

Les metal·lotioneïnes: una família excepcional de metal·loproteïnes

Pilar González Duarte

Departament de Química, Universitat Autònoma de Barcelona, a/e: Pilar.Gonzalez.Duarte@uab.es

Al llarg d'aquest treball es dona una visió de perspectiva de les característiques químiques i biològiques que distingeixen les metal·lotioneïnes de les altres famílies de metal·loproteïnes. L'atenció se centra particularment en el seu tret fonamental: l'elevat contingut metàl·lic i la seva coordinació a la cadena peptídica mitjançant només residus de cisteïna. Els agregats metall-SCys, dels quals no hi ha precedents en la química dels tiolats metàl·lics, són responsables de l'estructura tridimensional de les metal·lotioneïnes. Alhora, aquests agregats les fan particularment aptes per participar en la distribució i emmagatzemament de metalls essencials com el zinc i el coure i també per reaccionar amb espècies radicalàries.

This work aims to provide insight into the chemical and biological features that distinguish metallothioneins from all other metalloprotein families. Particular attention is given to their fundamental trait: a high metal content and metal coordination to the protein chain by means of cysteine residues only. The metal-SCys aggregates thus formed, which have no precedent in metal thiolate chemistry, are responsible for the three-dimensional structure of metallothioneins. In addition, these aggregates enable them to participate in the distribution and storage of essential metals, such as zinc and copper and to react with radical species.

Introducció

Les metal·lotioneïnes (MT) constitueixen una família de proteïnes amb propietats sorprenents tant des del punt de vista químic com biològic. El seu nom respon a dues d'aquestes propietats: l'elevat contingut en residus de cisteïna (Cys) i la capacitat excel·lent per enllaçar ions metàl·lics. Des d'un punt de vista químic, la riquesa de residus de Cys ($C_{\alpha}-CH_2-SH$) en l'estructura primària de les MT permet considerar-les agents quelants altament optimitzats per enllaçar metalls de transició mitjançant àtoms de sofre en forma de tiolat, RS^- . Precisament, la presència de metalls explica l'estructura terciària (3D) de les MT, que es caracteritza per la formació d'uns agregats metall-sofre característics (figura 1), dels quals no hi ha antecedents propers ni en el món mineral ni en compostos químics descrits a la bibliografia. Tot això és indicatiu que la cadena proteica té un paper cabdal en la constitució d'aquests agregats i, per tant, una clara influència en el seu comportament químic. Així doncs, es tracta d'unes proteïnes anòmalament petites (pes molecular 2-7 kDa), especialment dissenyades per enllaçar ions metàl·lics, els quals són alhora responsables de l'estructura 3D de la cadena peptídica.

Habitualment, en els organismes vius les MT es troben enllaçades a zinc(II) i/o coure(I), únic estat d'oxidació que pot presentar el coure en les MT, atès que el Cu(II) oxidaria els grups tiolat a disulfur, cosa que comportaria l'afebliment de la capacitat coordinant de la proteïna. D'altra banda, els metalls Zn(II) i Cu(I) poden ser desplaçats de les MT per d'altres

amb més afinitat per al sofre si l'organisme hi entra en contacte, com pot ser a través de la dieta alimentària. Alhora, els procediments més freqüents per obtenir les MT, ja si-

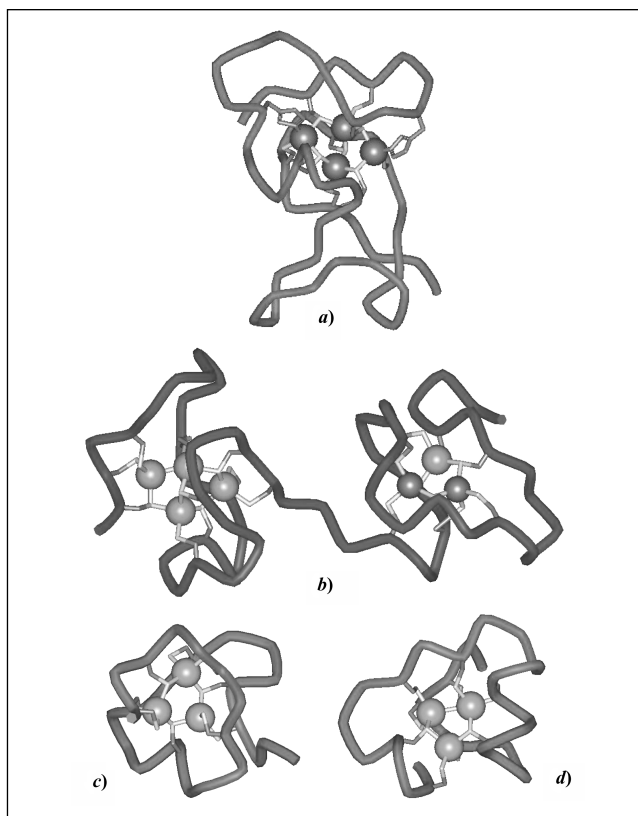


FIGURA 1. Estructura tridimensional de diverses MT: a) Zn_4 -SmtA de *Synechococcus*; b) Cd_5,Zn_2 -MT 2 de fetge de rata; c) i d), els dominis $Cd_3\beta_N$ i $Cd_3\beta_C$ de MTH de llamàntol americà, respectivament. Els ions zinc i cadmi es mostren com esferes més fosques i més clares respectivament. (Dibuixos obtinguts a partir de les coordenades atòmiques del *Protein Data Bank*; els codis d'identificació es donen a la taula 1.)

gui aïllant-les d'òrgans d'éssers vius o bé sintetitzant-les per enginyeria genètica, comporten la presència de metalls en el medi. En conseqüència, és molt difícil determinar quants i quins metalls es troben enllaçats a les MT en forma nativa, de manera que, a diferència de la majoria de metal·loproteïnes, la naturalesa dels metalls enllaçats i l'estequiometria metall-MT no són paràmetres constants i definitoris de l'esmentada família.

La primera MT va ser aïllada de fetge de cavall el 1957, quan s'investigava sobre el destí d'un metall tòxic com és el cadmi(II) en els organismes vius.¹ Avui, la família de les MT inclou 205 proteïnes procedents de 103 organismes. Des del seu descobriment, el nombre d'estudis sobre MT ha anat augmentant progressivament, de tal manera que la base de dades SciFinder indica l'existència de més de quinze mil publicacions, a raó de més de set-cents articles per any durant la dècada 1991-2001 i d'aproximadament tres-cents articles de revisió. Actualment, la majoria dels estudis en el camp de les MT s'encaminen a conèixer-ne la funció biològica, encara no totalment establerta, si bé no hi ha indicis d'un possible comportament de les MT com a metal·loenzims i, per tant, de la seva participació en processos metabòlics. D'altra banda, l'abundància d'organismes que contenen MT, la seva diversitat, des de llevats fins a mamífers, i les diverses isoformes (proteïnes que difereixen en algun aminoàcid diferent de la Cys) presents en un mateix organisme, asseguren una o diverses funcions essencials per a aquestes metal·loproteïnes.

