

LAS METALOTIONEÍNAS: ¿CESTOS DE BASURA O PROTEÍNAS CLAVE EN EL METABOLISMO CELULAR?

Eduardo Brambila C

Enrique González V

Escuela de Ciencias Químicas, Centro de Química del Instituto de Ciencias
Universidad Autónoma de Puebla

En los sistemas biológicos los metales se encuentran en numerosas enzimas y proteínas, así como en otros biopolímeros y moléculas con funciones de regulación o control metabólico.

La unión de los metales a las proteínas varía ampliamente y produce estructuras con especificidad química y biológica. En la actualidad se ha desarrollado mucho el estudio de proteínas y polipéptidos que contienen grupos de iones metálicos; llaman especialmente la atención los agrupamientos de estos elementos en las proteínas denominadas metalotioneínas.

Las metalotioneínas fueron descubiertas en el año de 1957 cuando Margoshes y Vallee las identificaron como proteínas fijadoras de cadmio en la corteza renal de los equinos. Al parecer la presencia de estas proteínas se relacionaba con la acumulación de cadmio en este tejido. Actualmente se reconoce a las metalotioneínas como los únicos compuestos biológicos que "naturalmente" pueden contener este metal.

Además del cadmio, otros bioelementos como el zinc y cobre son susceptibles de ser fijados por las metalotioneínas.

Es importante señalar que mientras el esfuerzo para entender la función del zinc en los mecanismos enzimáticos ha sido un tema bioquímico de gran importancia, desde los años sesenta, el estudio de las metalotioneínas no ha sido desarrollado al mismo nivel, de tal

forma que su función precisa permanece desconocida.

Definición y ocurrencia

Las metalotioneínas han recibido esta designación con base en su alto contenido de metales y grupos sulfhidrilo provenientes de cadenas laterales de cisteína; estos últimos contribuyen con aproximadamente el 20% del peso total de la molécula. Las metaloproteínas se presentan en el reino animal, así como en plantas superiores, microorganismos eucarióticos y algunos procariotes. En los mamíferos, las metalotioneínas se encuentran en mayor proporción en hígado, riñón, páncreas e intestinos. Su concentración en los seres vivos varía ampliamente, dependiendo del organismo, tejido, edad, estado de desarrollo, régimen dietético, historia de exposición al metal, así como otros factores aún no completamente identificados.

Las metalotioneínas aisladas y caracterizadas a partir de tejido hepático humano obtenido de autopsias, contienen casi exclusivamente zinc, mientras que las metalotioneínas aisladas de riñón contienen niveles sustanciales de cadmio y cobre. Estas diferencias probablemente reflejan la exposición natural a metales pesados, así como la expresión de diferentes formas moleculares denominadas isoformas o isometalotioneínas. No obstante que las metalotioneínas se localizan básicamente en

el citoplasma, se ha reportado también su presencia en los lisosomas y en el núcleo celular.

Clasificación y polimorfismo

Debido a la falta de una función enzimática conocida, las metalotioneínas se han clasificado en tres clases de acuerdo a sus características estructurales.

La clase I incluye a las metalotioneínas de mamífero y aquellos polipéptidos con las siguientes características:

- Alto contenido de metales pesados (4-12 átomos/mol), unidos exclusivamente a las proteínas por enlaces tiol y formando agrupamientos.
- Alto contenido de cisteínas (típicamente 23-33%) y ausencia de residuos aromáticos e hidrofóbicos.
- Bajo peso molecular (típicamente menor a 10 000 daltones).
- Homología estructural o funcional relacionada con las metalotioneínas de mamíferos.

La clase II comprende a las metalotioneínas que sólo tienen correspondencia muy distante con la estructura primaria de las formas de mamíferos; ejemplos de esta clase incluyen a las metalotioneínas aisladas de erizo de mar, maíz, levadura y ciertos procariotes.

Todas las metalotioneínas de las clases I y II se caracterizan por ser proteínas de cadena sencilla.

La clase III incluye polipéptidos conteniendo unidades repetidas glutamil-cisteinil. Son estructuras oligoméricas formadas por dos o más cadenas polipeptídicas de longitud variable.

