

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
Departamento de Microbiología III



TESIS DOCTORAL

**Metalotioneínas de Tetrahymena: biodiversidad molecular,
adaptación a metales, cepas knockout y/o knockdown y
potencial utilización en biorremediación**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Patricia de Francisco Martínez

Director

Juan Carlos Gutiérrez Fernández

Madrid, 2018

Metalotioneínas de *Tetrahymena*: biodiversidad molecular, adaptación a metales, cepas *knockout* y/o *knockdown* y potencial utilización en biorremediación

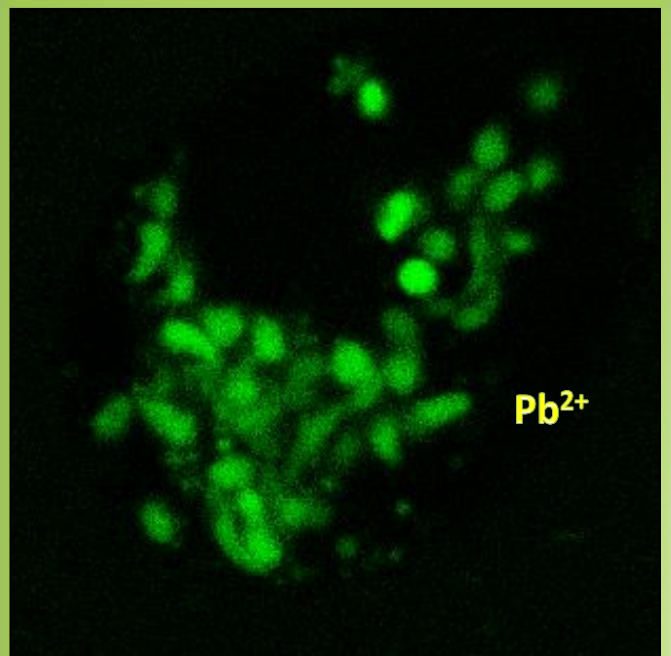
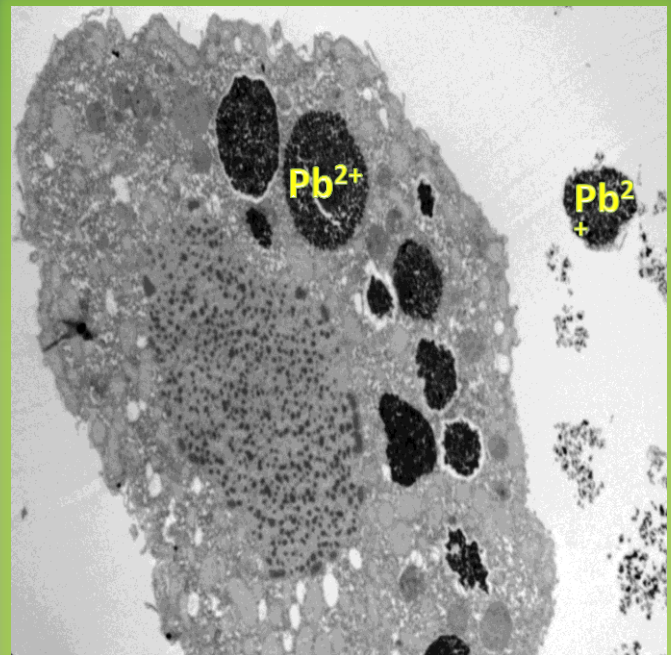


UNIVERSIDAD
COMPLUTENSE
MADRID

TESIS DOCTORAL

PATRICIA DE FRANCISCO MARTÍNEZ

Universidad Complutense de Madrid. Facultad de Biología. Dpto. Microbiología III.



Director de la tesis doctoral:
Dr. Juan Carlos Gutiérrez Fernández
Madrid, 2017

Universidad Complutense de Madrid

Facultad de Ciencias Biológicas

Departamento de Microbiología III



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE
MADRID

Metalotioneínas de *Tetrahymena*: biodiversidad molecular, adaptación a metales, cepas *knockout* y/o *knockdown* y potencial utilización en biorremediación

TESIS DOCTORAL

PATRICIA DE FRANCISCO MARTÍNEZ

Madrid, 2017

Universidad Complutense de Madrid

Facultad de Ciencias Biológicas

Departamento de Microbiología III



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE
MADRID

Metalotioneínas de *Tetrahymena*: biodiversidad molecular, adaptación a metales, cepas *knockout* y/o *knockdown* y potencial utilización en biorremediación

Memoria que para optar al grado de
Doctor en Ciencias Biológicas presenta
Doña Patricia de Francisco Martínez

V^oB^o del director

La Doctoranda

Dr. Juan Carlos Gutiérrez Fernández

Patricia de Francisco Martínez

Madrid, 2017

AGRADECIMIENTOS

A lo largo de toda esta tesis doctoral muchas personas me han mostrado su apoyo y su cariño y hoy quiero agradecerles de corazón todo lo que me han aportado durante estos años, ayudándome de una u otra forma a la realización de este trabajo.

En primer lugar me gustaría agradecer al Dr. Juan Carlos Gutiérrez, director de esta tesis doctoral, toda su dedicación y entrega, su ilusión por este proyecto de investigación y su ayuda durante toda la realización de este trabajo. También me gustaría agradecerle, junto a la Dra. Ana Martín, la oportunidad que ambos me han dado de formarme como investigadora y su apuesta firme por esta tesis incluso en los momentos más difíciles.

Gracias también a todos los miembros de Departamento de Microbiología III que, desde el primer día, me acogieron y se interesaron por la evolución de este trabajo. Gracias al personal de los CAIs por su amabilidad y disposición, por sus consejos e implicación.

Gracias al Dr. Aaron Turkewitz que tan amablemente me acogió en su grupo de investigación durante mi estancia en Chicago. Gracias a Daniela y Tina por sus consejos e implicación durante estos meses.

También hoy quiero dar las gracias de manera especial a mis siempre compañeros de laboratorio: Silvia, Dani y Lili, porque incluso desde la distancia podía sentirlos cerca, siempre dispuestos a echarme una mano y a escuchar mis problemas. Gracias por tantos buenos consejos. Gracias a Nacho y Alex, por vuestras constantes muestras de cariño, por transmitirme seguridad, por darme tantos ánimos. Gracias a todos vosotros por vuestra amistad, es algo que no tiene precio y que valoro enormemente de esta etapa de doctorado. Sin vosotros no hubiese sido igual.

Finalmente, quiero agradecer a mi familia todo su apoyo y confianza durante estos años, su ilusión por cada experimento aunque no comprendiesen bien en qué consistían, sus constantes ánimos para seguir adelante. Gracias a Fran, mi gran compañero en esta aventura de la vida, porque sé que estás a mi lado incondicionalmente, transmitiéndome tu alegría y tu cariño.

Este trabajo ha sido posible gracias a una beca predoctoral FPU (Formación de Profesorado Universitario) concedida por el Ministerio de Educación, Cultura y Deporte de España (Referencia: FPU12/02789).