Al llarg d'aquest treball es presentarà una visió general de les MT des de la perspectiva de la química de coordinació, fent èmfasi en les característiques estructurals, dinàmiques i de reactivitat dels agregats metall-SCys. Un article de revisió recent inclou la bibliografia més rellevant anterior al 2003.² El progrés del coneixement en aquest camp s'ha anat recollint en els *Proceedings* dels congressos internacionals dedicats exclusivament a l'estudi de les MT.^{3, 4, 5, 6}

Fonts d'obtenció, classificació i funcions

Les MT han estat aïllades d'una àmplia varietat d'organismes vius, des de procariotes fins a mamífers, passant per plantes i

invertebrats. En els animals, són particularment abundants en el fetge, els ronyons, el pàncrees i els intestins. Una característica important és que la síntesi de les MT *in vivo* i en cultius de teixits es pot induir per la presència d'ions metàl·lics, d'hormones i d'agents citotòxics. La presència d'algun d'aquests agents dona lloc a una sobreexpressió de la proteïna, i per tant augmenta el rendiment de la síntesi. Ara bé, l'aïllament de les proteïnes a partir dels organismes vius presenta nombrosos passos d'una certa complexitat. Per aquest motiu, és difícil mantenir-ne la integritat, i alhora, en el cas de les MT, evitar l'oxidació dels grups tiol a disulfur i impedir la substitució total o parcial dels metalls inicialment enllaçats. L'obtenció de les MT partint d'òrgans d'éssers vius ha estat un procediment molt utilitzat, si bé en el moment actual es va substituint per metodologies basades en l'enginyeria genètica.

Els procediments convencionals de síntesi de pèptids en fase sòlida s'han utilitzat per a l'obtenció d'algunes MT de cadena curta, com és el cas de fongs o de llevats, o per obtenir separatament els dos dominis en què s'estructuren les MT dels organismes superiors (figura 1). Avantatges propis d'aquesta metodologia són la possibilitat de fer mutacions en l'estructura primària de la MT i també poder dissenyar pèptids relacionats amb fragments de la proteïna nativa.⁷

La síntesi de proteïnes per enginyeria genètica es basa en la incorporació de la regió de DNA que codifica per una determinada proteïna en cèl·lules d'organismes senzills i ben coneguts, sovint llevats o bacteris, els quals sintetitzen la proteïna recombinant, mitjançant els mecanismes transcripcionals i traduccionals propis, allò que es coneix com a *síntesi heteròloga*. Així, la metodologia del DNA recombinant permet avui l'obtenció de MT amb independència del grau de disponibilitat dels organismes vius, i alhora s'aconsegueixen quantitats significatives de proteïna de puresa elevada. Altres avantatges d'aquesta metodologia són la possibilitat de poder disposar separatament dels diferents dominis de què estan formades les MT d'organismes superiors (figura 1), així com de formes mutades. Alhora, escollint diferents medis de cultiu, es poden aconseguir MT amb diferents continguts metàl·lics.^{8, 9}

Històricament, per classificar aquesta àmplia família de proteïnes, que inclou una important diversitat en les seqüències d'aminoàcids dels seus membres, se'n van proposar tres

classes: classe I, formada per totes aquelles MT l'estructura primària de les quals és propera a la MT de mamífer; classe II, corresponent a les MT amb seqüències allunyades de la MT de mamífer, i classe III, que inclou els pèptids de fórmula general $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{Gly}$ (on n varia de 2 a 8), anomenats *fitoquelatines* o *cadistines*, els quals no se sintetitzen via DNA, sinó enzimàticament. Més recentment, a fi de disminuir les ambigüitats que comporta la classificació anterior, se n'ha proposat una de nova (<http://www.unizh.ch/~mtpage/classif.html>) que malauradament no aporta avantatges significatius. Respecte a l'estructura primària de les MT, la característica comuna més important és la presència de fragments Cys-X-Cys i Cys-Cys-X-Cys, on X és un aminoàcid diferent de la cisteïna (Cys). Cal notar, però, que als darrers anys s'han descrit les primeres MT que contenen triplets de Cys, l'estudi de les quals pot aportar novetats quant a la capacitat coordinant i l'estructura 3D conegudes fins avui de les MT. D'altra banda, tots els vertebrats estudiats inclouen dues o més isoformes de MT, que es designen per MT 1, MT 2..., i que difereixen en la posició relativa dels residus que no són Cys al llarg de la cadena peptídica. En el cas dels mamífers, la MT 1 i la MT 2 es troben a tots els òrgans, la MT 3 s'expressa fonamentalment en el cervell i la MT 4 en els teixits estratificats.

L'origen del seu descobriment i el fet que la presència de metalls actuï com un agent inductor molt potent van facilitar l'acceptació que les MT tenen una funció detoxificadora de metalls pesants.¹⁰ Actualment, es creu que aquesta no és una funció específica de les MT, sinó més aviat una conseqüència del seu elevat contingut de residus de cisteïna.¹¹ D'altra banda, la participació de les MT en l'emmagatzematge i distribució de metalls essencials com el zinc i el coure,^{12, 13} la seva capacitat per reaccionar amb agents oxidants i amb radicals lliures,^{14, 15} i el seu paper protector del sistema nerviós central sembla que són les funcions més probables d'aquestes proteïnes.¹⁶

Caracterització espectroscòpica i estequiometria dels agregats metall-sofre en les metal·lotioneïnes

La caracterització d'una MT implica establir la naturalesa i el nombre de metalls enllaçats a la proteïna, atès que cap

d'aquests paràmetres no és necessàriament comú ni tan sols pel que fa a les diferents isoformes presents en un mateix organisme. D'altra banda, per evitar alterar el contingut metàl·lic de les proteïnes natives al llarg del procés d'aïllament i purificació, s'han descrit alguns procediments.¹⁷ Alternativament, un mètode freqüent per caracteritzar una MT consisteix en: a) síntesi i/o aïllament, b) tractament amb medi àcid fort per alliberar els metalls i obtenir la forma apo-MT, i c) reconstitució de la proteïna a pH fisiològic amb zinc o amb coure.

La caracterització analítica de l'espècie nativa o reconstituïda es pot establir mitjançant la tècnica de ICP-AES, que informa sobre la naturalesa i la quantitat de metalls presents, així com del contingut total de sofre en la mostra, cosa que permet establir l'estequiometria metall-MT sempre que el grau d'oxidació de la MT sigui menyspreable. Un problema freqüent és el cas en què no s'hagi obtingut una única espècie metall-MT, sinó diverses espècies, derivades d'una única cadena peptídica però que difereixen en el contingut metàl·lic. En aquesta situació, l'espectrometria de masses ESI-MS és de gran utilitat per indicar el nombre d'espècies que coexisteixen en solució, la seva estequiometria i l'abundància relativa. Les limitacions d'aquesta tècnica es fan evidents quan no s'aconsegueix enregistrar un bon espectre, per exemple per la presència de quantitats elevades de tampó, o quan les diverses espècies metal·lades contenen zinc i coure, metalls de pes atòmic massa proper per poder-los distingir mitjançant ESI-MS.^{18, 19}