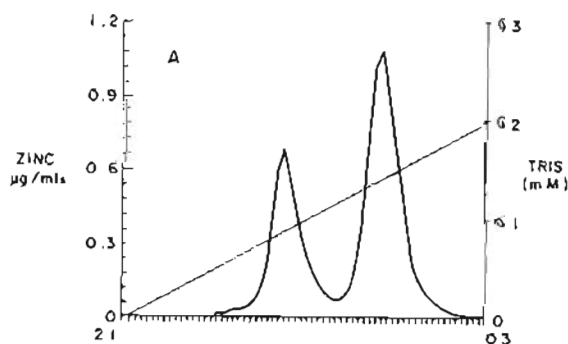
Las metalotioneínas de la clase I presentan un polimorfismo genético extremo; los tejidos de mamífero usualmente contienen dos subgrupos denominados metalotioneína I (Mt I) y metalotioneína II (Mt II), basados en sus propiedades cromatográficas de intercambio iónico (véase figura 1). A pH neutro, estas dos fracciones difieren en una sola carga negativa. En ungulados y primates las Mt I y Mt II pueden ser

a su vez separadas en varias isoformas mediante cromatografía líquida de alta presión. Las isoformas han sido designadas con letras minúsculas, por ejemplo Mt Ia, Mt Ib, etcétera. El polimorfismo más complejo se encuentra en el humano, en donde se expresan tantos como 10 genes de isometalotioneínas, algunos de ellos característicos de cada tejido en particular. Se ha descrito que las diferentes isoformas exhiben diferencias en sus afinidades de unión aun por el mismo metal.

En general, las metalotioneínas de mamíferos (clase I) son péptidos de 61 a 62 aminoácidos que contienen 20 cisteínas, 6 a 8 lisinas, 7 a 10 serinas y una metionina acetilada en la porción amino terminal. No contienen histidinas ni aminoácidos aromáticos; las metalotioneínas de pollo y erizo de mar contienen 63 y 64 aminoácidos respectivamente. Las metalotioneínas aisladas de invertebrados y algunos hongos presentan cadenas polipeptídicas más cortas que las descritas en mamíferos. Las metalotioneínas obtenidas de un hongo, *Neurospora crassa* contienen 25 aminoácidos.

La característica más sobresaliente de todas las metalotioneínas aisladas es la abundancia del aminoácido cisteína, el cual constituye hasta una tercera parte de la molécula. En las metalotioneínas de la clase I es particularmente

FIGURA 1



Separación de las isoformas de las metalotioneínas I y II de origen hepático mediante cromatografía de intercambio iónico.

notoria la correspondencia en el alineamiento de las cisteínas a lo largo de la cadena polipeptídica; en las proteínas aisladas de mamíferos las 20 cisteínas son invariantes (véase figura 2), además de la conservación en los aminoácidos lisina y arginina, los cuales se yuxtaponen a las cisteínas. Se ha sugerido que estos aminoácidos pueden jugar una función auxiliar en la formación de los complejos metal-apometalotioneína.

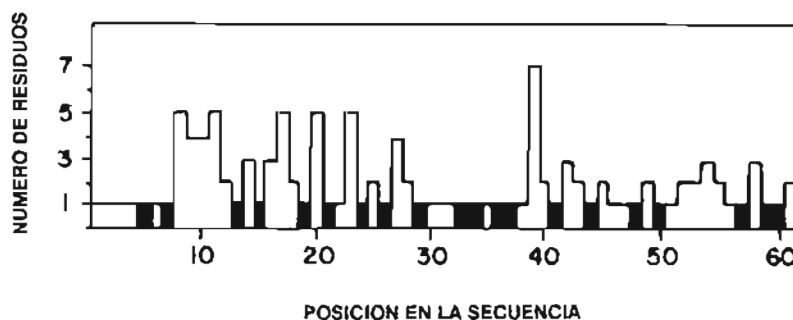
Sitios de unión a metales

En las metalotioneínas los metales están distribuidos en dos distintos agrupamientos polinucleares (véase figura 3). El agrupamiento "A" contiene 11 cisteínas capaces de ligar a 4 átomos de zinc y/o cadmio o de 5 a 6 átomos de cobre. Este agrupamiento está contenido dentro del dominio α carboxilo terminal de la molécula y comprende a los aminoácidos del 31 al 61. El agrupamiento "B" tiene 9 cisteínas, une a 3 átomos de zinc y/o cadmio, o 6 átomos de cobre. Los átomos metálicos están contenidos en el agrupamiento β amino terminal, extendiéndose desde los aminoácidos 1 al 30.