INDICE

	Página
ABREVIATURAS	5
RESUMEN - SUMMARY	9
INTRODUCCIÓN	13
A.- LOS METALES COMO TÓXICOS AMBIENTALES: TOXICIDAD Y MECANISMOS DE RESISTENCIA	15
A.1. Definición de metal, metaloide y metal pesado.....	15
A.2. Importancia medioambiental de los metales.....	15
A.3. Mecanismos de toxicidad celular de los metales y metaloides	19
A.4. Mecanismos de resistencia frente a metales y metaloides	21
B.- LA SUPERFAMILIA DE LAS METALOTIONEÍNAS (MTs)	25
B.1. Características generales de las MTs y clasificación	25
B.2. Estructura de las MTs	27
B.3. Diversidad funcional de las MTs	29
B.3.1. Utilización de cepas <i>knockout/knockdown</i> para analizar la función de las MTs	30
B.4. Regulación de la expresión de los genes codificantes de MTs	31
B.4.1. Regulación a nivel transcripcional	31
B.4.1.1. La superfamilia de factores de transcripción bZIP: la familia AP-1	34
B.4.2. Regulación a nivel post-transcripcional.....	35
B.4.3. Regulación epigenética.....	36
B.5. Las MTs de ciliados: características generales, clasificación y peculiaridades estructurales	36
B.5.1. Las MTs de <i>Tetrahymena thermophila</i> : características generales, estudios de expresión y regulación génica	39
C.- ADAPTACIÓN DE LOS SERES VIVOS A LA PRESENCIA DE METALES	41
C.1. Adaptación vs aclimatación: comparación de conceptos.....	41
C.2. Organismos adaptados a la presencia de metales pesados: desarrollo de nuevas estrategias moleculares/celulares	42
C.3. Aplicaciones biotecnológicas de los organismos adaptados a la presencia de metales	46
C.3.1. Utilización de cepas adaptadas a metales en procesos de biorremediación	47
OBJETIVOS	49
MATERIAL Y MÉTODOS	53
1. MATERIAL BIOLÓGICO Y CONDICIONES DE CULTIVO	55
1.1. Especies del género <i>Tetrahymena</i>	55
1.2. Cepas de <i>Escherichia coli</i>	56
1.3. Condiciones de cultivo y mantenimiento	56
1.3.1. Mantenimiento y conservación de cepas de <i>Tetrahymena</i>	56
1.3.2. Mantenimiento y conservación de cepas de <i>E. coli</i>	58
2. ADAPTACIÓN DE CEPAS DE <i>T. thermophila</i> A ELEVADAS CONCENTRACIONES DE METAL	58
3. OBTENCIÓN DE CEPAS <i>KNOCKOUT</i> y/o <i>KNOCKDOWN</i> PARA LOS GENES <i>MTT1</i> y <i>MTT5</i>	58
3.1. Construcciones genéticas	58

3.2. Transformación biolística de <i>T. thermophila</i>	61
3.3. Segregación fenotípica y comprobación de la fijación completa de las cepas <i>knockout</i>	62
4. TRATAMIENTOS CON AGENTES ESTRESANTES	63
5. AISLAMIENTO DE ÁCIDOS NUCLEICOS	64
5.1. Aislamiento de ADN genómico	64
5.2. Aislamiento de ARN	65
5.3. Aislamiento de ADN plasmídico (<i>miniprep</i>)	66
5.4. Extracción de bandas de ADN de geles de agarosa	66
6. EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES	68
7. AMPLIFICACIONES BASADAS EN PCR	68
7.1. Cebadores utilizados	68
7.2. PCR estándar	68
7.3. Sistema 5'/3' RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends)	71
7.4. RT-PCR	71
7.5. PCR cuantitativa o a tiempo real	72
7.5.1. Estudios de expresión génica (qRT-PCR)	73
7.5.2. Cálculo del número de copias/μl de un gen (qPCR)	73
8. MÉTODOS ELECTROFORÉTICOS	73
8.1. Electroforesis de ADN en geles de agarosa	73
8.2. Electroforesis de ARN en geles desnaturizantes de agarosa	74
8.3. Electroforesis de proteínas en geles de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE)	74
8.3.1. Tinción con azul de Coomassie	74
8.3.2. Marcaje fluorogénico de proteínas ricas en residuos tiol (-SH)	75
9. CLONACIÓN DE FRAGMENTOS DE ADN Y TRANSFORMACIÓN DE <i>E. coli</i>	75
10. SECUENCIACIÓN DE ADN	77
11. ANÁLISIS <i>IN SILICO</i> DE LAS SECUENCIAS NUCLEOTÍDICAS Y AMINOACÍDICAS	77
11.1. Análisis de similitud de las secuencias. Alineamiento múltiple y construcción de árboles filogenéticos	77
11.2. Análisis de motivos conservados en secuencias nucleotídicas	78
11.3. Predicción de la estructura tridimensional (3D) de proteínas	78
11.4. Otros análisis <i>in silico</i>	79
11.4.1. Diseño de cebadores	79
11.4.2. Análisis de los posibles factores de transcripción AP-1 en <i>Tetrahymena</i>	79
11.4.3. Análisis estadístico	79
12. ESTUDIO DE LAS CINÉTICAS DE CRECIMIENTO	79
13. ANÁLISIS MICROSCÓPICO DE DIFERENTES CEPAS DE <i>T. thermophila</i>	81
13.1. Análisis mediante microscopía de fluorescencia	81
13.1.1. Microscopía de fluorescencia con DAPI	81
13.1.2. Microscopía de fluorescencia con el fluorocromo Leadmium Green AM Dye	81
13.2. Análisis mediante microscopía electrónica de transmisión (MET)	81
13.3. Microanálisis al MET	83
14. ANÁLISIS POR CITOMETRÍA DE FLUJO	83
14.1. Cálculo de los valores CL ₅₀	83
14.2. Aplicación de los valores CL ₅₀ en los tratamientos con metales usados en los estudios de expresión	84

15. ENSAYOS SOBRE LA CAPACIDAD BIORREMIADORA DE LAS CEPAS ADAPTADAS	85
15.1. Cálculo de la cantidad de metal retirado del medio por las cepas adaptadas	85
15.2. Bioensayos sobre el nivel de toxicidad del metal no retirado por las cepas adaptadas	85

RESULTADOS..... 87

A.- AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE NUEVAS ISOFORMAS DE METALOTIONEÍNAS EN DIFERENTES ESPECIES DE <i>TETRAHYMENA</i>	89
A.1. Aislamiento y caracterización de nuevos genes codificantes de CdMTs.....	89
A2. Aislamiento y caracterización de nuevos genes codificantes de CuMTs.....	92
A3. Secuencias completas de Cd- y CuMTs obtenidas como ADNc.....	94
A4. Estudio de la expresión de algunos de los nuevos genes MTs tras el tratamiento con diferentes agentes estresantes.....	97
A5. Análisis <i>in silico</i> de la estructura tridimensional inferida de las secuencias de MTs descritas en las diferentes especies de <i>Tetrahymena</i>	104

B.- CARACTERIZACIÓN DE LAS CEPAS ADAPTADAS A ELEVADAS CONCENTRACIONES DE METAL Y CEPAS <i>KNOCKOUT</i> Y/O <i>KNOCKDOWN</i> EN GENES MT	108
B.1. Parámetros ecotoxicológicos, cinéticas de crecimiento y caracterización morfológica de las cepas adaptadas a metales.....	108
B.1.1. Análisis de las cinéticas de crecimiento de las cepas adaptadas a metales	109
B.1.2. Análisis morfológico-estructural de las cepas adaptadas a metales	112
B.2. Parámetros ecotoxicológicos y cinéticas de crecimiento de las cepas <i>knockout</i> (KO)/ <i>knockdown</i> (KD) para los genes <i>MTT1</i> y/o <i>MTT5</i>	128
B.2.1. Análisis de las cinéticas de crecimiento de las cepas <i>knockout</i> y/o <i>knockdown</i>	130
B.3. Análisis comparativo de los perfiles proteicos entre diferentes cepas de <i>T. thermophila</i>	132

C.- ANÁLISIS COMPARATIVO DE LA EXPRESIÓN DE LOS GENES CODIFICANTES DE METALOTIONEÍNAS (MTS) EN SITUACIONES DE ESTRÉS EXTREMO POR METALES PESADOS (Cd^{2+}, Cu^{2+} o Pb^{2+})	135
C.1. Análisis comparativo de la expresión de los genes MTs en diferentes cepas de <i>T. thermophila</i>	135
C.2. Análisis comparativo de la expresión de los genes MTs en las tres cepas adaptadas a metales tras mantenerlas durante 1 ó 6 meses sin exposición al metal.....	141
C.3. Análisis comparativo de los niveles de expresión constitutivos o basales de los genes MTs en diferentes cepas de <i>T. thermophila</i>	143
C.4. Análisis de la variación del número de copias/ μ l de los genes macronucleares codificantes de MTs en las diferentes cepas de <i>T. thermophila</i> Escribir el título del capítulo (nivel 3)	152
C.5. Aislamiento y caracterización de dos nuevas isoformas génicas de metalotioneínas (<i>MTT1a</i> y <i>MTT1b</i>) derivadas por recombinación homóloga a partir del gen <i>MTT1</i> en la cepa MTT5KD	156