Les espectroscòpies òptiques de CD, UV-Vis, MCD i luminescència han estat molt utilitzades per donar informació sobre el grau d'estructuració de les espècies metall-MT en solució, i també han permès el seguiment *in vitro* dels efectes de la substitució d'un metall per un altre o bé la incorporació d'un determinat metall a la forma apo-MT.^{20, 21} En el cas de MT amb dos dominis, aquestes tècniques han indicat si aquells actuen independentment o, contràriament, hi ha efectes cooperatius. Alhora, les dades obtingudes *in vitro* han estat fonamentals per poder explicar el comportament *in vivo*, en absència de dades estructurals directes.⁹ D'altra banda, respecte a la geometria de coordinació dels diversos centres metàl·lics que coexisteixen en una mateixa espècie, les tècniques òptiques es manifesten poc potents davant de sistemes d'elevada complexitat com són les MT. Així, la configuració electrònica d¹⁰ dels metalls essencials Zn(II) i Cu(I), que originen bandes de transferència de càrrega però no d-d, la presència

de diversos entorns de coordinació per a un mateix metall en una mateixa espècie metall-MT, la manca de dades bibliogràfiques sobre les longituds d'ona de les absorcions corresponents als diferents cromòfors metall d¹⁰-RS⁻, i la possible coexistència de diverses espècies en solució constitueixen serioses limitacions. De fet, l'acoblament de les espectroscòpies òptiques a tècniques separatives (HPLC, CZE), com a mínim per separar el tampó que acostuma a acompanyar la proteïna, i espectromètriques (ESI-MS), per informar sobre el nombre d'espècies metall-MT presents en la solució, ha comportat una millora significativa.²²

Pel que fa a les preferències metàl·liques, les MT dels vertebrats i els invertebrats superiors s'han aïllat majoritàriament amb zinc o bé amb una barreja de zinc i coure. En canvi, en el cas de fongs i llevats, les MT natives només contenen coure. D'altra banda, en els organismes superiors les MT s'estructuren en dos dominis, a diferència dels organismes inferiors, que formen un únic domini (figura 1). En els mamífers, l'espècie característica amb metalls divalents M₇-MT (M = Zn^{II}, Cd^{II}), que es pot representar per [M₇-(SCys)₂₀], inclou dos dominis, anomenats α i β d'estequiometria [M₄-(SCys)₁₁]^α i [M₃-(SCys)₉]^β —els quals se situen, respectivament, en els extrems C- i N-terminal de la proteïna. En els inferiors, no és possible sistematitzar l'estequiometria de les espècies Cu_x-MT, on x pren valors d'entre 6 i 15, si bé l'estructura 3D del llevat *S. cerevisiae* inclou l'agregat [Cu₇-(SCys)₁₀].

Estructura tridimensional

Si bé des del descobriment de les MT l'any 1957¹ una gran part dels estudis en aquest camp es va dirigir a determinar el seu contingut metàl·lic,²³ la primera informació estructural 3D no es va obtenir fins gairebé trenta anys més tard.²⁴ Actualment, es coneix l'estructura tridimensional d'un nombre força reduït de MT (taula 1), particularment si es compara amb el nombre de seqüències descrites (Swiss-Prot). Alhora, les estructures 3D conegudes corresponen a MT de mamífers, invertebrats i bacteris que contenen exclusivament metalls divalents, zinc i/o cadmi. De fet, les dades estructurals de MT que contenen coure(I) són encara molt més limitades, atès que es refereixen només al llevat *S. cerevisiae*, del qual descriuen la cadena peptídica, però sense incloure les connectivitats metall-proteïna.²⁵ La manca de dades 3D d'espècies Cu_x-MT s'atribueix, d'una banda, a les dificultats de cristal·lització inherents a les MT, i d'altra banda, a la inadequació dels nuclis de ⁶³Cu i ⁶⁵Cu per permetre estudis de RMN.

Les dades cristal·logràfiques de raigs X obtingudes per Cd₅Zn₂-MT 2 de rata²⁶ (figura 1) i els estudis en solució per RMN multinuclear i multidimensional de diverses espècies M^{II}₇-MT procedents de conill, ratolí o humans, indiquen no sols que l'estructura 3D de les isoformes MT 1 i MT 2 de mamífer per M = Zn, Cd són pràcticament idèntiques, sinó que les estructures en fase sòlida i en solució són essencial-

TAULA 1. Metal·lotioneïnes caracteritzades estructuralment i corresponents seqüències aminoàcídiques^{a, b}

Cd ₇ -MT 1 de ratolí	(1DFT, 1DFS)	MDPNCSCSTG GSCTCTSSCA CKNCKCTSC KSCCSCPVG CSKCAQGCVC KGAADKCTCC A
Cd ₇ -MT 2 humana	(1MHU, 2MHU)	MDPNCSCAAG DSCTCAGSCK CKECKCTSC KSCCSCPVG CAKCAQGCIC KGASDKCSCC A
Cd ₇ -MT 2 de conill	(1MRB, 2MRB)	MDPNCSCAAA GDSCTCANSK TCKACKCTSC KSCCSCPVP GCAKCAQGCIC KGAASDKCSC CA
Cd ₅ Zn ₂ -MT 2 i Cd ₇ -MT 2 de rata	(4MT2 i 1MRT, 2MRT)	MDPNCSCATD GSCSCAGSCK CKQCKCTSC KSCCSCPVG CAKCSQGCIC KEASDKCSCC A
Cd ₇ -MT 3 de ratolí ^c	(1JI9)	MDPETCPCPT GGSCTCSDKC KCKGCKCTNC KSCCSCPVA GCEKCAKDCV CKGEGAKAE AEKCSCCQ
Cd ₆ -MT 1 de cranc blau	(1DMC, 1DME)	MPGPCCNDKC VCQEGGCKAG CQCTSCRCSP CQKCTSGCKC ATKEECSKTC TKPSCCCK
Cd ₆ -MT 1 de llamàntol americà	(1HZO, 1HZR)	PGPCKDKCE CAEGGCKTGC KCTSCRCAPC EKCTSGCKCP SKDECAKTC KPCSCCXX
Cd ₇ -MTA d'eriçó de mar	(1QJK, 1QJL)	MPDVKCVCK EGKEACFGQ DCCKTGECC DGTCGGICTN AACKCANGCK CGSGCSCTEG NCAC
Zn ₄ -SmtA de <i>Synechococcus</i>	(1JJD)	MTTTLVKCA CEPCLCNVDP SKAIDRNGLY YCSEACADGH TGGSGKCGHT GCNCHG
Ag ₇ -MT i Cu ₇ -MT de <i>S. cerevisiae</i>	(1A00 i 1AQR, ^d 1FMY ^d)	QNEGHECQCQ CGSCKNNEQC QKSCSCTGCG NSDDKPCPGN KSEETKSCC SGK

a. Vegeu el text per a més detalls.

b. Els codis d'identificació del PDB es donen entre parèntesis (<http://www.rcsb.org>).

c. Només l'estructura 3D del domini α.

d. Només el pleament de la cadena peptídica.