Todos los iones metálicos de las metalotioneínas se coordinan de manera tetrahédrica a cuatro ligantes tiol de las cadenas laterales de cisteínas. En el agrupamiento "A", dos de los átomos metálicos se unen a las cisteínas mediante 3 puentes y un sulfuro terminal y los otros dos por 2 puentes y 2 sulfuros terminales. En el agrupamiento "B", los iones metálicos se unen por 2 puentes y 2 sulfuros terminales.

La estructura de las metalotioneínas-cobre no ha sido resuelta, sin embargo es probable que sea bastante diferente a la producida por el zinc o

FIGURA 2



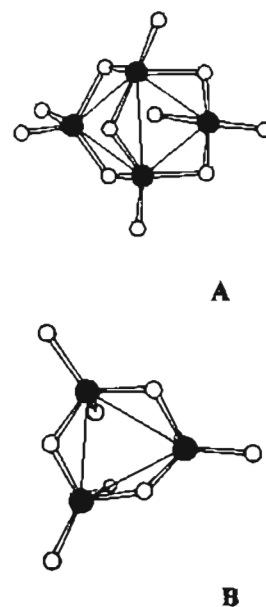
Variabilidad en la secuencia de aminoácidos. Se muestra el número de aminoácidos diferentes en las secuencias de 30 metalotioneínas aisladas de mamíferos. La posición de las cisteínas conservadas se indica mediante las barras oscuras.

cadmio. El cobre se une preferencialmente en el estado de oxidación +1 más que en el estado de oxidación +2 y la unión estequiométrica es de 11 a 12 átomos/mol comparado con los 7 átomos de cadmio o zinc. Lo anterior sugiere que en la estructura del complejo metalotioneína-cobre, este metal forma esferas de coordinación bipiramidales más que tetrahédricas, lo cual puede alterar la estructura terciaria de la proteína.

Inducción de la síntesis de metalotioneínas

Una de las características biológicas más sobresalientes de las metalotioneínas aisladas de mamíferos es la inducibilidad de su biosíntesis. La inoculación a animales con sales de cadmio, zinc o cobre causa una acumulación de metalotioneínas en hígado y/o riñón. La inducción de metalotioneínas por metales pesados fue descubierta por Piscator en el año de 1964; este investigador encontró niveles elevados de metalotioneínas en el hígado de conejos expuestos a cadmio. La concentración óptima del metal para iniciar el proceso de inducción varía en los diferentes sistemas biológicos, pero ge-

FIGURA 3



Agrupamientos metálicos en las metalotioneínas de la clase I. Círculos oscuros: átomos metálicos. Círculos claros: cisteínas.

neralmente se presenta justo abajo del nivel que causa la toxicidad celular. Durnam y Palmiter han mostrado que el proceso de inducción es debido a una activación transcripcional (véase nota 1) de los genes de las metalotioneínas por iones metálicos pesados.

En el genoma de los mamíferos (véase figura 4) existen regiones de control a las cuales se unen factores de transcripción que intervienen en la expresión genética de las proteínas que regulan el metabolismo de metales pesados. La unión de estos factores al genoma señala el sitio y momento en que las RNA polimerasas deben iniciar el proceso de transcripción para las metalotioneínas.

Además de los metales pesados, una variedad de factores fisiológicos y experimentales inducen la síntesis de las metalotioneínas (véase tabla 1). El denominador común de estos factores es el incremento de hormonas glucocorticoides (véase figura 4). Empleando células HeLa crecidas en un medio libre de suero, el grupo del Dr. Hershman demostró que los glucocorticoides in-

ducen la biosíntesis de las metalotioneínas por mecanismos independientes a la inducción debida a los metales pesados. El proceso de inducción ocurre a nivel de la iniciación de la transcripción. El modelo de acción parece iniciarse con la unión de la hormona a su receptor, el cual a su vez estimula la transcripción de las metalotioneínas por interacción directa con las secuencias de control contenidas en el DNA nuclear.

