

Compendi metodològic

1- EL CLONATGE, LA SÍNTESI HETERÒLOGA I LES VALORACIONS: Agregats metall-MT obtinguts *in vivo* i *in vitro*

Els agregats estudiats són sintetitzats heteròlogament en *E.coli*

Els agregats metall-MT que s'han usat en aquesta tesi han estat sintetitzats de manera recombinant en *E.coli*. La síntesi s'ha realitzat en medis de cultiu enriquits en Zn, Cu o Cd, i els corresponents agregats metall-MT són especialment significatius des d'un punt de vista biològic pel fet d'haver estat sintetitzats en un ambient i per mecanismes biològics. És per això que aquests agregats són anomenats de manera genèrica en aquesta tesi agregats metall-MT "*in vivo*", per diferenciar-los dels agregats formats "*in vitro*" per reaccions de bescanvi de metalls partint d'agregats Zn-MT, o per reconstituïció a partir de pèptids MT apo, com tradicionalment es troba en la literatura. El procés de síntesi i purificació va ésser posat a punt per anteriors investigadors en el si del grup de treball en què s'ha desenvolupat aquesta tesi, i estan descrits bàsicament en els articles Capdevila *et al.*, 1997 i Cols *et al.*, 1997. La metodologia general d'aquests processos consta de les següents etapes:

1) Clonatge del cDNA de la MT a estudiar en el vector d'expressió pGEX: Mitjançant PCR, als extrems del cDNA, s'hi afegeixen dianes de restricció, mercès a les quals s'inserta el cDNA en el MCS (lloc de clonatge) del vector. El resultat és un plasmidi pGEX-MT que conté una pauta de lectura codificant per a una proteïna de fusió GST-MT. La seqüència de cadascun dels plasmidis és confirmada en tots els casos per seqüenciació de DNA.

2) Amb el plasmidi pGEX-MT es transformen bacteris *E.coli* BL21. En la fase de creixement exponencial dels cultius corresponents, es suplementa el medi de cultiu amb la sal metàl·lica del metall desitjat (ZnCl₂ 300µM, CuSO₄ 500µM, ZnCl₂ 300µM, com a concentracions finals), i s'indueix la síntesi de la proteïna de fusió GST-MT mitjançant IPTG, ja que la

seqüència codificant resta sota el control del promotor *Ptac* en el plasmidi pGEX-MT.

Després de 3h de creixement, les cèl·lules són lisades, i la proteïna de fusió GST-MT, purificada per cromatografia d'afinitat amb GSH-sepharose. Després de digerir la proteïna recombinant amb trombina, ja que hi ha un lloc de tall específic a la zona d'unió GST-MT, la fracció GST és separada de la fracció MT per una segona cromatografia d'afinitat amb GSH-sepharose. La fracció que conté la MT és sotmesa encara a un darrer pas de purificació per FPLC (Columna Superdex 75), del que se n'obtenen els agregats metall-MT sintetitzats *in vivo* i en puresa i concentracions adequades per a l'anàlisi espectroscòpica (Dicroisme Circular, UV-vis, ICP-AES, espectroscòpia Raman, espectroscòpia IR) i espectromètrica (espectrometria de masses). Totes aquestes tècniques es comentaran a continuació.

Posteriorment a la caracterització dels agregats obtinguts *in vivo* per als tres metalls (Zn, Cu i Cd), els experiments *in vitro* (bàsicament per valoració volumètrica de les mostres obtingudes *in vivo* amb solucions metàl·liques o àcids de concentració coneguda) permeten aconseguir més informació sobre els agregats obtinguts. Les valoracions metàl·liques es basen en les preferències dels grups tiolat: el Zn(II) enllaçat a les MT es veurà substituït *in vitro* per Cu(I) o Cd(II), proporcionant el que es denomina en aquesta tesi "agregats obtinguts *in vitro*". L'estudi del procés i de les propietats de les espècies intermèdies i finals mitjançant ESI-MS, DC i UV-vis dona informació sobre la cooperativitat, canvis estructurals, i altres característiques del procés de formació dels agregats. Quan aquest procés es realitza en una mateixa cubeta per a dos agregats metall-MT, rep en aquesta tesi el nom de covaloració. Les valoracions amb sulfurs es realitzen amb una mecànica idèntica a les valoracions metàl·liques, amb la diferència que el que s'addiciona a la mostra són ions de sulfur (S²⁻). Aquestes valoracions es poden fer també sobre mostres obtingudes *in vitro*. Les valoracions àcides es basen en la