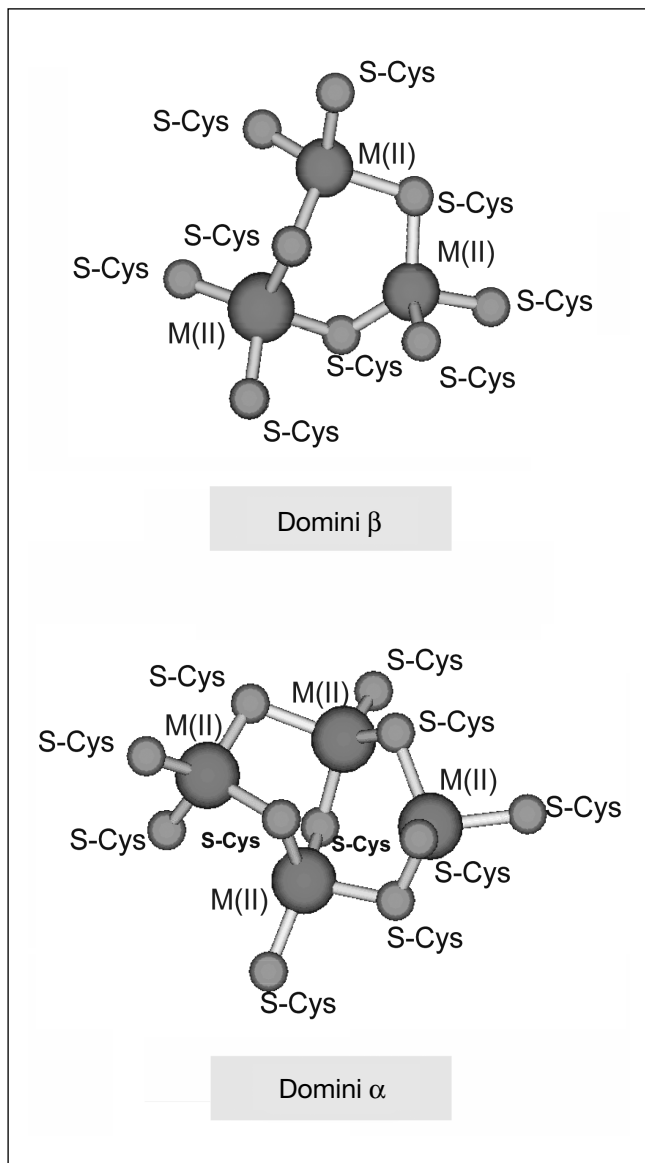


FIGURA 2. Visió esquemàtica dels agregats $M^{\text{II}}_4(\text{SCys})_{11}$ i $M^{\text{II}}_3(\text{SCys})_9$ que mostra l'entorn de coordinació tetraèdric al voltant dels centres metàl·lics. L'agregat $M^{\text{II}}_4(\text{SCys})_{11}$ està format per dos anells $M_3(\mu\text{-S})_3$ fusionats; en canvi, l'agregat $M^{\text{II}}_3(\text{SCys})_9$ està format per un únic anell $M_3(\mu\text{-S})_3$.

ment coincidents.²⁷ D'altra banda, tant les dades de raigs X com les de RMN evidencien una elevada flexibilitat de la cadena peptídica i fluctuacions dinàmiques dels metalls en el si dels corresponents agregats. En conjunt, aquestes MT són monomèriques, formades per un domini α - C-terminal i un altre β - N-terminal, ambdós de geometria quasi esfèrica. El domini α està format pels residus 31-61 i inclou l'agregat $M_4(\text{SCys})_{11}$, i el β - correspon als residus 1-30 i conté l'agregat

$M_3(\text{SCys})_9$, ambdós connectats pel segment Lys30-Lys31. Dins de cada domini, tots els centres metàl·lics estan coordinats tetraèdicament a lligands tiolat terminals i μ_2 -pontals (figura 2). El core central de l'agregat metall-sofre en el domini α es pot considerar format per dos anells fusionats $M_3(\mu\text{-S})_3$, on dos centres metàl·lics estan enllaçats a dos SCys terminals i dos SCys μ_2 pontals, mentre que els altres dos ho estan a una SCys terminal i a tres SCys pontals. En canvi, el domini β està format per un sol anell $M_3(\mu\text{-S})_3$, on els tres centres metàl·lics estan enllaçats a dos SCys terminals i dos SCys μ_2 pontals, i en conseqüència els tres són equivalents des d'un punt de vista coordinatiu. La conformació dels anells $M_3(\mu\text{-S})_3$ d'ambdós dominis es comenta més endavant.

Curiosament, les estructures tridimensionals de la isoforma MT 3 de mamífer, de tres invertebrats (un equinoïdeus i dos crustacis) i d'un bacteri, tot i la diversitat d'aquests organismes, poden descriure's prenent com a referència els agregats $M_4(\text{SCys})_{11}$ i $M_3(\text{SCys})_9$ de les isoformes MT 1 i MT 2 de mamífer (taula 1). Així, en l'espècie $\text{Cd}_7\text{-MT 3}$ de ratolí, l'estructura de l'agregat $\text{Cd}_4(\text{SCys})_{11}$ és comparable al domini α de les isoformes MT 1 i MT 2; en canvi, en el cas de l'agregat $\text{Cd}_3(\text{SCys})_9$ no ha estat possible determinar-ne l'estructura 3D, a causa de la seva elevada mobilitat. En el cas de l'eriçó de mar, els agregats metall-sofre en l'espècie $\text{Cd}_7\text{-MTA}$ són també comparables als de les isoformes MT 1 i MT 2 de mamífer, però ocupen posicions invertides, és a dir, l'agregat $(\text{Cd}_4(\text{SCys})_{11})$, o domini α , ocupa la regió N-terminal, mentre que l'agregat $\text{Cd}_3(\text{SCys})_9$, o domini β , ocupa la regió C-terminal. En canvi, l'estructura 3D dels dos crancs, que només disposen de 18 residus de Cys en la seva seqüència aminoacídica, es pot considerar formada per dos agregats $M_3(\text{SCys})_9$, la topologia dels quals és comparable a la del domini β de les MT de mamífer. Finalment, la MT SmtA de cianobacteri inclou un agregat $\text{Zn}_4(\text{SCys})_9(\text{NHis})_2$ estructuralment molt proper a $\text{Zn}_4(\text{SCys})_{11}$ de MT de mamífer, malgrat les diferències de seqüència i la presència de dues histidines (His) en substitució de dues Cys terminals. La figura 1, que inclou l'estructura 3D de $\text{Cd}_5\text{Zn}_2\text{-MT 2}$ de mamífer, de $\text{Cd}_6\text{-MTH}$ de llamàntol americà i de $\text{Zn}_4\text{-SmtA}$ de cianobacteri, permet observar les analogies estructurals comentades. D'altra banda, sembla raonable anticipar que les similituds estructurals dels agregats metall-tiolat en organismes tan distants en l'escala evolutiva, des de bacteris fins a mamífers, han d'estar associades a funcions comunes o molt properes de les MT en tots els organismes vius.