En general, el proceso de inducción parece involucrar los siguientes pasos:

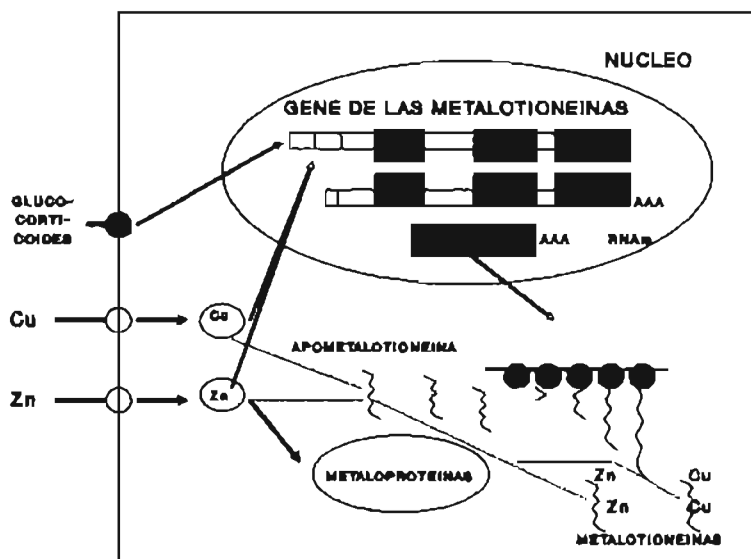
1. La célula blanco es expuesta a metales o glucocorticoides.
2. Síntesis de RNAm de la apometalotioneína que llega a un estado estacionario a las 4 horas.
3. La síntesis de las metalotioneínas es estimulada, detectándose incrementos entre las 2 y 4 horas.
4. Los niveles máximos de metalotioneínas se acumulan entre las 18 y 24 horas.
5. Si se eliminan los inductores, los niveles de metalotioneína disminuyen con una vida media de 12 a 22 horas (mayor si el inductor es el cadmio).
6. Los niveles basales de metalotioneínas regresan a niveles basales en 48 a 72 horas.

La habilidad para inducir la síntesis de metalotioneínas es mucho mayor para metales (incrementos de 20 a 50 veces) que para glucocorticoides (incrementos de 2 a 4 veces).

Funciones de las metalotioneínas

Aún después de tres décadas del descubrimiento de las metalotioneínas, el significado funcional de estas proteínas permanece como un tópico de discusión. Inicialmente se propuso que, dadas las características biológicas de su inducibilidad por metales pesados, estas proteínas podían constituir un sistema "especial" de detoxificación de los organismos; sin embargo, parece improbable que ésta sea su única fun-

FIGURA 4



Secuencias de control transcripcionales en los genes de la metalotioneína IIa humana. Los primeros dos rectángulos representan las secuencias de control para metales y glucocorticoides.

TABLA 1 Factores que inducen la síntesis de metalotioneínas	
Fisiológicos	Experimentales
Desarrollo Zinc de la dieta Infección Inanición Estrés	Cadmio Tetracloruro de carbono Cobre Diabetes Glucocorticoides Zinc

ción, ya que:

- Los iones metálicos no están presentes a niveles elevados en la mayoría de los biotipos, por lo que éstos probablemente no ejercen una presión de selección significativa para explicar la existencia de un sistema especial de detoxificación.

- Si la función de las metalotioneínas fuera puramente protectora, uno esperaría encontrar a estas proteínas sólo después de la exposición a metales tóxicos. En cambio se encuentra que tienen un nivel basal de expresión bastante alto.

Aunado a lo anterior y debido a que el nivel de zinc y metalotioneínas está altamente influido por la dieta, además del hecho de que las metalotioneínas son inducidas en su síntesis por el zinc de la dieta, se ha pensado que estas proteínas juegan un papel de suma importancia en aquellos procesos celulares relacionados con la presencia de iones metálicos.

Los iones metálicos observados “naturalmente” en las metalotioneínas tienen diferentes funciones biológicas. El cadmio es altamente tóxico y no esencial. El cobre, aunque bastante tóxico, es requerido por los sistemas biológicos como cofactor para la actividad de varias enzimas. El zinc es relativamente no tóxico y esencial para un gran número de enzimas relacionadas con múltiples procesos bioquímicos de las células.

Las metalotioneínas se unen a cada uno de los iones con afinidades diferentes: la constante de estabilidad del

complejo metalotioneína-cobre es aproximadamente cien veces mayor que la del complejo formado con el cadmio y esta proteína; a su vez, la constante de estabilidad de la metalotioneína con el cadmio es mil veces mayor que la del complejo formado con el zinc. Con base en lo anterior, se ha postulado que las metalotioneínas juegan al menos tres funciones distintas, cada una de éstas relacionada con el metal que contienen.