D.- FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN DEL TIPO AP-1 (bZIP) COMO POSIBLES REGULADORES DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DE LAS MTs DE <i>Tetrahymena thermophila</i>	158
D.1. Identificación y caracterización estructural de los factores de transcripción del tipo AP-1 localizados en el genoma de diferentes especies de <i>Tetrahymena</i>	158
D.2. Análisis comparativo de la expresión de los genes codificantes de los cuatro factores de transcripción AP-1 descritos en <i>T. thermophila</i>	169
D.3. Análisis comparativo de los niveles de expresión basal de los genes codificantes de los cuatro factores de transcripción AP-1 descritos en <i>T. thermophila</i>	177

E.- POSIBLE UTILIZACIÓN DE LAS CEPAS ADAPTADAS A METAL EN PROCESOS DE BIORREMIADACIÓN: ENSAYOS PRELIMINARES	181
E.1. Determinación de la cantidad de metal retirado del medio por las cepas adaptadas	181
E.2. Análisis de la biodisponibilidad o toxicidad del metal no retirado por las cepas adaptadas....	182

DISCUSIÓN	185
A.- AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE NUEVAS METALOTIONEÍNAS EN DIFERENTES ESPECIES DE <i>TETRAHYMENA</i>	187
A.1. Nuevos genes codificantes de Cd- y CuMTs en el género <i>Tetrahymena</i>	187
A.2. Diferencias entre las dos subfamilias de MTs de ciliados)	189
A.2.1. Distribución de los residuos de cisteína	189
A.2.2. Relación entre los residuos de lisina y cisteína	193
A.2.3. Estructura modular/submodular de las CdMTs (subfamilia 7a).....	193
A.2.4. Asimetría en el uso de los codones que codifican el aminoácido glutamina: implicaciones filogenéticas.....	197
A.3. Características únicas de las MTs de <i>Tetrahymena</i>	201
A.4. Análisis de los ADNc de las nuevas MTs aisladas de especies del género <i>Tetrahymena</i>	206
A.5. Análisis comparativo de la expresión de genes MTs en diferentes especies de <i>Tetrahymena</i> tras el tratamiento con diferentes agentes estresantes	208
A.6. Análisis <i>in silico</i> de la estructura tridimensional de las MTs de <i>Tetrahymena</i>	213
B.- CARACTERIZACIÓN DE LAS NUEVAS CEPAS DE <i>T. thermophila</i>: cepas adaptadas a elevadas concentraciones de metal, cepas <i>knockout</i> y/o <i>knockdown</i>	215
B.1. Caracterización morfológica-estructural y fisiológica de las cepas adaptadas a metales.....	215
B.2. Caracterización de las cepas <i>knockout</i> y/o <i>knockdown</i> en genes MT de <i>T. thermophila</i>	228
C.- ANÁLISIS DE COMPORTAMIENTO DE LOS GENES CODIFICANTES DE METALOTIONEÍNAS (MTs) EN EL CILIADO <i>Tetrahymena thermophila</i> FRENTE A SITUACIONES DE ESTRÉS POR METALES (Cd²⁺, Cu²⁺ o Pb²⁺)	230
C.1. Análisis comparativo de la expresión de los genes MTs en <i>T. thermophila</i> : hacia una mejor comprensión de las funciones de cada una de las isoformas génicas.....	230
C.2. Aumento reversible y específico del número de copias de los genes MTs como estrategia adaptativa de la cepa Cd-ADAP de <i>T. thermophila</i>	240
C.3. Consideraciones sobre las cepas <i>knockout</i> y/o <i>knockdown</i> en genes MTs de <i>T. thermophila</i> : la creación de nuevas isoformas de genes MTs frente a la reducción del número de copias de un gen MT esencial para la célula	243
D.- FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN AP-1 EN <i>Tetrahymena</i>: RESPUESTA A SITUACIONES DE ESTRÉS POR METALES PESADOS (Cd²⁺, Cu²⁺ o Pb²⁺)	248
E.- POTENCIAL UTILIZACIÓN DE LAS CEPAS ADAPTADAS A METALES EN PROCESOS DE BIORREMEDIACIÓN	256
CONCLUSIONES	261
CUESTIONES POR RESOLVER EN EL FUTURO	267
BIBLIOGRAFÍA	271
ANEXOS	297
ANEXO I. Tablas complementarias	299
ANEXO II. Secuencias de los ADNc completos de las nuevas MTs	313
ANEXO III: Artículos científicos publicados	325

ABREVIATURAS

3' UTR: región 3' no traducida (*3' UnTranslated Region*).

5' UTR: región 5' no traducida (*5' UnTranslated Region*).

aa: aminoácido.

ADN: ácido desoxirribonucleico.

ADNc: ADN complementario, obtenido por retrotranscripción a partir de ARN.

ADNg: ADN genómico.

Amp: ampicilina.

AP: cebador adaptador (*Adaptor Primer*).

AP-1/-2: factor de transcripción tipo AP (*Activator Protein*).

AREs: elementos de respuesta a antioxidantes (*Antioxidant Response Elements*).

ARN: ácido ribonucleico.

ARNm: ARN mensajero.

ARNr: ARN ribosómico.

ARNt: ARN transferente.

ATCC: Colección Americana de Cultivos Tipo (*American Type Culture Collection*).

ATP: adenosín trifosfato.

ATPasa tipo ABC: *ATP binding cassette*.

BioNJ: *Bio Neighbour-Joining*.

bZIP: cremallera de leucina con una región básica (*Basic region leucine ZIPper*).

CAM: camptotecina

Cd-ADAP: cepa adaptada a elevadas concentraciones de cadmio.

CdMT: cadmio-metalotioneína.

CHX: cicloheximida

CIB: Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC)

CL₅₀: concentración de un tóxico que causa la mortalidad del 50% de la población celular.

C_t: ciclo umbral (*cycle threshold*) en qPCR

Cu-ADAP: cepa adaptadas a elevadas concentraciones de cobre.

CuMT: cobre-metalotioneína.

DEPC: dietilpirocarbonato.

DMSO: dimetilsulfóxido

dNTPs: dinucleótidos trifosfato.

Abreviaturas

EDTA: etilendiaminatetra-acético.

EPA: Agencia de Protección Ambiental (*Environmental Protection Agency*).

FT: factor de transcripción.

GFP: proteína verde fluorescente (*Green Fluorescent Protein*).

GRAS: generalmente reconocidos como seguros (*Generally Recognised As Safe*).

GREs: elementos de respuesta a glucocorticoides (*Glucocorticoids Response Elements*).

GSH: glutatión.

HSPs: proteínas de choque térmico (*Heat-Shock Proteins*).

ICP-OES: espectrometría de emisión óptica con plasma de acoplamiento inductivo.

IDT: casa comercial *Integrated DNA Technologies*.

IP: yoduro de propidio.

IUPAC: Unión internacional de Química Pura y Aplicada (*International Union of Pure and Applied Chemistry*).

Kb: kilobase.

KD: cepa *knockdown*.

Kn: kanamicina.

KO: cepa *knockout*.

LB: medio de cultivo Luria-Bertani.

mBrB: monobromobimano.

MCT: máxima concentración tolerada.

MD: menadiona.

MEME: programa informático de búsqueda de motivos conservados (*Multiple Em for Motif Elicitation*).

MET: microscopía electrónica de transmisión.

ML: máxima verosimilitud.

MOPS: ácido 3-(N-morfolino) propanosulfónico.

MP: máxima parsimonia.

MRC: casa comercial Molecular Research Center.

MREs: elementos de respuesta a metal (*Metal Response Elements*).

MTCM1: Motivo 1 Conservado en Metalotioneínas (*Metallothionein Conserved Motif 1*).

MTF-1: factor 1 de transcripción en respuesta a metal (*Metal responsive transcription factor 1*).

MT: metalotioneína.

MT-MP: complejo metalotioneína-metal pesado.

NCBI: Centro Nacional de Información Biotecnológica (*National Center for Biotechnology Information*).

NEB: casa comercial New England Biolabs

ORF: marco abierto de lectura (*Open Reading Frame*).

pb: pares de bases.

P_c: promotor constitutivo.

P_{ind}: promotor inducible.

P_{MTT1}: promotor del gen *TtheMTT1*.

P_{MTT5}: promotor del gen *TtheMTT5*.

Pb-ADAP: cepa adaptada a elevadas concentraciones de plomo.

PCR: reacción en cadena de la polimerasa (*Polymerase Chain Reaction*).

PCs: fitoquelatinas.

