl·lica.

El nematode *C.elegans* presenta dues isoformes, CeMT1 i CeMT2 (també anomenats MTL-1 i MTL-2), de les quals només la segona es sintetitza constitutivament, mentre ambdós gens s'indueixen en resposta a Cd (Imagawa *et al.*, 1990; Freedman *et al.*, 1993; Swain *et al.*, 2004). El fet que cap de les dues MT presenti síntesi incrementada per Zn ni Cu sembla indicar que aquestes MT presenten especificitat per a la detoxificació del Cd, o bé que la seva relació amb els metalls fisiològics Zn i Cu és més indirecta. El comportament coordinant de CeMT2 indica que es tracta d'una Zn-tioneïna. CeMT2 és l'única de les MT estudiades en aquesta tesi que dimeritza, procés que s'ha proposat com a mètode d'intercanvi de metalls entre MT. En la unió a Cd, CeMT2 dona lloc a agregats que conserven les propietats generals dels agregats de Zn. Tant les dades dels patrons d'inducció com la caracterització del comportament coordinant són coherents amb una especialització cap a unió de metalls divalents, i un funcionalitat en la detoxificació del Cd.

La MT de *Tetrahymena* TpMT1 ja havia estat anteriorment caracteritzada per altres autors com una MT fortament induïda per Cd, però no per Cu ni Zn (Piccinni *et al.*, 1999; Santovito *et al.*, 2001), mentre altres isoformes estaven induïdes pel Cu. Les nostres dades indiquen que aquesta MT té preferència pels metalls divalents. Aquesta preferència corrobora l'especificitat funcional pel Cd (i no el Cu).

En aquesta tesi s'ha estudiat també el comportament coordinant de la MT de *Quercus suber*, QsMT, una MT de planta de tipus 2, MT que rarament s'indueixen en resposta a Cd, i en canvi, es solen induir en resposta al Cu i els processos de senescència (Cobbett & Goldsbrough, 2002). Els nostres resultats indiquen que QsMT s'indueix en resposta a estrès oxidatiu, tant endogen com exogen. Tot i que les nostres dades no són suficients com per arribar a conclusions definitives, QsMT sembla ser capaç de donar lloc a espècies homometàl·liques de Cu en ésser sintetitzada en medis rics en Cu, cosa que la identifica com una Cu-tioneïna. Quan coordina Cd, QsMT presenta unes propietats coordinants completament diferenciades de les observades per al Zn. QsMT té un efecte detoxificador significatiu en llevats davant el Cu(I) i el Cd(II), els dos metalls amb què presenta una major capacitat quelatant. En la funcionalitat detoxificadora en llevat, la participació de l'espaiador sembla ser molt important, ja que la seva manca redueix dràsticament el paper protector de QsMT en front elevades concentracions de metall. El fet que la capacitat d'unio a metalls no varii de forma significativa entre QsMT i N25-C18 (la forma mutant amb l'espaiador deletat) indica que l'espaiador participa en algun aspecte no relacionat directament amb la unió dels metalls, sinó que en la detoxificació *in vivo*, podria generar estructures importants en la vehicularització o de l'agregat metàl·lic dins de la cèl·lula. En relació a l'estrès oxidatiu, s'ha hipotetitzat que la capacitat de QsMT d'unio a Cu(I) permetria regular les concentracions d'aquest metall en forma lliure a la cèl·lula, punt molt important, ja que és un dels metalls que pot actuar com a cofactor en la reacció de Fenton, que com s'ha comentat en la introducció, agrava l'estrès oxidatiu.

4- EL PAPER DELS SULFURS EN LES MT

Tot i que de moment, la presència d'anions sulfur en les MT s'ha demostrat

exclusivament en agregats metall-MT recombinants, el panorama de possibles funcions de les MT podria quedar ampliat amb aquesta nova propietat. Els ions sulfur tenen un paper biològic en l'organisme, principalment en els centres actius d'enzims com la ferredoxina, o altres proteïnes amb relació amb el transport electrònic i la respiració cel·lular. Els anions sulfur són molt reactius, i poden també prendre part en la generació de radicals oxidants de sofre del tipus RSS (espècies reactives de sofre), molt perniciosos per a la cèl·lula (Giles *et al.*, 2001). Tot i que tradicionalment s'ha considerat que les funcions de les MT estarien restringides al transport, emmagatzematge i detoxificació de metalls i l'atenuació de l'estrès oxidatiu, el transport d'ions sulfur en l'interior de la cèl·lula podria ésser una nova funció de les MT que cal explorar, en primer lloc, corroborant la seva presència en agregats metall-MT extrets dels organismes nadius.

5- APORTACIONS A LA METODOLOGIA DE CARACTERITZACIÓ D'AGREGATS METALL-MT

El protocol de síntesi i estudi de les metal·lotioneïnes que s'ha usat en aquesta tesi ha estat desenvolupat al llarg de nombrosos anys de recerca per anteriors investigadors en el grup on s'ha dut a terme aquest treball. Aquesta tesi suposa l'aportació d'algunes noves metodologies per a l'estudi dels agregats metall-MT.

Detecció de formes dimèriques en MT

En l'estudi d'agregats metall-MT de formes mutants de QsMT per espectrometria de masses es detectaren pics que no es pogueren atribuir a cap de les combinacions esperades. L'estudi amb profunditat dels pics revelà que es corresponien a formes dimèriques de MT, establint-se un mètode de càlcul i atribució de formes dimèriques per espectrometria de masses. La detecció de formes dimèriques d'agregats metall-MT per

espectrometria de masses ha estat descrita recentment també per autors d'altres grups (Afonso, *et al.*, 2004), però no en preparacions d'agregats metall-MT obtinguts "*in vivo*".

Lligands Sulfur en MT

Fruit del treball conjunt dels membres del grup de recerca en què s'ha realitzat aquesta tesi, s'han desenvolupat protocols que permeten la detecció qualitativa i quantitativa d'ions sulfur en agregats metall-MT. Com a resultat, es compta amb els protocols d'ICP_{àcid}, mètodes de càlcul per a la quantificació d'ions sulfur per espectrometria de masses, atribucions de longituds d'ona característiques de l'enllaç sulfur-metall per espectroscòpies de CD i Raman, i el protocol d'aplicació del mètode de quantificació dels sulfurs a la mostra per GC-FPD.

Valoracions i demetalacions

L'ús de valoracions amb Cd i Cu (o sigui, l'obtenció d'agregats metall-MT configurats *in vitro*) permet estudiar amb més profunditat els agregats obtinguts *in vivo*. En aquesta tesi, s'han posat a punt i aplicat nous tipus de valoracions, com la co-valoració, les valoracions per competició i les valoracions àcides, que permeten obtenir noves dades sobre els agregats metall-MT.

Espectroscòpies Raman i IR

Per aprofundir en l'estudi de les característiques estructurals dels agregats metall-MT s'ha posat a punt un protocol per a l'anàlisi mitjançant espectroscòpia vibracional, Raman i IR en medi sòlid. Els primers resultats obtinguts, presentats en aquesta tesi, demostren que aquestes tècniques permetran estudiar no només l'estructura secundària d'aquests complexes, sinó també l'entorn de coordinació metàl·lica, aprofundint en detalls com la variabilitat de geometries de coordinació i la participació d'His i lligands no proteïcs, com els ions sulfur, en la coordinació dels metalls.