capacitat dels grups tiolat de protonar-se. A causa d'aquesta propietat, tot i l'elevada afinitat dels grups tiolat pels ions metàl·lics aquests darrers poden ésser desplaçats del grup tiolat (RS⁻), generant-se el grup tiol (RSH), amb la conseqüent alliberació del metall de la MT. Mitjançant addicions paulatines d'àcid es va disminuint el pH d'una mostra que conté agregats metall-MT fins a pH àcids (pH 0.5-1) i es reneutralitza a pH 7 tot observant l'evolució de la composició, i canvis estructurals dels agregats metall-MT per ESI-MS i DC. Les **valoracions per competició** o demetalacions es basen en la competició que s'estableix entre la MT i un altre agent complexant dels metalls units a la MT. La concentració del complexant competidor respecte la concentració de MT va augmentant al llarg de la valoració, i s'observa l'evolució de l'estructuració dels agregats (mitjançant DC). L'agent usat per a les valoracions per competició és en aquesta tesi l'EDTA, un agent complexant de ions divalents, raó per la qual les valoracions per competició no es poden fer amb MT que contenen Cu(I) (monovalent).

Mentre la valoració metàl·lica és una tècnica experimental usada habitualment per els grups de recerca en què s'emmarca el treball experimental associat a aquesta tesi, la valoració àcida, la valoració amb sulfurs i la valoració per competició són innovacions en el nostre procediment d'estudi de les MT, que s'han incorporat de manera rutinària en els protocols de caracterització.

2- ESPECTROSCÒPIA D'EMISSION ATÒMICA DE PLASMA ACOBLAT PER INDUCCIÓ (ICP-AES), ANÀLISI D'AMINOÀCIDS I MÈTODE ELLMANN

L'ICP-AES permet saber la concentració de proteïna i l'estequirmetria mitjana d'unió a metalls

La tècnica d'ICP-AES es basa en la vaporització de la mostra i la seva excitació a temperatures elevades, quan es forma una nova fase, anomenada fase *plasma*. Com a

resultat, cada àtom emet a longituds d'ona característiques, energies que es poden detectar i quantificar, comparant-les amb les enregistrades per a mostres patró analitzades en les mateixes condicions.

El contingut de S, Zn, Cd i Cu es determina correlacionant l'absorbància de les mostres a les longituds d'ona de màxima absorbància de cada element (S a 182.040 nm, Zn a 213.856 nm, Cd a 228.802 nm i Cu a 324.803 nm) amb les de rectes patró construïdes per a aquests elements.

El càlcul de la concentració de MT es basa en la mesura del contingut de S de la mostra. La Cys i la Met són els únics aminoàcids sulfurats, i per tant, dividint la concentració de S per la suma del nombre de Cys i Met que conté cada molècula de MT, s'obté com a resultat la concentració de MT de la mostra. De la relació entre aquesta concentració i la dels metalls (Zn, Cu, i Cd) se'n dedueix el contingut metàl·lic mitjà per molècula de MT. Aquest procediment descrit inicialment per Bongers *et al.* (1988), és usat habitualment en el grup de recerca, i les lectures es duen a terme en un espectròmetre Polyscan 61E (Thermo Jarrell Ash), ubicat a les instal·lacions dels Serveis Científic-Tècnics de la Universitat de Barcelona.

L'acidificació de la mostra permet detectar la presència de sulfur inorgànic i evitar-ne interferències

Tal com es presenta en el capítol 4 d'aquesta tesi, les MT poden contenir sofre inorgànic en forma de sulfur.

L'anió sulfur és sofre en estat reduït (S²⁻), que en condicions àcides genera àcid sulfhídric (H₂S), un compost gasós, que, per tant, es desprèn fàcilment de les solucions.

Tal com s'ha comentat. L'ICP-AES, permet el càlcul de la concentració de MT a partir de la concentració de S, en el supòsit que tots els àtoms de S pertanyin als aminoàcids de la MT. Així doncs, la presència d'àtoms de sofre inorgànic en una mostra dona lloc a una sobreestimació de la concentració de MT en una mostra, i per tant, automàticament, a unes estequiometries erròniament disminuïdes. Mitjançant

l'acidificació de la mostra prèvia a la mesura d'ICP, s'aconsegueix la pèrdua dels ions sulfur de la mostra líquida en forma de H_2S (gas). Per tant, aquest protocol de tractament de la mostra (anomenat en aquesta tesi ICP_{àcid}) permet obtenir dades més fiables sobre la concentració real de la MT. Per a confirmar la validesa de la concentració de MT determinada per ICP_{àcid}, aquesta s'ha confirmat en alguns casos per anàlisi d'aminoàcids, que es basa en la hidròlisi àcida de la mostra, la quantificació dels aminoàcids mitjançant cromatografia, i l'extrapolació de la concentració dels aminoàcids Ser, Lys i Gly a MT total. Aquests anàlisis s'han dut a terme en un analitzador Alpha Plus Amino Acid Aut analyzer (Pharmacia LKB), ubicat a les instal·lacions dels Serveis Científic-Tècnics de la Universitat de Barcelona.