PCS: enzima fitoquelatín-sintasa.

Phyre: *Protein Homology/analogy Recognition Engine*

Pm: paromomicina

PQ: paraquat

RACE: amplificación rápida de los extremos del ADNc (*Rapid Amplification of cDNA Ends*).

RMN: Resonancia Magnética Nuclear.

ROS: Especies Reactivas de Oxígeno (*Reactive Oxygen Species*).

rpm: revoluciones por minuto.

RS: *riboset*.

RT: retrotranscripción.

SDS: dodecil sulfato de sodio.

sm1: submódulo de tipo 1.

sm2: submódulo de tipo 2.

TAE: tampón Tris/Acetato/EDTA.

TdT: enzima *Terminal deoxynucleotidyl transferase*.

TEM-EDXMA: técnica *Transmission Electron Microscopy-Energy Dispersive X-ray MicroAnalysis*

TPA: 12-O-tetradecanoato-13-acetato

TRE: elemento de respuesta a TPA (*TPA-responsive element*)

TRI Reagent: reactivo utilizado para el aislamiento de ARN total (*Total RNA Isolation Reagent*).

wt: cepa tipo silvestre (wild-type)

Xgal: 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido.

ABREVIATURAS DE LOS 20 AMINOÁCIDOS EN CÓDIGO DE 1 Y 3 LETRAS.

Aminoácido	Abreviatura (3 letras)	Abreviatura (1 letra)
Ácido aspártico	Asp	D
Ácido glutámico	Glu	E
Arginina	Arg	R
Lisina	Lys	K
Asparagina	Asn	N
Histidina	His	H
Glutamina	Gln	Q
Serina	Ser	S
Treonina	Thr	T
Alanina	Ala	A
Glicina	Gly	G
Valina	Val	V
Prolina	Pro	P
Leucina	Leu	L
Fenilalanina	Phe	F
Tirosina	Tyr	Y
Isoleucina	Ile	I
Metionina	Met	M
Triptófano	Trp	W
Cisteína	Cys	C

RESUMEN

Algunos metales son esenciales en múltiples procesos biológicos pero otros, sin embargo, se incluyen entre los contaminantes más abundantes y persistentes del planeta, llegando a ser considerados como prioritarios. Los seres vivos han desarrollado una serie de mecanismos de resistencia frente a estos contaminantes, entre los que se encuentran el secuestro intracelular o la bioacumulación de los cationes metálicos mediante diversas moléculas queladoras, tales como: las fitoquelatinas, las metalotioneínas o el glutatión.

Las metalotioneínas (MTs) constituyen una superfamilia de proteínas citosólicas de bajo peso molecular, capaces de quelar metales pesados a través de sus numerosos residuos de cisteína. Se han descrito MTs en multitud de organismos diferentes: vertebrados (incluyendo el ser humano), invertebrados, plantas y microorganismos eucariotas o procariotas, existiendo entre ellas una gran heterogeneidad estructural y funcional. Las MTs del ciliado *Tetrahymena* (incluidas en la familia 7) muestran un especial interés ya que presentan características únicas frente a las MTs clásicas descritas en otros organismos, tales como su mayor longitud y contenido total en residuos de cisteínas así como su mayor capacidad de quelación de metal.

En el presente trabajo de tesis doctoral se amplía considerablemente nuestro conocimiento sobre la biodiversidad molecular de los genes MT del género *Tetrahymena* y su respuesta frente a diferentes condiciones de estrés. Se han aislado los ADNc de 12 nuevas CdMTs y 9 nuevas CuMTs en cinco especies diferentes: *T. patula*, *T. borealis*, *T. americanis*, *T. malaccensis* y *T. ellioti*. El estudio comparativo de todos ellos junto con los genes MT descritos previamente en el género *Tetrahymena* corrobora la subdivisión de la familia 7 en dos subfamilias: 7a o CdMTs y 7b o CuMTs, que se diferencian principalmente en: su característico patrón de cisteínas, la diferente proporción entre los aminoácidos Lys y Cys, el marcado carácter modular de las CdMTs, la asimetría existente en el uso de codones que codifican el aminoácido glutamina y su inducción preferente por Cd²⁺ o Cu²⁺, respectivamente. Los perfiles de expresión de algunos de estos nuevos genes MT se han analizado mediante RT-PCR cuantitativa tras la exposición de los cultivos celulares a diferentes condiciones de estrés. Los análisis de expresión han confirmado el carácter multi-estrés de las MTs, que responden principalmente a la presencia de metales en el medio pero también frente a compuestos oxidantes, condiciones de pH ácido o básico, elevadas temperaturas (42°C) o estrés por inanición.

En este trabajo también se analizan los mecanismos de adaptación de *T. thermophila* frente a un estrés extremo por metales. Se han aislado y caracterizado tres cepas adaptadas a elevadas concentraciones de metal (denominadas Cd-ADAP, Cu-ADAP y Pb-ADAP), obtenidas tras exposiciones (durante más de dos años) a concentraciones crecientes de Cd²⁺, Cu²⁺ o Pb²⁺, respectivamente. Estas cepas toleran concentraciones máximas de 115 µM de Cd²⁺, 4 mM de Cu²⁺ ó 5,5 mM de Pb²⁺, muy superiores a los valores de CL₅₀ obtenidos en la cepa control SB1969. Su caracterización morfológico-estructural mediante microscopía confocal de fluorescencia y microscopía electrónica de transmisión (MET) muestra estrategias de adaptación muy diferentes en cada una de ellas. Una gran cantidad de gránulos electro-lúcidos

Resumen

similares a acúmulos lipídicos observados en la cepa Cd-ADAP parece relacionar la adaptación al cadmio con la acumulación intracelular de lípidos. Por otro lado, en las células Pb-ADAP destaca la presencia de múltiples acúmulos electrodensos de gran tamaño que, según el estudio realizado por microanálisis acoplado a MET, contienen grandes cantidades de plomo. Este eficaz proceso de bioacumulación descrito en la cepa Pb-ADAP, capaz de secuestrar el plomo en su interior y posteriormente liberarlo de nuevo al medio extracelular como forma no biodisponible (no tóxica), hace de ella una posible candidata para llevar a cabo procesos de biorremediación en ecosistemas contaminados por metales, tal y como hemos comprobado con los bioensayos realizados por ICP-OES sobre su capacidad de eliminación de metal del medio (superior al 90% para la Pb-ADAP en sólo 24h).

La respuesta de *T. thermophila* a la presencia de metales también se ha analizado utilizando varias cepas *knockout* (KO) y/o *knockdown* (KD) (obtenidas mediante transformación biolística) para diferentes genes MT, denominadas como: MTT1KO, MTT5KD y MTT1KO+MTT5KD. El gen *MTT5*, a diferencia de todos los demás genes MT conocidos hasta la actualidad, es un gen esencial y, por consiguiente, no fue posible obtener una cepa *knockout* estable para este gen. Igualmente se ha descubierto que la reducción hasta niveles mínimos del número de copias/ μ l de este gen esencial se compensa en la cepa MTT5KD con la formación de nuevas isoformas génicas de metalotioneínas, generadas por la célula mediante procesos de recombinación homóloga a partir de dos copias del gen *MTT1* original. Estas nuevas isoformas son funcionalmente activas y capaces de sobre-expresarse en respuesta a la presencia de Cd^{2+} . Este hallazgo constituye un nuevo mecanismo adaptativo de respuesta al estrés originado por la ausencia de un gen esencial, no descrito anteriormente en microbiología.

El análisis comparativo de los niveles de expresión de los genes MT llevado a cabo con diferentes cepas de *T. thermophila* (incluyendo las cepas adaptadas a metales y las cepas *knockout* y/o *knockdown*) nos ha aportado una nueva visión sobre las funciones específicas que presentan cada una de las isoformas MT y su relevancia bajo estrés celular, así como sobre la existencia de una posible co-regulación transcripcional entre estos genes MT. El cálculo del número de copias/ μ l de los genes MT en las diferentes cepas de *T. thermophila* nos ha permitido relacionar la adaptación a Cd^{2+} con un proceso de amplificación diferencial relativamente rápido y reversible que afecta a todo el subfragmento cromosómico macronuclear en el que se localizan los genes *MTT1* y *MTT3*.