Els tiolats metàl·lics com a models dels agregats metall-sofre en les metal·lotioneïnes

Les dades estructurals i espectroscòpiques de les MT avui conegudes indiquen que la coordinació dels centres metàl·lics a la cadena peptídica procedeix exclusivament mitjançant els residus de Cys, amb l'única excepció de l'espècie $Zn_4(SCys)_9(NHis)_2$ en la MT SmtA de bacteri. En conseqüència, la química de coordinació dels tiolats metàl·lics hauria de poder aportar models sintètics i alhora contribuir a l'estudi dels agregats metall-SCys en les MT. De fet, aquesta relació ha donat fruits importants en el camp d'altres metal·loproteïnes en què les Cys participen en la coordinació a metalls, com és el cas de les ferredoxines i de les proteïnes de ferro de potencial elevat (HIPIP).

La química dels tiolats de metalls de transició presenta unes característiques particulars i una complexitat no gens menyspreable. D'una banda, la tendència dels lligands tiolats a formar complexos de nuclearitat elevada, com a conseqüència de la seva facilitat per formar pont entre dos o més centres metàl·lics, és ben coneguda. Aquesta tendència no exclou que el grup tiolat també actuï com a lligand terminal o que el sofre estableixi interaccions secundàries addicionals amb els esmentats centres. D'altra banda, la possibilitat que un mateix metall presenti diferents geometries de coordinació en un mateix complex no és excepcional en els tiolats de metalls amb configuració electrònica d^{10} . Al contrari, la coexistència de les geometries lineal, planotrigonal o tetraèdrica és freqüent. Per tot això, en la majoria de les reaccions de síntesi de tiolats metàl·lics no és fàcil predir l'estequiometria $[M_x(SR)_y]^z$ del complex ni l'estereoquímica al voltant dels centres metàl·lics.²⁹ En resum, l'obtenció de models sintètics dels agregats metall-SCys en les MT troba les limitacions inherents a la química dels tiolats metàl·lics.

Respecte als agregats metall-sofre en les MT, és sorprenent que en les MT caracteritzades estructuralment només s'hagin trobat dos tipus estructurals bàsics, de fórmula $M_3(SCys)_9$ i $M_4(SCys)_{11}$ ($M = Zn, Cd$), malgrat les diferències en la composició de la cadena peptídica i en la posició relativa dels residus de Cys (taula 1, figura 1). Encara més sorprenent és que dins de l'extensa família dels tiolats metàl·lics no es trobin exemples de complexos de fórmula $[M_3(SR)_9]^{3-}$ o $[M_4(SR)_{11}]^{3-}$

($M = Zn, Cd$) ni en fase sòlida, d'acord amb el CSD,²⁹ ni en solució.³⁰ D'altra banda, un dels procediments més freqüents per superar les dificultats trobades en la determinació de l'estructura 3D de les espècies Cu_x -MT, consisteix en la substitució de l'ió $Cu(I)$ per $Ag(I)$, cosa que permet fer estudis de RMN de ^{107}Ag . Recentment però, s'ha posat en dubte la isoestructuralitat de les espècies M^I -MT, $M = Cu, Ag$.²⁵ Ambdues qüestions, l'absència de models dels agregats M^{II} -MT ($M = Zn, Cd$) i la

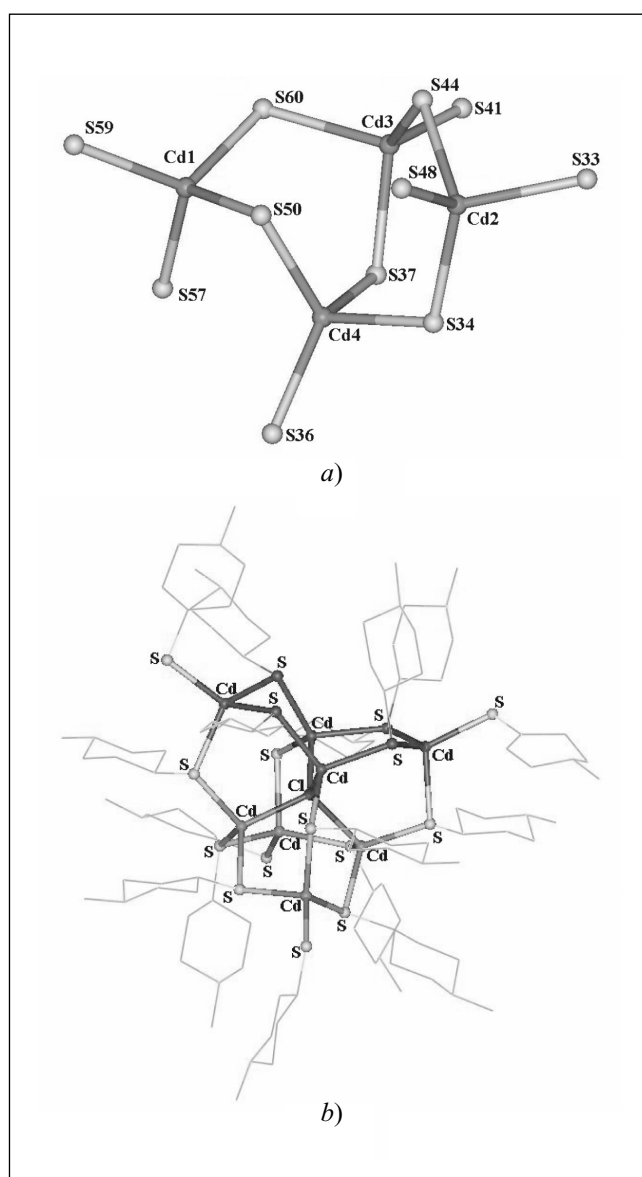


FIGURA 3. Comparació de: a) l'agregat $Cd_4(SCys)_{11}$ del domini α de Cd_5,Zn_2 -MT de fetge de rata (figura 1) amb b) un fragment de l'esquelet del catió $[Cd_8\{SCH(CH_2CH_2)_2N(H)Me\}_{16}]^{15+}$. Els dos anells Cd_3S_3 fusionats mostren conformacions de vaixell distorsionat (esquerra) / sofà (dreta) en l'agregat $M_4(SCys)_{11}$ de la MT i de vaixell distorsionat / vaixell distorsionat en el catió.

isoestructuralitat de les espècies M^I-MT (M = Cu, Ag), meixen una consideració més gran.

La disposició estèrica dels ions Zn^{II} i/o Cd^{II} i dels àtoms de sofre en els agregats M₃(SCys)₉ i M₄(SCys)₁₁ de les MT es pot descriure mitjançant els angles de torsió que defineixen la