El mètode d'Ellman permet mesurar la quantitat de grups tiol d'una mostra

Els tiolats cisteínics de les MT són sensibles a l'oxidació i per això pot ésser útil mesurar la quantitat de grups tiol en estat reduït per molècula de MT, per tal de determinar així la proporció de Cys amb el grup tiolat oxidat, és a dir, el grau d'oxidació de la mostra.

Aquesta determinació es pot fer a partir de la reacció del DTNB (àcid 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoic) amb els grups tiolat, ja que, en presència de grups tiolat, aquest compost es redueix donant lloc al dianió 5-tio-2-nitrobenzoat, TNB^{2-} , de color groc intens, que presenta un màxim d'absorció a 412 nm. En presència d'un excés de DTNB, la formació de TNB^{2-} és directament proporcional a la concentració de grups tiol – $[-\text{SH}]_0$ – continguts en la mostra. La concentració dels grups TNB^{2-} formats es mesura per la seva absorció a 412 nm en un espectrofotòmetre i serveix per a calcular la concentració de tiols inicial a la mostra, mitjançant la fórmula:

$$\Delta A_{412} = \epsilon_{\text{TNB}} [-\text{SH}]_0$$

ΔA_{412} : Increment d'absorbància a 412 nm

ϵ_{TNB} : coeficient d'extinció molar del TNB^{2-}

En cas que la mostra contingui ions sulfur, la quantificació de grups tiol per el mètode d'Ellman es pot veure interferida per aquests ions, ja que aquests també prenen part en la reacció (Nashef *et al.*, 1977), donant lloc a determinacions incorrectes de les concentracions de grups tiolat, i per això el seu ús en aquesta tesi és restringit.

3- ESPECTROSCÒPIES UV I CD

Les tècniques d'absorció UV-vis i Dicroisme Circular (CD) permeten detectar diferències entre estructures formades per metalls diferents o per el mateix metall en entorns de coordinació diferents, gràcies a les energies d'absorció característiques d'aquests metalls quan estan coordinats amb cada lligand. L'ús d'aquestes tècniques per a estudiar agregats metall-MT és habitual en el nostre grup de recerca.

El CD mesura la quiralitat

El CD és una mesura de la interacció de la llum polaritzada circularment amb substàncies òpticament actives (quirals), que es quantifica mitjançant un paràmetre anomenat el·lipticitat (θ). Les molècules quirals presenten el·lipticitat a diverses longituds d'ona, depenent de les característiques dels enllaços que les formen. Mentre les energies d'absorció situades per sota dels 220 nm es poden atribuir a la cadena peptídica, les bandes que s'aprecien entre 220 i 400 nm es poden atribuir a Bandes de Transferència de Càrrega (BTC) entre els lligands i els metalls (Kägi & Kojima, 1987; Vasak, 1991). En les metal·loproteïnes, la formació d'estructures tridimensionals metall-proteïna comporta una transferència de quiralitat de la proteïna al metall (cromòfor), que serà condicionada per la quantitat i el tipus d'interacció entre el ambdós, i comportarà un desviament dels plans de polarització de la llum. L'Apo-MT (MT demetalada) no té metalls units, i per tant no presenta quiralitat per sobre de 220 nm (excepció feta dels aminoàcids aromàtics, que sí poden presentar lleugeres absorcions). En canvi, quan la MT es troba enllaçada a metalls (holo-MT), els centres

metàl·lics reben la quiralitat de la proteïna i en funció del seu entorn de coordinació (nombre, disposició i identitat dels lligands) i del tipus de metall que es tracti generen absorcions de CD entre 220 i 400 nm que poden variar de naturalesa en funció del grau d'estructuració de l'agregat.