La expresión de los genes MT de *Tetrahymena* se regula a nivel transcripcional probablemente mediante factores AP-1 (superfamilia bZIP). En cada una de las cuatro especies de *Tetrahymena* analizadas hemos detectado cuatro factores de transcripción AP-1 altamente conservados. El análisis comparativo de los niveles de expresión de los cuatro factores AP-1 presentes en *T. thermophila* nos indica que posiblemente participan en la regulación de la expresión de los genes MT.

SUMMARY

Some metals are essential for multiple biological processes but others are classified among the most abundant and persistent pollutants of the planet, being considered as priority contaminants. Organisms have evolved different mechanisms to protect themselves from toxic metals. Among them, one of the most common mechanisms in organisms is the bioaccumulation of metallic cations through different types of chelating molecules, such as: phytochelatins, metallothioneins or glutathione.

Metallothioneins (MT) constitute a superfamily of small cytosolic proteins which can bind metals through their numerous cysteine residues. MTs have been described in vertebrates (including the human being), invertebrates, plants, eukaryotic and prokaryotic microorganisms, existing among them a high structural and functional heterogeneity. In particular, *Tetrahymena* MTs (family 7) have a special interest as they have some unique features comparing to classic MTs: they are longer, have a higher number of Cys residues and their chelating capacity is also bigger.

One of the objectives of this research work for the doctoral thesis was to increase our knowledge about the molecular biodiversity of *Tetrahymena* MT genes and their ability to respond to stressful conditions. We isolated the cDNAs of 12 new CdMTs and 9 new CuMTs in five still non-explored species: *T. patula*, *T. borealis*, *T. americanis*, *T. malaccensis* and *T. ellioti*. The comparative analysis of all *Tetrahymena* MTs corroborates the subdivision of family 7 into two subfamilies: 7a or CdMTs and 7b or CuMTs. Both subfamilies mainly differ in their characteristic Cys pattern, the different ratio between Lys and Cys residues, the conserved modular pattern of CdMTs, their glutamine codon usage asymmetry and their preferential induction by Cd²⁺ or Cu²⁺, respectively. The expression profiles of some of the new MT genes have been analyzed by quantitative RT-PCR after different stressful treatments. These studies have confirmed the multi-stress character of MTs, that can respond to heavy metals and also to oxidant compounds, acid or basic pH conditions, high temperatures (42°C) or starvation.

Secondly, another main objective was to explore the cellular response of *T. thermophila* to an extreme metal stress. We have obtained three metal adapted strains (named as Cd-ADAP, Cu-ADAP and Pb-ADAP) after exposing (during more than two years) wild-type cells to increasing concentrations of Cd²⁺, Cu²⁺ or Pb²⁺, respectively. These adapted strains tolerate maximum metal concentrations of 115 µM of Cd²⁺, 4 mM of Cu²⁺ or 5,5 mM of Pb²⁺, that are considerably higher than LC₅₀ values previously defined for the SB1969 control strain. Their morphological characterization by confocal fluorescent microscopy and transmission electron microscopy (TEM) shows different adaptation strategies among them. In particular, abundant electro-lucid granules were observed in the Cd-ADAP strain and they were similar to mammalian lipid deposits, therefore, cadmium adaptation seems to be related to lipid droplets synthesis. On the other hand, multiple electro-dense and big lead granules were observed in Pb-ADAP cells, so this strain had evolved a very efficient system to bioaccumulate lead and then release it to the extracellular medium as a non bioavailable form (non toxic). Therefore and taking into account the high ability of the Pb-ADAP strain to remove Pb²⁺ from the medium

Summary

(more than 90% of the initial metal content in only 24h), this strain may be a good candidate for the bioremediation of this metal in polluted ecosystems.

T. thermophila response to metal stress has been also analyzed using different knockout (KO) and/or knockdown (KD) strains, that were obtained by biolistic transformation after eliminating one or two MT genes. These strains were named as MTT1KO, MTT5KD and MTT1KO+MTT5KD. The *MTT5* gene is the first MT gene described as an essential gene and it was not possible to isolate a stable knockout strain for this gene. Moreover, we have detected that the drastic reduction of the number of copies/ μl of the *MTT5* gene in the MTT5KD strain was compensated by the creation of new MT genes. These new isoforms were obtained by the cell by homologous recombination processes from two original *MTT1* copies and they were active and able to over-express after Cd^{2+} treatments. This adaptive process to the absence of an essential gene constitutes a new cell mechanism not reported in Microbiology until now.

The comparative analysis of the MT gene expression levels among different *T. thermophila* strains (including metal-adapted and knockout and/or knockdown strains) has provided us new valuable information about the specific functions of each of the five MT isoforms and their relevance under metal extreme stress situations. A possible transcriptional co-regulation has been also detected among these MT genes. Furthermore, we calculated the number of copies/ μl for the MT genes in the different *T. thermophila* strains and we discovered a differential macronuclear amplification of the whole subchromosomal fragment which contains *MTT1* and *MTT3* genes. This amplification is a relatively fast and reversible process and it is exclusive of the Cd-ADAP strain.

Tetrahymena MT gene expression is mainly regulated at transcriptional level probably by AP-1 transcription factors (bZIP superfamily). We have described four AP-1 transcription factors in each of the four analyzed *Tetrahymena* species and all of them are highly conserved. The comparative analysis of the expression levels of the four *T. thermophila* AP-1 genes has shown that they are probably regulating the MT gene response under metal stress. Likewise, a model to explain the differential functions of each AP-1 transcription factor has been proposed.

Introducción

Objetivos

Material y Métodos

Resultados

Discusión

Conclusiones

Cuestiones por resolver en el futuro

Bibliografía

Anexos

INTRODUCCIÓN

A.- LOS METALES COMO TÓXICOS AMBIENTALES: TOXICIDAD Y MECANISMOS DE RESISTENCIA

A.1. Definición de metal, metaloide y metal pesado

Los metales son definidos químicamente como aquellos elementos que conducen la electricidad, tienen un brillo metálico, son dúctiles y maleables, forman cationes y tienen óxidos básicos (Atkins and Jones, 1997). Teniendo en cuenta esta definición muchos elementos pueden ser descritos como metales y, por esta razón, han ido surgiendo otros términos para especificar diferentes subgrupos dentro de este concepto tan amplio (Duffus, 2002). Entre ellos, destaca el concepto de metaloide (denominado semimetal por algunos autores) con el que nos referimos a aquellos elementos que, a pesar de tener la apariencia física y las propiedades de un metal, se comportan químicamente como un no-metal (Atkins and Jones, 1997). Algunos ejemplos de metaloides son el arsénico, el aluminio o el galio (Schnöckel, 2008).

Por otro lado, el término "metal pesado", ampliamente utilizado en las publicaciones científicas durante las últimas décadas, es uno de los términos de mayor controversia ya que aún no ha sido definido con precisión y en cada caso se utilizan diferentes criterios, como pueden ser: la densidad (superior a 5 g/cm³) (Järup, 2003), la masa atómica, el número atómico (superior a 20, excluyendo metales alcalinos y alcalinotérreos) o las propiedades químicas de los diferentes elementos metálicos y sus derivados (Duffus, 2002). Aunque algunos autores defienden el uso de este concepto ante la falta de alternativas mejores y a pesar de su imprecisión, otros consideran necesaria una nueva clasificación en base a las propiedades físico-químicas de cada elemento que permita interpretar las bases bioquímicas de su toxicidad (Hodson, 2004). Algunas autoridades como la IUPAC (Unión Internacional de Química Pura y Aplicada) proponen como alternativa el uso del término "metal tóxico", considerando las concentraciones letales de cada elemento para permitir una clasificación más precisa. En definitiva, como el término "metal pesado" normalmente se relaciona en ecotoxicología con las connotaciones de toxicidad y contaminación ambiental, en este trabajo se seguirá empleando este término (a pesar de la controversia que suscita) junto con el nuevo propuesto por la IUPAC ("metal tóxico") a la espera de tener una definición mejor.

A.2. Importancia medioambiental de los metales

Los metales son componentes naturales de la corteza terrestre, cuya composición y concentraciones varían entre las diferentes regiones geográficas (Jaishankar *et al.*, 2014). Los metales juegan un papel muy importante en la vida de todos los seres vivos. De hecho, algunos como K, Na, Ca, Fe, Ni, Mg, Mn, Co, Zn y Cu son micronutrientes esenciales en bajas concentraciones para el metabolismo y el crecimiento celular, pueden contribuir a la

estabilización de estructuras y moléculas biológicas, funcionan como co-factores en multitud de reacciones enzimáticas o en las cadenas transportadoras de electrones (Gadd, 2000), e intervienen en la regulación de la expresión genética.