Cadmio

El cadmio es un componente natural de los minerales de la tierra, por lo que es inevitable que sea absorbido por los organismos vivos. Se ha postulado que la función principal de las metalotioneínas en relación al cadmio, es la de proteger a las células contra la toxicidad de este metal. La alta afinidad de las metalotioneínas por el cadmio y su larga vida media las hacen adecuadas para esta función de detoxificación.

Además del cadmio, las metalotioneínas se han implicado en el secuestro de metales no esenciales como Hg, Pb, Bi, Ag, Au y Pt. La inducción o captación de los metales por las metalotioneínas se ha relacionado, al igual que para cadmio, con la protección de los tejidos de animales preinoculados con estos metales.

Cobre

En los sistemas biológicos el cobre es más abundante que el cadmio, además de que el primero tiene funciones esenciales en los organismos al actuar como cofactor de algunas enzimas involucradas en reacciones de óxidoreducción. El cobre en su forma iónica es un elemento tóxico potente. Se ha propuesto que la función de las metalotioneínas en relación al cobre, es la de mantener concentraciones intracelulares bajas del metal en su forma iónica y al mismo tiempo permitir la activación de enzi-

mas-cobre. Sin embargo, parece ser que las metalotioneínas sólo juegan una función menor en el metabolismo del cobre ya que, bajo condiciones normales, la unión del cobre a las metalotioneínas es demasiado fuerte para permitir una fácil transferencia del metal a las enzimas. Probablemente otros ligantes o proteínas aún sin identificar, son los responsables de la acumulación y el transporte del cobre. Bajo condiciones de alta exposición a cobre, las metalotioneínas inducidas pueden también funcionar como un sistema efectivo de detoxificación.

Zinc

El zinc es un elemento ampliamente distribuido en los sistemas biológicos; es considerablemente menos reactivo y tóxico que el cobre y el cadmio. Las enzimas dependientes de zinc catalizan un rango mucho más amplio de reacciones que las enzimas dependientes de cobre. Algunas se encuentran involucradas en los procesos de transferencia de la información genética. Se ha pensado que las metalotioneínas pueden modular de alguna manera estos procesos. Al parecer las metalotioneínas sintetizadas por el hígado funcionarían como una fuente lábil de zinc, el cual puede ser subsecuentemente utilizado por otros órganos para la activación de enzimas esenciales en el metabolismo. Las metalotioneínas pueden

actuar de manera directa con apoenzimas inactivas o indirecta por regulación del zinc disponible en el interior celular. Las bajas constantes de estabilidad del complejo metalotioneína-zinc hacen a las metalotioneínas adecuadas para este propósito.

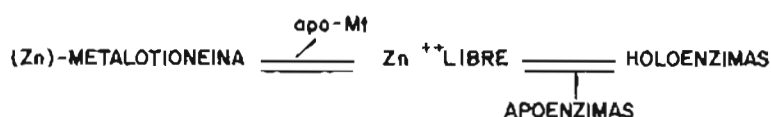
Lo anterior se ha demostrado en parte por el hecho de que las metalotioneínas-zinc pueden transferir al metal a diferentes apoenzimas *in vitro* bajo condiciones de pH y fuerza iónica similares al medio celular. Las apoenzimas aldolasa y termolisina de levadura, así como la fosfatasa alcalina de *Escherichia coli* y anhidrasa carbónica de eritrocitos de bovino, son reactivadas por la metalotioneína-zinc de hígado de rata, siendo esta reactivación tan buena o mejor que la obtenida usando sales de zinc. Los mecanismos posibles de transferencia de zinc desde las moléculas de las metalotioneínas a las apoenzimas se esquematiza en la figura 5.

En vista de los conocidos efectos del zinc sobre la embriogénesis, de su participación como cofactor en un número de DNA y RNA polimerasas, y su papel como modulador estructural en los llamados dedos de zinc (véase nota 2 y figura 6), se tiene la hipótesis de que las metalotioneínas-zinc tienen funciones importantes en el control de la información genética.

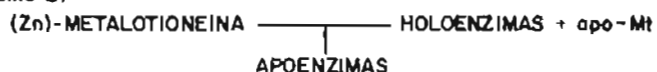
Las metalotioneínas pueden constituir, entonces, un sistema regulador homeostático para el ion zinc. Diferentes isoformas (con diferentes afinidades por el metal) pueden transportar al zinc a los compartimientos intracelulares o interactuar con diversas clases de enzimas o proteínas. Las hormonas pueden controlar la expresión de los genes de las metalotioneínas y así modular estados metabólicos celulares cambiando la distribución y disponibilidad del zinc.