Les absorcions de CD es correlacionen amb diferents cromòfors

El CD es representa sobre l'eix d'abscisses per les longituds d'ona (energies d'absorció), i les intensitats d'absorció en les ordenades. L'absorció mesurada com a el·lipticitat (θ) es corregeix per la concentració de proteïna i genera així el paràmetre $\Delta\epsilon$, que permet comparar els dicroïsmes de diferents proteïnes, mitjançant la fórmula:

$$\Delta\epsilon = \theta / 32970 \times l \times c$$

essent

θ = el·lipticitat

l = amplada de la cubeta

c = concentració de la mostra (M)

Cada tipus de cromòfor té unes energies d'absorció diferents que es correlacionen amb les seves característiques, raó per la qual presenten alteracions dels plans de llum polaritzada a longituds d'ona diferents. Això permet assignar cada participació en l'espectre de DC a un tipus concret d'entorn de coordinació. Per exemple, el senyal de coordinació tetraèdrica dels grups tiol de la Cys amb el Zn(II) i el Cd(II) es situa, respectivament, a 240 nm i a 250 nm. Per al Cu(I), en canvi, s'obtenen diversos senyals situats al voltant de 260 nm i entre 300 i 380 nm, de més difícil assignació. En general, el desplaçament de longitud d'ona dels senyals cap a l'ultraviolat s'associa a un pas de coordinació de geometria tetraèdrica a una geometria trigonal o digonal.

La participació de lligands exògens en els agregats pot tenir també efectes en el DC. En el cas de lligands del tipus sulfur, en agregats que contenen Zn(II) s'observen bandes entre 240 i 260 nm, mentre en

agregats que contenen Cd(II) s'observen bandes entre 270 i 280 nm.

Les absorcions al voltant de 230 i 235 nm es solen associar a la participació de ions clorur (Cl⁻) en agregats metàl·lics.

El CD aporta informació sobre el grau d'estructuració

L'efecte de transferència de quiralitat de la proteïna al centre metàl·lic pot generar dos tipus de bandes en l'espectre de CD: 1) *Gaussiana*: aquesta senyal es manifesta en forma d'un màxim o un mínim en forma de gaussiana, que té el seu centre situat a la longitud d'ona que es correspon amb el màxim d'absorció del cromòfor. 2) *Exciton coupling*: En agregats molt estructurats, el cromòfor genera dues gaussianes de signe contrari i màxims propers, de manera que al DC s'observa una corba en forma de derivada (en una forma com la funció sinus) centrada al màxim d'absorció del cromòfor en UV-vis. El tipus de participació de cada cromòfor configura l'empremta espectroscòpica de l'agregat. Quan al llarg d'una valoració, el tipus de participació i la forma general de la banda d'absorció no canvia, sinó que només es desplaça de longitud d'ona, es considera que l'estructura dels centres quiralment actius es manté anàloga, i que l'agregat pateix només la substitució del metall inicialment coordinat. En canvi, la variació del tipus de banda indica un canvi d'estructura del centre quiralment actiu.

La intensitat de l'absorció de CD es relaciona directament amb l'estructuració de l'agregat, ja que un agregat poc estructurat presenta una menor quiralitat. Com major és la intensitat de les bandes d'absorció de CD, major és la quiralitat de l'agregat, i, per tant, major és la seva estructuració. En general, per l'acoblament que implica, l'aparició de l'*exciton coupling* es considera símptoma d'un alt grau d'estructuració. El valor zero en el DC indica la no transferència de quiralitat de la proteïna als centres metàl·lics, i conseqüentment, suggereix l'obertura de l'agregat, o el que és el mateix, la seva desestructuració. Tot i això, cal tenir en

compte que poden existir estructures silents al CD, en el cas de que coexisteixin en l'espectre dos senyals que s'anul·lin recíprocament.

UV-vis i DC, dues tècniques complementàries

Mentre l'espectroscòpia UV-vis permet detectar i quantificar la incorporació de nous metalls en un agregat, l'espectroscòpia CD detecta petites variacions en la quiralitat de l'entorn de coordinació dels seus metalls. Per això, l'UV-vis sol molt útil per a tenir informació sobre l'entrada i la sortida de metalls dels agregats, i el CD per avaluar els seus efectes sobre l'estructuració de l'agregat. Les dues tècniques en conjunt permeten estudiar i descriure la participació dels metalls en la formació dels agregats i el seu grau d'estructuració.

Les mesures de CD i UV-vis han estat dutes a terme, respectivament, en un espectropolarímetre Jasco-715 i un espectròmetre UV-vis HP-8453. Aquests aparells són ubicats a les instal·lacions dels Serveis Científic-Tècnics de la Universitat de Barcelona i dels Serveis d'Espectroscòpia de la Universitat Autònoma de Barcelona.

4- L'ESPECTROMETRIA DE MASSES (ESI-MS, TOF-ESI-MS)

L'espectrometria de masses permet determinar la massa molecular dels agregats, i, coneixent-ne la composició i estequiometries mitjançant per altres tècniques i donada la puresa de la mostra, establir quines espècies metall-MT la conformen.