Por otro lado, existen ciertos metales que, en general, no forman parte de los organismos vivos y son considerados como no esenciales, tales como: Cd, Al, Ag, Hg o Pb (Bruins *et al.*, 2000). Muchos de éstos se clasifican entre los contaminantes medioambientales más abundantes y tóxicos del planeta, pues forman complejos persistentes que no pueden ser transformados por procesos biológicos ni químicos. Una vez en el suelo, los metales pueden quedar retenidos en éste o bien mobilizarse hasta las aguas superficiales o subterráneas, transferirse a la atmósfera por procesos de volatilización o ser absorbidos por las plantas e incorporarse a las cadenas tróficas, donde tienden a acumularse y bioamplificarse hasta llegar al ser humano, al que ocasionan graves problemas de salud (Fairbrother *et al.*, 2007; Dal Corso *et al.*, 2010). Además, en los últimos años y principalmente como consecuencia de determinadas actividades de origen antropogénico (la minería, la agricultura, la producción de energía, el transporte u otras actividades industriales), los niveles de estos contaminantes han aumentado considerablemente en el aire y en los ecosistemas terrestres y acuáticos (Klimek, 2012). Por todo ello, los metales pesados han llegado a ser considerados como contaminantes ambientales prioritarios (Martín-González *et al.*, 2006) y la EPA (Agencia de Protección Ambiental) ha desarrollado programas de control frente a ellos ante el riesgo que suponen para la salud humana y el medio ambiente (Fairbrother *et al.*, 2007).

A continuación, se describe brevemente la importancia medioambiental de los metales que han sido utilizados en el presente trabajo de investigación:

- ✓ Arsénico (As): es un metaloide no esencial que se encuentra en el ambiente tanto en forma organometálica como inorgánica y que presenta dos estados de oxidación principales: arsenito (As^{3+}) y arseniato (As^{5+}) (Jaishankar *et al.*, 2014). También es capaz de formar óxidos, sulfuros y sales de hierro, sodio, calcio, cobre, etc. (Singh *et al.*, 2007). La contaminación por arsénico puede ocurrir tanto como consecuencia de los procesos geológicos naturales como por actividades del ser humano, como son la minería o el uso de diferentes fertilizantes o pesticidas (Matschullat, 2000). El arsénico es un potente inhibidor de la respiración mitocondrial y genera especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno (Valko *et al.*, 2005; Rana, 2008). El arsénico es el responsable de la inducción de distintas rutas de señalización, como varias vías de apoptosis y de muerte celular autofágica en células de mamífero (Rana, 2008; Franco *et al.*, 2009). Además, es un potente agente mutágeno y carcinogénico. Una exposición prolongada a este metal puede acarrear la aparición de lesiones cutáneas, distintos tipos de cáncer, problemas neurológicos, enfermedades pulmonares, hipertensión, alteraciones cardiovasculares o diabetes mellitus (Smith *et al.*, 2000).
- ✓ Plomo (Pb): es un metal con un único estado de oxidación (Pb^{2+}) que carece de cualquier función biológica conocida. Se considera uno de los metales más tóxicos y abundantes del planeta. La contaminación de origen antropogénico puede proceder de muy variadas fuentes, como son: el uso de fertilizantes y pesticidas, los residuos industriales, las actividades mineras, los gases liberados por los automóviles, los aditivos en la gasolina

que posteriormente sufren un proceso de combustión, etc. (Sharma and Dubey, 2005). Además, al ser soluble en agua, el plomo puede ser absorbido por las raíces de las plantas e incorporarse así a la cadena alimentaria. De esta forma, los seres humanos pueden exponerse a plomo mediante la ingesta de agua o alimentos contaminados o mediante la inhalación de partículas de plomo generadas por combustión (Goyer, 1990). En las plantas, el plomo altera gran cantidad de procesos fisiológicos induciéndose la producción de ROS (radicales libres de oxígeno), daños en la membrana fosfolipídica y, en último término, daños en los procesos fotosintéticos y en el crecimiento general de la planta (Najeeb *et al.*, 2014). Por otro lado, en las células animales, el plomo actúa principalmente a dos niveles: afectando al transporte de iones divalentes (Ca^{2+} , Mg^{2+} o Fe^{2+}) y monovalentes (Na^+) y favoreciendo situaciones de estrés oxidativo. Esta acción prooxidante del plomo conduce a un aumento de los niveles de ROS y a una disminución de los niveles de antioxidantes mediante la inhibición enzimática y la peroxidación lipídica (Wadhwa *et al.*, 2012; Jaishankar *et al.*, 2014). Además, la alteración del transporte iónico afecta enormemente al metabolismo celular y a multitud de procesos biológicos, tales como: la adhesión celular, la señalización intra- e inter-celular, el plegamiento de las proteínas, la apoptosis, la regulación enzimática o la comunicación neuronal (Jaishankar *et al.*, 2014).

- ✓ Cadmio (Cd): es un metal no-esencial que presenta un único estado de oxidación (Cd^{2+}). Se utiliza principalmente en la fabricación de baterías recargables, pero también en los baños o revestimientos metálicos y en la elaboración de pigmentos (Jaishankar *et al.*, 2014). El cadmio puede permanecer en los suelos durante décadas y ser absorbido gradualmente por las plantas, que lo acumulan (bioamplificación) y favorecen su incorporación a la cadena alimentaria. El ser humano puede exponerse a cadmio tanto mediante la inhalación como mediante la ingestión de alimentos contaminados (principalmente frutas y verduras), pudiendo llegar a sufrir intoxicaciones agudas o crónicas, alteraciones óseas y renales, deficiencias en el sistema inmune o cáncer prostático o hepático (Bertin and Averbeck, 2006; Joseph, 2009). Además, una vez que el metal es absorbido por el organismo, permanece en él durante toda su vida. A nivel celular el cadmio presenta efectos muy negativos para todo el sistema enzimático y bloquea los canales de membrana para el calcio. También es considerado como un agente genotóxico como consecuencia del gran estrés oxidativo que produce y la interferencia en los mecanismos de reparación del ADN (Bertin and Averbeck, 2006). En plantas induce situaciones de deficiencia nutricional (Irfan *et al.*, 2013).
- ✓ Cobre (Cu): es un metal esencial para la mayoría de los seres vivos y, debido a su carácter redox, participa como cofactor de muchas enzimas relacionadas con el transporte de electrones y las reacciones químicas del oxígeno. Además, al menos 30 metaloproteínas han sido clasificadas como cobre-proteínas o cobre-enzimas, que participan en múltiples procesos, tales como: la fotosíntesis (plastocianina), la respiración (citocromo c oxidasa), la detoxificación de radicales libres (superóxido dismutasas) o la oxidación de metales o sustratos orgánicos, produciendo gran cantidad de metabolitos, neuropéptidos, pigmentos y otros compuestos biológicamente activos (Solomon *et al.*, 2014). De esta forma, el contenido celular de cobre debe regularse para asegurar los niveles necesarios para el funcionamiento celular sin que se encuentre en exceso, porque puede ser tóxico.

Introducción

En general, se acepta que la toxicidad celular del cobre se debe principalmente a su carácter redox y a la formación de ROS. El ión cúprico (Cu^{2+}), en presencia de reductores celulares, es reducido a ión cuproso (Cu^+), que puede reaccionar con el peróxido de hidrógeno mediante la reacción de Fenton dando lugar al radical hidroxilo, que es extremadamente reactivo y puede ocasionar una intensa peroxidación lipídica y, por tanto, graves alteraciones a nivel de membrana y mitocondria (Valko *et al.*, 2005; Besold *et al.*, 2016). Además, el cobre puede desplazar al hierro de las agrupaciones Fe-S, inactivando varias enzimas (Macomber and Imlay, 2009), o incluso puede causar roturas en el ADN y la oxidación de bases (Franco *et al.*, 2009).