FIGURA 5

MECANISMO 1.



MECANISMO 2.



Mecanismos probables de transferencia de zinc desde las metalotioneínas-zinc a apoenzimas dependientes de zinc.

El conocimiento actual de las metalotioneínas se debe principalmente a la confluencia de conocimientos provenientes de tres áreas. Los fisiólogos y toxicólogos se han interesado por su función en el metabolismo, así como por su papel detoxificante. Los químicos de proteínas y espectroscopistas por sus características estructurales y, más recientemente, los biólogos moleculares se han interesado en su regulación genética y el uso de las secuencias de los promotores de las metalotioneínas para experimentos de ingeniería genética. No obstante el gran interés que han despertado recientemente las metalotioneínas, aún hace falta conocer una gran cantidad de aspectos bioquímicos relacionados con estas proteínas. Seguramente en un futuro cercano, los avances en su estu-

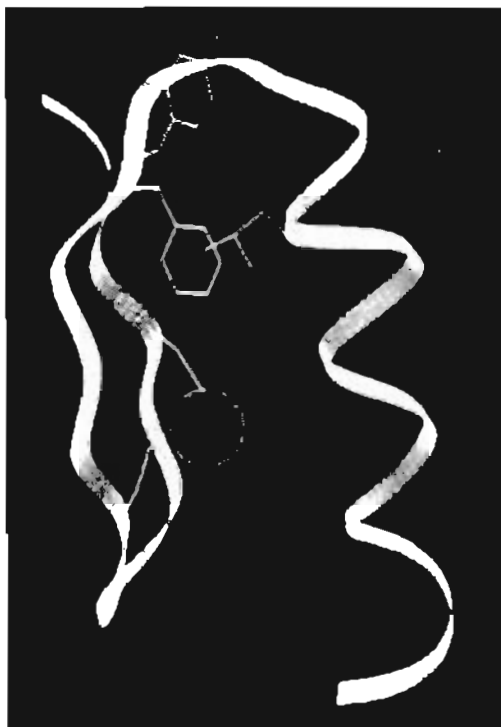
dio podrán enriquecer los conocimientos actuales de regulación genética y metabólica en los seres vivos.

Notas

¹ Proceso por el cual la enzima RNA polimerasa convierte secuencias de DNA a secuencias de RNA, las que posteriormente van a ser leídas para sintetizar proteínas.

² Factores de transcripción formados por secuencias de aminoácidos que en el espacio constituyen estructuras en forma de "asa" alrededor de un átomo central de zinc. El metal actúa favoreciendo el plegamiento de la proteína, lo que le permite interactuar con el DNA.

FIGURA 6



Modelo propuesto para la estructura de un dedo de zinc. La cinta representa el esqueleto carbonado de la cadena de aminoácidos. La unión del zinc (representado por la esfera) con cisteínas (a la izquierda) e histidinas (a la derecha) ocurre cerca de la base del dedo (tomado de Rhodes, D. y Klug, A., "Zinc fingers", *Scientific American*, Vol. 268, No. 2, 1993, pp. 56-65).

Lecturas Recomendadas

Cousins, R. J., "Absorption, Transport, and Hepatic Metabolism of Copper and Zinc: Special Reference to Metallothionein and Ceruloplasmin", *Physiological Reviews*, Vol. 65, 1985, pp. 369-372.

Hamer, D. H., "Metallothionein", *Annual Review of Biochemistry*, Vol. 55, 1985, pp. 913-951.

Kagi, J. H., and Shaffer, A., "Biochemistry of Metallothionein", *Perspectives in Biochemistry*, Vol. 1, 1991, pp. 46-52.

Karin, M., "Metallothioneins: Proteins in Search of Function", *Cell*, Vol. 41, 1985, pp. 9-10.

Klaassen, C. D., and Lehman-McKeeman, L. D., "Regulation of the Isoforms of Metallothionein", *Biological Trace Element Research*, Vol. 21, 1989, pp. 119-129.

Onosaka, S., and Tanaka, K., *Metallothionein in Biology and Medicine*. Editores: Klaassen, C. D., Suzuki, K. T. CRC Press, Inc., 1991.