L'espectrometria de masses permet calcular la massa d'una molècula mitjançant la ionització de la mostra

L'espectrometria de masses es basa en la ionització de la mostra i la detecció de la massa molecular de les espècies químiques que conté, que, un cop ionitzades són propulsades diferencialment en funció de la seva massa a través d'un analitzador. La ionització per electroesprai (ESI) s'aconsegueix mitjançant la diferència de potencial entre un capil·lar d'entrada de la

mostra i un contraelectrode, de manera que la mostra carregada elèctricament es vaporitza en forma de gotes microscòpiques. Mitjançant un flux de d'un gas inert, la mostra és introduïda a l'analitzador. En ser l'ESI una ionització feble, les mol·lècules de la mostra no pateixen trencaments i es minimitza la formació d'adductes amb el solvent, per la qual cosa és una tècnica de ionització idònia per a l'anàlisi d'agregats metall-MT. Aquest tipus de ionització produeix ions de càrrega múltiple, és a dir, per a cada massa molecular es generen diversos ions moleculars amb la massa original i un nombre diferent de càrregues. Una vegada ionitzades, les molècules passen a l'analitzador. Depenent del tipus d'analitzador, s'usen camps elèctrics, magnètics o radiofreqüència per a separar les diferents espècies en funció de la seva massa i la seva càrrega. En aquesta tesi s'han usat analitzadors del tipus quadrupol (mitjançant camps elèctrics) i TOF (de temps de vol). Els resultats de l'anàlisi es detecten amb un detector, en el nostre cas amb rangs de lectura situats entre 750 i 2200 Da, depenent del cas. La mostra és injectada manualment, i transportada per una fase mòbil desoxigenada d'acetat d'amoni o format d'amoni depenent del tipus d'agregat que ens permet de fixar el pH. Aquesta tècnica té l'avantatge de requerir una quantitat de mostra molt petita per fer l'anàlisi. Les mesures d'espectrometria de masses d'aquesta tesi s'han dut a terme dos aparells, un Fisons Platform II Instrument, (amb analitzador quadrupol), i un Q-TOF Ultima Micromass Instrument (amb analitzador de temps de vol), ambdós ubicats a les instal·lacions dels Serveis Científic-Tècnics de la Universitat de Barcelona.

L'espectre de masses és una representació de diferents càrregues d'una mateixa massa

Com s'ha esmentat, la ionització de la mostra genera diversos agregats, cadascun d'ells amb diverses càrregues positives. L'analitzador discrimina els agregats en

funció de la seva massa i la seva càrrega, de manera que origina per a cada massa pics que corresponen a valors $(M+Z)/Z$, essent "Z" el nombre de càrregues que ha incorporat l'agregat i "M" la massa de l'agregat. Donat que cada agregat pot incorporar diverses càrregues ($Z=1,2,3\dots$), per a cada espècie molecular s'obtingran diversos pics. Aquests pics provenen tots d'una mateixa massa, i es representen automàticament en un gràfic en què a l'eix d'abscisses es presenten els valors $(M+Z)/Z$ i a l'eix d'ordenades la intensitat de cada pic. Els pics obtinguts (ordenats de major a menor, $p_1, p_2, p_3, p_4, p_5\dots$) es correspondran als successius estats de càrrega d'una mateixa massa, i per tant, el valor de M es pot establir solucionant el següent sistema d'equacions:

$$\begin{cases} p_1 = M + Z / Z \\ p_2 = M + (Z+1) / (Z+1) \\ p_3 = M + (Z+2) / (Z+2) \\ p_4 = M + (Z+3) / (Z+3) \\ p_5 = M + (Z+4) / (Z+4) \end{cases}$$

Donat que la càrrega actua de quocient, i que els pics es corresponen a càrregues successives, el pic de valor més gran serà el que tindrà una càrrega menor, i el pic de valor immediatament inferior té una unitat de càrrega més que l'anterior, i així successivament.

Un cop resolt el sistema, s'obté el valor de M, la massa de l'agregat. Cal tenir en compte, però, que en una mostra, hi poden haver diversos agregats de diferent composició (múltiples espècies) i, per tant masses diferents, cadascun d'ells originant el pics corresponents a les diverses càrregues.