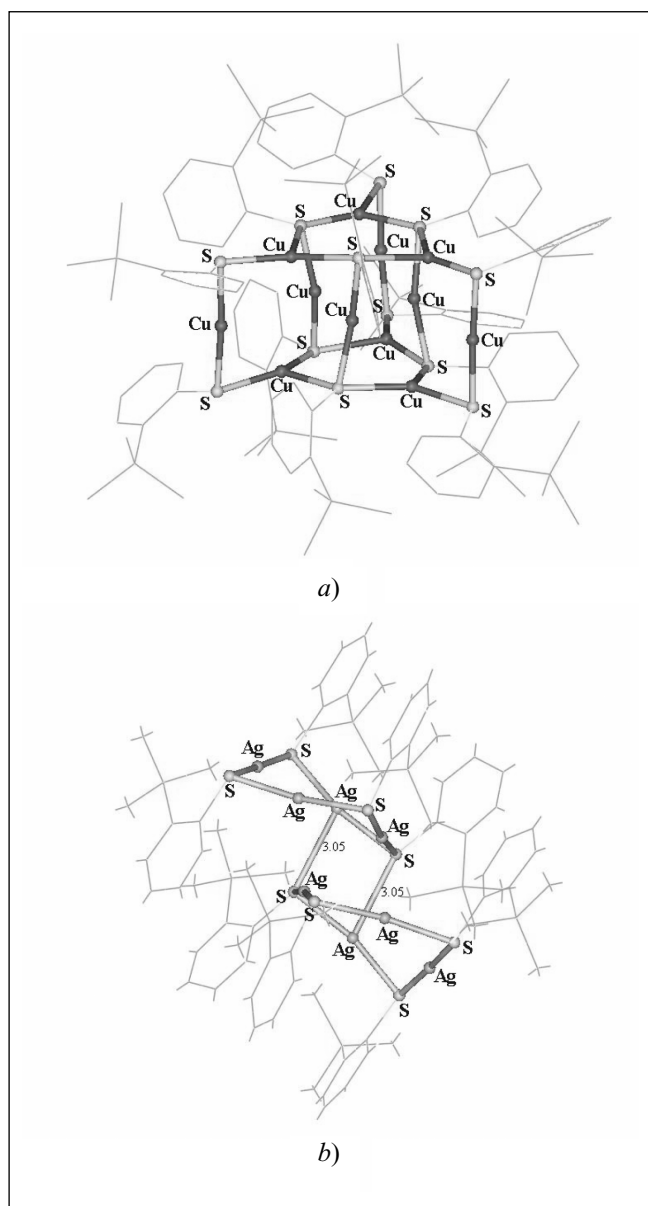


FIGURA 4. Comparació estructural de tiolats de coure i plata amb el mateix lligand i la mateixa fórmula empírica. Visió de perspectiva de: a) $[\text{Cu}(\text{SC}_6\text{H}_4\text{-o-SiMe}_3)]_{12}$, i b) $[\text{Ag}(\text{SC}_6\text{H}_4\text{-o-SiMe}_3)]_4$, en què s'assenyala l'agregat $\text{Cu}_{12}\text{S}_{12}$ i la fusió de dues unitats Ag_4S_4 mitjançant interaccions secundàries $\text{Ag}\cdots\text{S}$ (3,05 Å).

conformació d'un anell de sis membres. Si es calculen els valors d'aquests angles a partir de les coordenades atòmiques del *Protein Data Bank* (taula 1), es conclou que els anells $\text{M}^{\text{II}}_3\text{S}_3$ en els agregats $\text{M}_3(\text{SCys})_9$ presenten majoritàriament una conformació de vaixell distorsionat. Alhora, els dos anells fusionats que constitueixen l'agregat $\text{M}_4(\text{SCys})_{11}$ mostren una clara preferència per la combinació sofà / vaixell distorsionat. El predomini de la conformació tipus vaixell en les MT contrasta significativament amb la conformació cadira que habitualment presenten els anells $\text{M}^{\text{II}}_3\text{S}_3$ en els tiolats metàl·lics. Així, una cerca de models sintètics dels agregats $\text{M}_3(\text{SCys})_9$ i $\text{M}_4(\text{SCys})_{11}$ en el CSD²⁹ mostra que els anells $\text{M}^{\text{II}}(\mu\text{-S})_3$ i les unitats $\text{M}_4^{\text{II}}(\mu\text{-S})_5$ (figura 2) només es troben formant part de tiolats d'elevada nuclearitat amb estructura tipus adamantà, i en conseqüència la conformació dels anells $\text{M}^{\text{II}}_3\text{S}_3$ és de tipus cadira. De fet, l'exemple més proper a la conformació de l'agregat $\text{Cd}_4(\text{SCys})_{11}$ del fragment α -MT de mamífer es troba en un catió de fórmula $[\text{ClCd}_8\{\text{SCH}(\text{CH}_2\text{CH}_2)_2\text{N}(\text{H})\text{Me}\}_{16}]^{15+,31}$ tal com es mostra a la figura 3. En resum, les diferents conformacions dels anells $\text{M}^{\text{II}}_3\text{S}_3$ en les MT estructuralment caracteritzades respecte a les que s'han descrit en els tiolats metàl·lics indiquen l'important paper de la cadena peptídica per establir i estabilitzar unes conformacions anòmales des de la perspectiva de la química de coordinació.

Quant a la utilització de l'ió $\text{Ag}(\text{I})$ com a sonda del $\text{Cu}(\text{I})$ en les espècies $\text{Cu}_x\text{-MT}$, la química de coordinació aporta dades sobre les conseqüències estructurals de l'esmentada substitució. Així, una anàlisi dels tiolats de fórmula general $\text{M}_x^{\text{I}}(\text{SR})_y$, $\text{M} = \text{Ag}$ o Cu , trobats en el CSD, permet concloure que en el cas del Cu la geometria de coordinació predominant és planotrigonal, seguida de la lineal o de la coexistència d'ambdues geometries. En canvi, en el cas de la Ag , la geometria de coordinació predominant és lineal, seguida de la coexistència de lineal, planotrigonal i tetraèdrica. Alhora, s'evidencia que l'ió plata dona lloc molt més sovint que el coure a espècies polimèriques i a interaccions secundàries metall-sofre. És particularment d'interès el fet que el mateix lligand tiolat doni complexos de fórmula diferent quan reacciona amb coure o plata en condicions anàlogues, o s'arribi al cas que complexos de coure o plata amb la mateixa fórmula presentin estructures diferents,³² com es mostra a la figura 4. Totes aquestes dades corroboren els dubtes sorgits en relació amb l'adequació de l'ió $\text{Ag}(\text{I})$ com a substitut del $\text{Cu}(\text{I})$ en la determinació estructural de les espècies $\text{Cu}_x\text{-MT}$.²²

Aspectes dinàmics i de reactivitat

L'elucidació de les funcions fisiològiques de les MT dona un interès particular a les propietats dinàmiques d'aquestes proteïnes, que es van posar de manifest en els estudis cristal·logràfics en fase sòlida i de RMN bidimensional en solució. Les dades actuals indiquen que les MT són molècules flexibles, en què els agregats metàl·lics i els fragments de les cadenes peptídiques compresos entre els residus de Cys experimenten fluctuacions estructurals. Més recentment, s'ha demostrat que hi ha interaccions entre els agregats metàl·lics d'una mateixa MT i també entre diferents molècules de MT.¹¹

La manca de rigidesa estructural, anomenada *fluxionalitat*, és una característica dels agregats M_xS_y en tiolats de fórmula $[M_x(SR)_y]^z$. El grau de flexibilitat mecànica en els complexos $[M_x(SR)_y]^z$ és inversament proporcional al seu grau de connectivitat, és a dir, al nombre d'enllaços M-S, i augmenta amb la grandària dels anells $M_n(SR)_n$ que constitueixen l'agregat. Com a conseqüència de la fluxionalitat, els complexos $[M_x(SR)_y]^z$ donen lloc a isòmers configuracionals (aquells que es diferencien per les orientacions relatives dels seus enllaços), tal com s'ha observat cristal·logràficament en els complexos $[M_5(SR)_6]^z$ amb $M = Cu$ ($z = -1$),³³ o Ag ($z = 2$)³⁴ (figura 5). A més de les característiques dinàmiques, els tiolats de metalls del grup 12 mostren en solució labilitat cinètica, és a dir, la contínua formació i trencament dels enllaços metall-sofre. En conseqüència, si aquestes propietats dels tiolats metàl·lics són presents en les MT, les propietats dinàmiques

d'aquestes proteïnes podrien ser degudes a la flexibilitat estructural i a la labilitat cinètica dels agregats $[M_x(SCys)_y]$ que les formen. Resumint el plantejament anterior, es podria dir que la naturalesa d'agregat metall-tiolat del core de les MT explica unes propietats dinàmiques poc habituals si es compara amb d'altres metal·loproteïnes, i també la mobilitat de la seva cadena peptídica, atès que el plegament de les MT està essencialment determinat per l'enllaç dels residus de Cys als centres metàl·lics.