- ✓ Zinc (Zn): es un metal esencial para la mayoría de los seres vivos porque participa en numerosos procesos fisiológicos, tales como: el mantenimiento de la integridad de la membrana celular (función estructural), múltiples reacciones enzimáticas relacionadas con el metabolismo de lípidos, proteínas y carbohidratos (función catalítica), actúa como mediador de procesos de señalización inter- e intracelular y participa en la regulación de la expresión genética (Kimura and Kambe, 2016). Además, el zinc se considera como un potente antioxidante que protege a las células mediante diferentes mecanismos: induciendo y manteniendo los niveles basales adecuados de metalotioneínas, formando parte de la superóxido dismutasa o interaccionando tanto con moléculas ricas en grupos tiólicos como con otros metales con actividad redox como el cobre o el hierro (Formigari *et al.*, 2007; Bell and Vallee, 2009). Por todas estas razones, como en el caso del cobre, se debe regular la concentración celular de zinc de manera precisa, pues a elevadas concentraciones puede comportarse como un agente oxidante e inducir procesos de apoptosis celular (Valko *et al.*, 2005; Formigari *et al.*, 2007).

La biodisponibilidad de los metales es la capacidad de éstos para atravesar la membrana citoplasmática hacia el interior celular (Semple *et al.*, 2004). Por otro lado, la bioaccesibilidad se define como la cantidad de metal que está o puede estar disponible en un período de tiempo y ante determinadas condiciones (Semple *et al.*, 2004). De esta forma, la biodisponibilidad de los metales y, por tanto, su toxicidad, varían enormemente según las condiciones físico-químicas del medio: pH, temperatura, potencial redox, concentración de oxígeno, capacidad de intercambio catiónico, concentración de materia orgánica, presencia de otros metales (reacciones de sinergia o de antagonismo), etc. (Bondarenko *et al.*, 2008). De entre todos estos factores destaca el efecto del pH sobre el comportamiento de los metales: a pH ácido aumenta considerablemente la biodisponibilidad de los mismos (Fairbrother *et al.*, 2007). Sin embargo, además de dichos factores físico-químicos, la biodisponibilidad de los metales también es influida por la propia actividad metabólica de los microorganismos del suelo así como por otros procesos biológicos tales como la bioprecipitación, la biosorción (secuestro extracelular) y la bioacumulación (secuestro intracelular) (Bondarenko *et al.*, 2008) (explicados en el apartado A.4).

A.3. Mecanismos de toxicidad celular de los metales y metaloides

Todos los metales son tóxicos en mayor o menor medida para los seres vivos, incluso los metales esenciales, que son perjudiciales a elevadas concentraciones. La causa primaria de la gran toxicidad de los metales es su capacidad para interactuar con moléculas orgánicas, presentando un efecto nocivo sobre biomoléculas esenciales como son las proteínas, los ácidos nucleicos o los lípidos de membrana (Fig. 1). En múltiples ocasiones incluso provocan la muerte celular por apoptosis o necrosis (Gallego *et al.*, 2007).

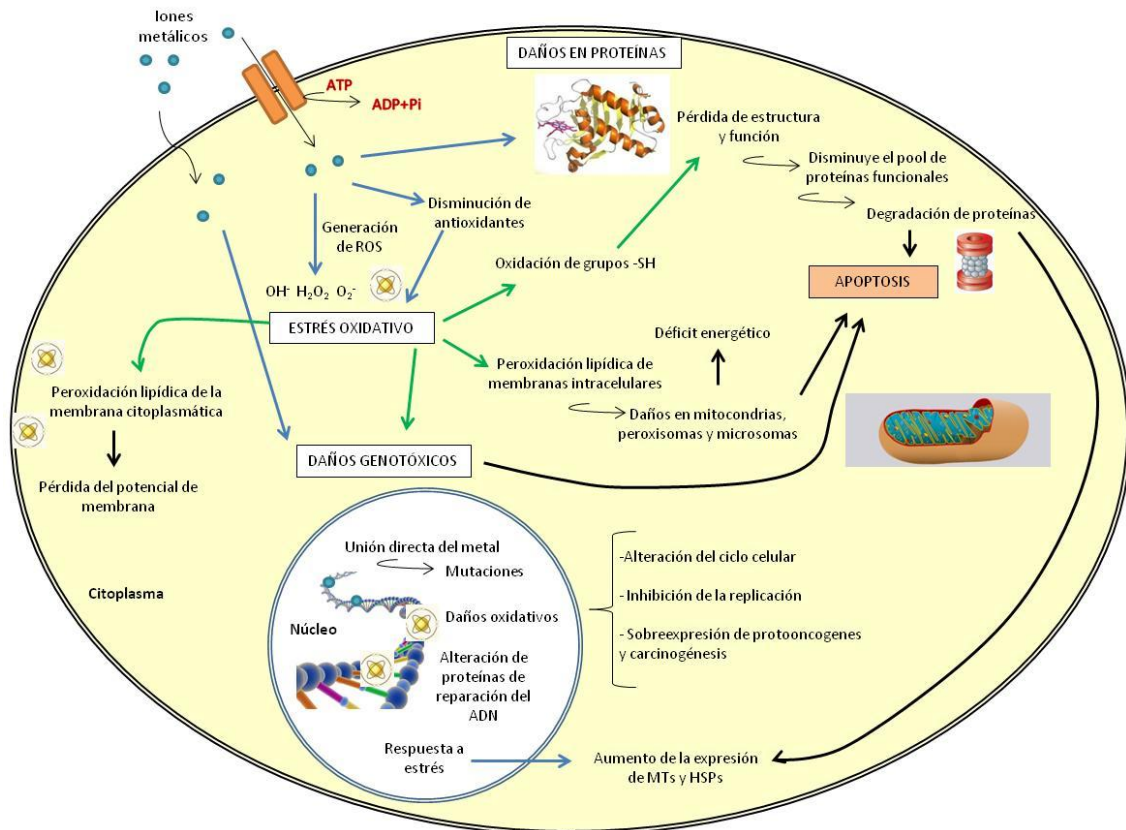


Fig. 1. Rutas de toxicidad celular causadas de manera directa o indirecta por la presencia de metales pesados. HSPs: proteínas de choque térmico. MTs: metalotioneínas. Flecha azul: efectos causados directamente por los cationes metálicos. Flecha verde: efectos causados por ROS. Flecha negra: efectos causados por ambos factores.

Los iones metálicos pueden entrar al interior celular mediante dos mecanismos diferentes: a-) mediante un proceso inespecífico relacionado con el gradiente quimiosmótico generado a través de la membrana citoplasmática, o b-) mediante un mecanismo altamente específico dependiente de energía (transporte activo a través de ATPasas de tipo P, subfamilia 1B) (Hussain *et al.*, 2004; Sitsel *et al.*, 2015). El primero de los mecanismos se trata de un sistema rápido y expresado de manera constitutiva que permite la entrada libre ("open gate") de los iones metálicos, llegando a alcanzarse rápidamente los niveles tóxicos de éstos en el interior celular. Sin embargo, el segundo mecanismo de entrada es altamente específico, relativamente lento y sólo se expresa ante determinadas circunstancias (requerimientos

Introducción

metabólicos, hambre, etc.), por lo que puede considerarse un sistema inducible (Choudhury and Srivastava, 2001).