La massa de l'agregat permet establir la seva estequiometria

L'espectrometria de masses permet calcular el valor de la massa total de l'agregat (M) amb exactitud. Restant a aquesta massa la massa de la MT que estem estudiant, s'obté "m", el valor que aporten a la massa total els metalls units a la proteïna. La divisió d'aquesta massa "m" per la massa atòmica

del metall que té unit ens permet establir amb exactitud quants ions metàl·lics hi ha units a la proteïna, és a dir, la seva estequiometria metall-MT. Quan una espècie conté diversos metalls, cal repartir la massa "m" entre els diferents tipus de metalls. Per a poder atribuir aquesta massa a uns metalls o altres, ens hem de recolzar en les dades que obtenim de les tècniques de ICP-AES i GC-FPD, que quantifiquen, respectivament, el contingut de metalls i sulfurs. La suma de les masses dels àtoms units a la proteïna ha de donar el valor exacte de "m". Tot i que la tècnica permet distingir perfectament els àtoms de Zn dels de Cd (ja que tenen una massa atòmica molt diferent), donada la semblança entre les masses atòmiques del Zn i el Cu (65,38 i 63,55 Da, respectivament), en un agregat que contingui Zn i Cu la tècnica no permet distingir en quina proporció relativa es troben. Per aquesta raó, en aquests agregats, la proporció entre Zn i Cu es calcula en referència a l'obtinguda per ICP, i l'espècie calculada per masses s'escriu com a " M_n -MT", essent "M" metall i "n" el nombre total d'àtoms. Una dificultat similar s'observa en intentar distingir la massa dels ions de Zn i Cu de la massa de dos ions de sulfur ($2 \times 32,07 \text{ Da} = 64,14 \text{ Da}$).

Els dímers són detectables per espectrometria de masses, ja que la massa de la MT es considera el doble de la del monòmer. Les formes dimèriques que contenen un nombre imparell de ions metàl·lics o que estan carregades per un nombre imparell de càrregues són identificables en un espectre de masses, ja que generen pics característics, absents en mostres que contenen exclusivament agregats monomèrics. La detecció de formes dimèriques de complexos metall-MT per espectrometria de masses és recent en la bibliografia (Hathout *et al.*, 2002).

Per a tots aquests càlculs és necessària una correcció relativa al nombre de protons que formen part de l'agregat. Tal com proposen altres autors (Fabris *et al.*, 1996), per a cada ió divalent (Zn(II) o Cd(II)) que forma part de l'agregat cal restar la massa de 2 protons al pes molecular del complex, i per cada ió

monovalent (Cu(I)) cal restar-n'hi un. Un correcció similar és necessària en el cas dels ions sulfur, en què cal sumar dos protons per ió sulfur incorporat a l'agregat.

En una mostra amb diverses espècies, la intensitat dels pics serveix com a mesura semiquantitativa de la seva abundància a la mostra

En els espectres de masses, es poden observar diferències d'intensitat entre els pics corresponents a diferents masses moleculars, proporcionals a la presència de l'espècie química que els genera en la mostra analitzada, de manera que aquestes intensitats es poden prendre com a referència de la proporció relativa de cada agregat a la mostra original. En tot cas, aquesta proporció es veu afectada per altres criteris, ja que cada agregat pot presentar una facilitat diferent per carregar-se – depenent, entre d'altres coses, del seu grau d'estructuració-, i per tant, una facilitat diferent d'aparèixer en el nostre rang de lectura. És per això que pel que fa a la proporció quantitativa de les diferents espècies en una mostra, es distingeix simplement entre espècies majoritàries i espècies minoritàries, ordenant-les de més abundants a menys.

5- DETERMINACIÓ DEL CONTINGUT EN SULFURS DE LES MOSTRES METALL-MT

Els procediments que s'expliquen en aquesta secció s'han desenvolupat al llarg d'aquesta tesi per a la caracterització de les MT, i han estat posats a punt conjuntament en col·laboració entre Ayelén Pagani, Laura Tío i l'autor d'aquesta tesi en el mateix grup de recerca. Malgrat que es presenten de manera sucinta en el capítol 4, s'ha considerat adequat fer-ne aquí una explicació metodològica més profunda.

La diferència entre ICP i ICPàcid, una aproximació qualitativa

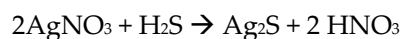
Com s'ha dit en comentar anteriorment la tècnica de ICP-AES, l'acidificació de les mostres metall-MT provoca l'eliminació dels ions sulfur que pugui contenir la

mostra en forma de H₂S gasós. Així, el desfàs que s'aprecia entre l'ICP_{àcid} i l'ICP convencional d'una mostra reflectirà la presència de sulfurs, però no pot servir per a quantificar-los. Això es deu al fet que en la tècnica d'ICP, el pas dels àtoms de fase vaporitzada a fase plasma pot veure's condicionat per l'estat químic de l'element, de manera que el pas de fase vaporitzada a fase plasma pot ser molt més eficient per als ions sulfur (S²⁻) que per al sofre de les mostres patró. Això fa que aquestes no puguin ésser usades com a referència per a calcular el contingut total de S (sulfur+Cystiol+Met) de mostres que continguin ions sulfur, ja que això donaria resultats per sobre del contingut real.