En totes les MT caracteritzades estructuralment que consten d'un domini α i un domini β , el primer és més rígid que el segon. La major mobilitat del domini β respecte a l' α està d'acord amb les regles establertes per als complexos $[M_x(SR)_y]^z$, segons les quals un fragment M_3S_3 (format per sis àtoms, sis enllaços M-S i un únic anell $M_3(SR)_3$) ha de tenir més flexibilitat mecànica que un fragment M_4S_5 (format per nou àtoms, deu enllaços M-S i dos anells fusionats $M_3(SR)_3$). Ara bé, les diferents flexibilitats observades en el domini β en les diferents isoformes de MT de mamífer (MT-3 > MT-2 > MT-1) i la diferent estabilitat cinètica dels dos dominis β de les MT de crustaci mostren un important paper de la cadena peptídica en el control i regulació de les característiques químiques i estructurals dels agregats metall-sofre en les MT.

Les MT són unes metal·loproteïnes molt reactives, en què l'elevada estabilitat termodinàmica està associada a una elevada labilitat cinètica. Aquesta labilitat explica el bescanvi d'ions metàl·lics en el si d'un mateix agregat metall-sofre, i

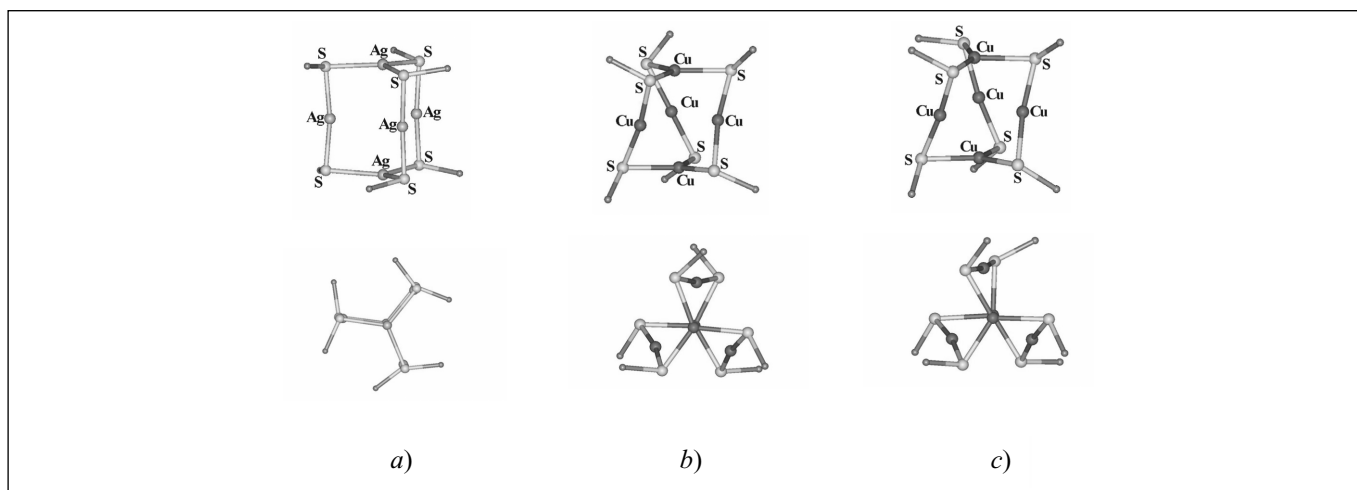


FIGURA 5. Visió de perspectiva dels agregats $[M_5(SR)_6]^z$ en els complexos: a) $[Ag_5\{\mu-S(CH_2)_3NHMe_2\}_3\{\mu-S(CH_2)_3NMe_2\}_3](ClO_4)_2$, b) $(Et_4N)[Cu_5(\mu-SBu')_6]$ i c) $(Et_3NH)[Cu_5(\mu-SBu')_6]$, i visió segons l'eix $M_{trig}-M_{trig}$, evidenciant la fluxionalitat dels agregats M_5S_6 .

també amb ions metàl·lics presents en la solució, o que pertanyen a d'altres molècules de MT. L'estabilitat termodinàmica estableix l'afinitat dels centres metàl·lics per als diferents entorns de coordinació en una determinada MT, i també l'ordre d'incorporació a la proteïna per desplaçament dels metalls que hi són inicialment enllaçats, ordre que està d'acord amb l'afinitat metall-sofre observada en els tiolats metàl·lics: Hg(II) > Ag(I) ~ Cu(I) > Cd(II) > Zn(II).

La substitució dels metalls inicialment enllaçats a les MT per d'altres metalls, o l'alliberament dels primers per coordinació a lligands competidors, són processos molt importants des del punt de vista de les interaccions de les MT amb els components cel·lulars, i per tant objecte d'intensos estudis. Així, la química cel·lular de les MT, la transferència de metalls entre MT i enzims, i la nucleofilicitat de les Cys respecte a agents electròfils, com ara agents alquilants, oxidants i espècies radicalàries, són avui temes del màxim interès. En resum, les dades experimentals actuals indiquen que la labilitat cinètica inherent als tiolats dels metalls de transició i la nucleofilicitat del sofre tiolat constitueixen les bases de la reactivitat de les MT. La influència de la cadena peptídica en el control i modulació d'aquestes propietats sembla essencial per determinar el paper fisiològic, encara força enigmàtic, d'aquestes proteïnes tan particulars.