Per aquesta raó, el contingut de sulfur en solució no es pot mesurar com la resta del contingut de S mesurat per ICP convencional menys el contingut de S mesurat per ICP_{àcid}, i el desfàs entre ICPs s'ha de considerar exclusivament una mesura qualitativa de la presència de sulfurs.

La tinció amb nitrat de plata, una mesura semi-quantitativa

En aquest mètode, les mostres que contenen agregats metall-MT en què es vol avaluar la presència de sulfur es sotmeten a una acidificació forta (50% HCl) i són immediatament cobertes amb paper de filtre amarat d'una solució de nitrat de plata (AgNO₃) i escalfats a 65 °C. Com a resultat de l'acidificació, els sulfurs (S²⁻) de la mostra esdevenen H₂S, un àcid volàtil. En passar a la fase gasosa, el H₂S entra en contacte amb el nitrat de plata del paper de filtre provocant la precipitació de sulfur de plata d'acord amb la següent reacció:



El sulfur de plata resultant tenyeix el paper de filtre, cosa que permet detectar-lo a simple vista. La concentració aproximada de sulfurs a la mostra es pot estimar mitjançant la preparació de solucions patró de Na₂S a concentracions creixents, amb què es segueix un procés anàleg al descrit

per a les mostres. El grau de coloració fosca del paper de filtre permet estimar el contingut en S^{2-} de la mostra de la solució de MT.

Cromatografia de gasos acoblada a detector fotomètric de flama (GC-FPD)

El detector fotomètric de flama detecta compostos que continguin S, i en permet la seva quantificació, en funció d'una recta patró calibrada en el mateix aparell i mitjançant el mateix procediment. El seu acoblament amb un cromatògraf de gasos permet la separació i identificació de compostos volàtils de sofre, cadascun amb el seu temps de retenció.

L'addició d'altres concentracions d'àcid a una mostra líquida que conté ions sulfur fa que aquests es combinin amb els protons i formin àcid sulfhídric (H_2S), altament volàtil. Per tant, si aquest procés es fa en un vial hermètic que després s'escalfa, el gas sulfhídric generat es manté en l'espai gasós del vial (*head-space*). L'anàlisi del *head-space* per cromatografia de gasos permet la detecció de S per FPD, i la seva quantificació a través de l'extrapolació dels valors aconseguit per patrons de Na_2S preparats a concentracions creixents i analitzats per la mateixa tècnica.

Les mesures de GC-FPD d'aquesta tesi s'han dut a terme en un cromatògraf de gasos HP 5890 Series II acoblat a un detector FPD80 CE Instruments ubicat a les instal·lacions dels Serveis Científic-Tècnics de la Universitat de Barcelona.

La valoració amb iodur de potassi

El sulfur de sodi usat com a patró per a les mesures ($Na_2S \cdot 9H_2O$) és altament higroscòpic i oxidable en estat sòlid, i pot donar lloc a la formació de poli-sulfurs. Tant la hidratació com la oxidació provoquen una alteració dels patrons. Per tal de conèixer la quantitat exacta de sulfur que conté la mostra-patró a usar per les mesures de GC-FPD s'ha preparat una mostra-patró mare la concentració de sulfur de la qual ha estat determinada per valoració amb iodat de potassi. Aquesta és una valoració colorimètrica, on la mostra

acidificada es barreja amb una petita quantitat de iodur de potassi (KI) i midó. El midó té la propietat que en contacte amb I_2 dóna lloc a una coloració blau-violeta.

L'addició paulatina de quantitats conegudes de KIO_3 a aquesta mescla, resultarà en la formació de I_2 , que reacciona amb els ions sulfur, convertint-los en sofre elemental i esdevenint de nou I^- (Fig. 27) Un cop tot el sulfur ha esdevingut sofre elemental, el I_2 format ja no pot revertir a I^- i interacciona amb el midó, originant un color blau-violat apreciable a simple vista.

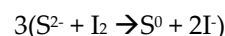
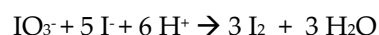


Fig. 27-Reaccions de formació i consum de I_2 en el protocol de la valoració amb iodur de potassi.