Abreviatures

MT	Metal·lotioneïna
DNA	Àcid desoxiribonucleic
Cys	Cisteïna
His	Histidina
Lys	Lisina
Glu	Àcid glutàmic
Gln	Glutamina
Gly	Glicina
UV-Vis	Ultraviolat-visible
CD	Dicroisme circular
MCD	Dicroisme circular magnètic
ES MS	Espectrometria de masses amb ionització per electroesprai
3D	Tridimensional
RMN	Ressonància magnètica nuclear
CSD	Base de dades estructural de Cambridge
PDB	Banc de dades de proteïnes

Referències bibliogràfiques

- MARGOSHES, M.; VALLEE, B. L. *J. Am. Chem. Soc.*, núm. 79 (1957), p. 4813-4814.
- GONZÁLEZ-DUARTE, P., «Metallothioneïns». A: McCLEVERTY, J. A.; MEYER, T. J. [ed.] *Comprehensive Coordination Chemistry II*. Vol. 8. Elsevier, 2003, p. 213-228.
- KÄGI, J. H. R.; NORDBERG, M. [ed.]. *Metallothionein I. Experientia Suppl.* Vol. 34. Basilea: Birkhäuser Verlag, 1979.
- KÄGI, J. H. R.; KOJIMA, Y. [ed.]. *Metallothionein II. Experientia Suppl.* Vol. 52. Basilea: Birkhäuser Verlag, 1987.
- SUZUKI, K. T.; IMURA, N.; KIMURA, M. [ed.]. *Metallothionein III. Biological roles and medical implications*. Basilea: Birkhäuser Verlag, 1993.
- KLAASEN, C. D. [ed.]. *Metallothionein IV*. Basilea: Birkhäuser Verlag, 1999.
- OKADA, Y.; TANAKA, K.; SAWADA, J.; KIKUCHI, Y. «Synthetic Metallothioneïns». A: STILLMAN, M. J.; SHAW III, C. F.; SUZUKI, K. T. [ed.]. *Metallothioneïns*. Nova York: VCH, 1992, cap. 9, p. 195-225.
- COLS, N.; ROMERO-ISART, N.; BOFILL, R.; CAPDEVILA, M.; GONZÁLEZ-DUARTE, P.; GONZÁLEZ-DUARTE, R.; ATRIAN, S. *Prot. Engng.*, núm. 12 (1999), p. 265-269.
- BOFILL, R.; CAPDEVILA, M.; COLS, N.; ATRIAN, S.; GONZÁLEZ-DUARTE, P. *J. Biol. Inorg. Chem.*, núm. 6 (2001), p. 408-417.
- KLAASSEN, C. D.; LIU, J.; CHOUDHURI, S. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, núm. 39 (1999), p. 267-294.
- ZANGGER, K.; ARMITAGE, I. M. *J. Inorg. Biochem.*, núm. 88 (2002), p. 135-143.
- COUSINS, R. J. *Physiol. Rev.*, núm. 65 (1985), p. 238-309.
- BREMNER, I. «Nutritional and Physiological Significance of Metallothionein». A: KÄGI, J. H. R.; KOJIMA, Y. [ed.]. *Metallothionein II. Experientia Suppl.* Vol. 52. Basilea: Birkhäuser Verlag, 1987, p. 81-107.
- SATO, M.; BREMNER, I. *Free Radic. Biol. Med.*, núm. 14 (1993), p. 325-337.
- KANG, Y. J. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, núm. 222 (1999), p. 263-273.
- HIDALGO, J.; ASCHNER, M.; ZATTA, P.; VAŠÁK, M. *Brain Res. Bull.*, núm. 55 (2001), p. 133-145.
- RIORDAN, J. F.; VALLEE, B. L. [ed.]. *Methods in Enzymology* [San Diego: Academic Press], vol. 205 (1991).
- HATHOUT, Y.; REYNOLDS, K. J.; SZILAGYI, Z.; FENSELAU C. *J. Inorg. Biochem.*, núm. 88 (2002), p. 119-122.
- GEHRIG, P. M.; YOU, C.; DALLINGER, R.; GRUBER, C.;

- BROUWER, M.; KÄGI, J. H. R.; HUNZIKER, P. E. *Protein Science*, núm. 9 (2000), p. 395-402.
- 20) STILLMAN, M. J. *Coord. Chem. Rev.*, núm. 144 (1995), p. 461-511.
- 21) KÄGI, J. H. R. «Overview of Metallothionein». RIORDAN, J. F.; VALLEE, B. L. [ed.]. *Methods in Enzymology* [San Diego: Academic Press], vol. 205 (1991), p. 613-626.
- 22) PALACIOS, Q.; POLEC-PAWLAK, K.; LOBINSKI, R.; CAPDEVILA, M.; GONZÁLEZ-DUARTE, P. *J. Biol. Inorg. Chem.*, núm. 8 (2003), p. 831-842.
- 23) VALLEE, B. L.; MARET, W. «The Functional Potential and Potential Functions of Metallothioneins: A Personal Perspective». A: SUZUKI, K. T.; IMURA, N.; KIMURA, M. [ed.]. *Metallothionein III. Biological roles and medical implications*. Basilea: Birkhäuser Verlag, 1993, p. 1-9.
- 24) OTVOS, J. D.; ARMITAGE, I. M. *Proc. Natl. Acad. Sci. [USA]*, núm. 77 (1980), p. 7094-7098.
- 25) BERTINI, I.; HARTMAN, H.-J.; KLEIN, T.; LIU, G.; LUCHINAT, C.; WESER, U. *Eur. J. Biochem.*, núm. 267 (2000), p. 1008-1018.
- 26) ROBBINS, A. H.; McREE, D. E.; WILLIAMSON, M.; COLLETT, S. A.; XUONG, N. H.; FUREY, W. F.; WANG, B. C.; STOUT, C. D. *J. Mol. Biol.*, núm. 221 (1991), p. 1269-1293.
- 27) MESSERLE, B. A.; SCHÄFFER, A.; VAŠÁK, M.; KÄGI, J. H. R.; WÜTHRICH, K. J. *Mol. Biol.*, núm. 225 (1992), p. 433-443.
- 28) DANCE I. G. *Polyhedron*, núm. 5 (1986), p. 1037-1104.
- 29) ALLEN, F. H.; KENNARD, O. *Chem. Des. Autom. News*, núm. 8 (1993), p. 31-37.
- 30) GONZÁLEZ-DUARTE, P.; VIVES, J. *Inorg. Chem.*, núm. 28 (1989), p. 25-30.
- 31) GONZÁLEZ-DUARTE, P.; CLEGG, W.; CASALS, I.; SOLÀ, J.; RIUS, J. J. *Am. Chem. Soc.*, núm. 120 (1998), p. 1260-1266.
- 32) BLOCK, E.; GERON, M.; KANG, H.; OFORI-OKAI, G.; ZUBIETA, J. *Inorg. Chem.*, núm. 28 (1989), p. 1263-1271.
- 33) BOWMAKER, G. A.; CLARK, G. R.; SEADON, J. K.; DANCE, I. G. *Polyhedron*, núm. 3 (1984), p. 535-544.
- 34) GONZÁLEZ-DUARTE, P.; SOLÀ, J.; VIVES, J.; SOLANS, X. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, (1987), p. 1641-1642.

Autora

Pilar González Duarte (1945) es va llicenciar en ciències químiques a la Universitat de Barcelona. Tot seguit, després d'una estada de dos anys a la Universitat de Michigan (Ann Arbor, EUA), va obtenir el títol de màster en química. Posteriorment, s'incorporà a la Universitat Autònoma de Barcelona, on es doctorà el 1975 amb una tesi en el camp de la química analítica. Des del 1990 és catedràtica de Química Inorgànica de la Universitat Autònoma de Barcelona, on ha dut a terme la seva tasca investigadora, que s'estén des de la química de coordinació dels tiolats metàl·lics fins a la química bioinorgànica de les metal·lotioneïnes.