La quantitat de KIO_3 que hagi fet falta afegir a la mostra per forçar el canvi d'incolore a color blau indica la quantitat de sulfur que contenia la mostra inicialment. Aquest protocol és un dels pocs que permeten conèixer de manera exacta la concentració de sulfur en una mostra patró i en el nostre laboratori ha estat estandarditzat per Ayelén Pagani.

6- ESPECTROSCÒPIES

VIBRACIONALS: RAMAN I IR

Les espectroscòpies Raman i IR són espectroscòpies vibracionals

Les espectroscòpies vibracionals es basen en la interacció entre la radiació i la matèria, de manera que s'obtenen espectres vibracionals amb bandes discretes, amb freqüències i intensitats dependents de la massa dels àtoms, la geometria molecular i la força de l'unió entre àtoms. L'efecte Raman és un efecte inelàstic en què els fotons d'un làser monocromàtic incideixen sobre la mostra, transferint-li *quanta* d'energia. Aquests *quanta* són absorbits i emesos per les molècules que formen la mostra en forma de diferents d'energies vibracionals, configurant un espectre Raman.

L'espectroscòpia Raman permet estudiar l'estructura i els tipus d'enllaços d'una molècula

L'esquelet d'un pèptid, format per enllaços peptídics $-\text{CO}-\text{NH}-$ té associats diversos modes de vibració coneguts com a bandes Amida I, II, III, IV, V, VI, VII, A i B. Les bandes Amida I i III són visibles fàcilment per espectroscòpia Raman, i les seves freqüències estan relacionades amb l'estructura i la conformació de la proteïna. Les bandes de l'Amida I i III es situen en els rangs de longituds d'ona de 1680 i 1640 nm, i 1300 i 1220 nm, respectivament.

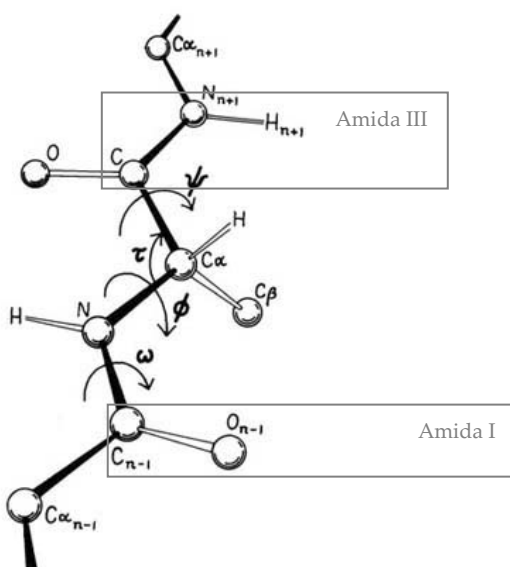


Fig. 28-Les vibracions principals associades a l'Amida I i l'Amida III són, respectivament, provinents de l'enllaç $\text{C}=\text{O}$ i l'enllaç $\text{C}-\text{N}$ de la cadena peptídica.

Els diferents angles que adoptin els enllaços de la cadena polipeptídica (ψ , ζ , ϕ , ω) estan relacionats amb diverses estructures secundàries, i es corresponen amb diferents ponts del $\text{C}=\text{O}$ amb l'hidrogen d'un altre aminoàcid. Aquests diferents ponts provoquen un desplaçament de les freqüències dels modes vibracionals de l'Amida I i III, modes que estan estandarditzats i permeten identificar les estructures secundàries presents a la mostra (α -helix, β -sheet, β -turn, Random Coil,...) (Fig. 28). A longituds d'ones més baixes, apareixen altres bandes que s'associen al pont disulfur, a l'enllaç tiolat-metall, al tiol lliure, a l'enllaç sulfur-metall, i a diferents estats dels aminoàcids aromàtics, els grups

carboxil i la histidina. L'estudi dels espectres obtinguts per Raman es veu complementat per el dels espectres d'IR. Mitjançant l'IR, s'obté una bona detecció de les bandes Amida I i II, que també tenen assignades per aquesta tècnica diferents longituds d'ona i intensitats relatives associades a l'estructura secundària.

Els anàlisis d'espectroscòpia Raman presentats en aquesta tesi s'han dut a terme en un espectròmetre Bruker IFS 66, amb un mòdul Raman FRA-106. Els anàlisis d'espectroscòpia IR s'han dut a terme en un espectrofotòmetre Nicolet 5700 FTIR. Ambdós aparells estan ubicats als laboratoris del Departament de Bioquímica "Giovanni Moruzzi" de la Universitat de Bologna, Itàlia.