Una vez en el interior celular, los cationes metálicos pueden reaccionar con moléculas esenciales para la célula (Fig. 1). Cabe destacar su gran afinidad por grupos sulfidrido, radicales amino, fosfato, carboxilo e hidroxilo (Navarro-Aviñó *et al.*, 2007). El resultado de esta unión ligando-metal puede ser muy perjudicial, afectando de diferentes formas a la viabilidad celular:

a-) Acción directa sobre las proteínas: los metales pesados pueden causar la inhibición de su actividad o la pérdida de su estructura al desplazar o sustituir a otros metales esenciales que son fundamentales para mantener la conformación y/o la función de la proteína. Los desplazamientos entre metales son frecuentes cuando la concentración del metal pesado competitivo es elevada y la del metal esencial es deficiente. Un ejemplo es la sustitución del zinc por plomo en la δ -ácido aminolevulínico deshidratasa humana (Goering, 1993).

b-) Acción directa sobre los ácidos nucleicos: algunos metales pesados (como el Cr^{3+}) pueden unirse de manera directa a los ácidos nucleicos, alterando su conformación activa (Nickens *et al.*, 2010).

c-) Estrés oxidativo: los metales pesados pueden estimular de manera directa (generación de ROS y otros radicales libres) o indirecta (disminución/inhibición de los sistemas antioxidantes) los fenómenos de estrés oxidativo (Rico *et al.*, 2009). Además, el comportamiento de los metales es diferente en función de si éstos presentan actividad redox o no. Los metales con actividad redox pueden producir radicales libres por dos vías principales: la autooxidación y la vía Fenton/Haber-Weiss. Los metales con más de una valencia son capaces de autooxidarse en presencia de oxígeno produciendo el radical superóxido y peróxido de hidrógeno (Yamamoto and Kawanishi, 1991). Por otro lado, en la reacción de Fenton se descompone el peróxido de hidrógeno mediante la adición de sales de hierro para formar el radical hidroxilo, altamente reactivo y nocivo. En la reacción de Haber-Weiss se aprovecha el radical hidroxilo producido por la reacción de Fenton para reaccionar con más peróxido y originar el radical superóxido, que a su vez reacciona con más peróxidos y genera de nuevo los radicales obtenidos por la reacción de Fenton. De esta forma, el metal reducido se vuelve a oxidar formándose un bucle de oxidación y reducción que genera en cada ciclo radicales hidroxilo (Navarro-Aviñó *et al.*, 2007).

Finalmente, los ROS y otros radicales libres pueden provocar daños a distintos niveles:

- La inactivación de proteínas y enzimas mediante la oxidación de sus grupos sulfidrilos y la formación de puentes bisulfuros.
- La peroxidación lipídica de las membranas celulares, causando rupturas y subproductos de las cadenas hidrocarbonadas.
- Daños genotóxicos sobre el ADN, tanto mediante un daño oxidativo directo en las bases nucleotídicas que originan alteraciones mutagénicas como la 8-OH-dG (Bertin and Averbeck, 2006), como mediante la modificación de las proteínas que intervienen en la reparación del ADN.

A.4. Mecanismos de resistencia frente a metales y metaloides

Frente a estos mecanismos de toxicidad y ante la presión selectiva que ejerce la presencia de metales en el ambiente, los seres vivos han desarrollado diversos mecanismos de resistencia o defensa, tanto frente a metales esenciales que se encuentren en una elevada concentración como frente a metales pesados no esenciales y altamente tóxicos (Fig. 2). Las interacciones microorganismo-metal pesado han sido ampliamente estudiadas en los últimos años (principalmente en bacterias y hongos) con el propósito de analizar su posible aplicación en procesos de biorremediación. Este tipo de interacciones desencadenan tanto una respuesta general de estrés celular como un mecanismo específico de resistencia al metal pesado, que protegen a la célula contra la toxicidad del mismo (Gutiérrez *et al.*, 2008).

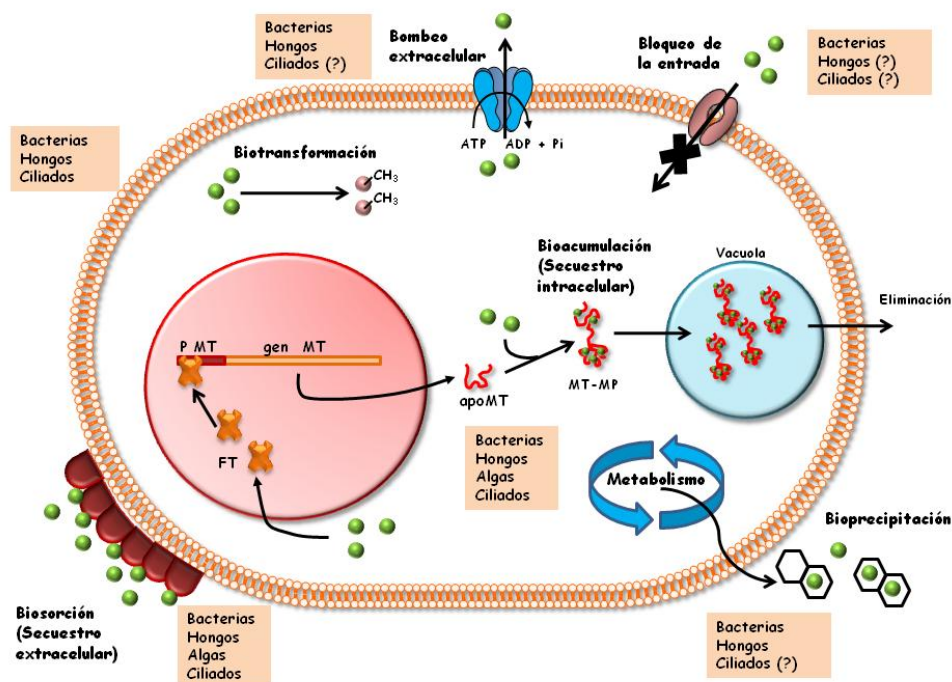


Fig. 2. Esquema de los seis principales mecanismos de resistencia frente a metales/metaloides que pueden existir en los microorganismos y en otros muchos seres vivos. (?): existen indicios de que podría existir un mecanismo de defensa de este tipo en un determinado grupo pero aún no se ha comprobado experimentalmente. FT: factor de transcripción. MT: metalotioneína. MP: metal pesado (representado con esferas verdes). MT-MP: complejo metalotioneína-metal pesado.

Se pueden distinguir al menos seis mecanismos de resistencia a metales y/o metaloides presentes tanto en microorganismos eucariotas como procariotas, así como en organismos superiores (Fig. 2) (Bruins *et al.*, 2000):

1- BLOQUEO DE LA ENTRADA DEL METAL AL INTERIOR CELULAR

Este mecanismo evita la entrada de metal mediante alteraciones en la membrana, la pared o la envoltura celular (barreras permeables) con el fin de proteger los componentes celulares esenciales y sensibles a la presencia de metal (Bruins *et al.*, 2000). Otras veces se impide la entrada de metales tóxicos mediante el bloqueo de los sistemas de transporte activo de

algunos metales esenciales, como el Mg^{2+} y el fosfato, que serán captados por una vía alternativa (Bruins *et al.*, 2000).

Este mecanismo de defensa es típicamente bacteriano y ha sido ampliamente descrito en diferentes especies: *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis* (ante la presencia de Cd^{2+}), *Pseudomonas putida* (tanto para el caso del Cd^{2+} como del Zn^{2+}) (Gowri and Srivastava, 1996) o *Pseudomonas aeruginosa* (para la defensa frente a Cr^{6+}) (Ahemad, 2014). En *Escherichia coli*, ante un exceso de Cu^{2+} en el medio, se consigue reducir la permeabilidad de la membrana celular al alterarse específicamente (mediante la mutación de un único gen) la producción de un canal proteico de membrana (Bruins *et al.*, 2000). Aunque no dispongamos de evidencias experimentales, posiblemente este mecanismo de bloqueo también exista en hongos y ciliados debido al gran número de bombas que presentan para el transporte activo de metales esenciales, con los que competirían los metales tóxicos para acceder al interior celular.

2- ELIMINACIÓN CITOPLÁSMICA DEL METAL MEDIANTE BOMBAS DE EFLUJO

Este mecanismo permite la expulsión de los cationes metálicos acumulados en el citoplasma mediante su transporte activo a través de bombas de eflujo. El hecho de que este mecanismo de resistencia sea dependiente de ATP se demostró al observar una reducción significativa en el bombeo de iones tras el uso de desacopladores energéticos y antibióticos ionóforos (Bruins *et al.*, 2000). Se han descrito dos sistemas de transporte activo para expulsar metales: a-) mediante ATPasas de membrana de tipo P o de tipo ABC (*ATP Binding Cassette*) y b-) mediante un sistema antitransportador catión/protón (Silver and Phung, 2005). Entre ellos, destaca el ejemplo de la ATPasa de tipo P denominada CadA, que proporciona resistencia a Cd^{2+} y Zn^{2+} en *S. aureus* y *Pseudomonas spp.* (Silver and Phung, 2005). Por otro lado, como ejemplo de antitransporte catión/protón destaca el sistema Czc de la bacteria del suelo *Ralstonia eutrophus*, que aporta resistencia a Cd^{2+} , Zn^{2+} y Co^{2+} (Choudhury and Srivastava, 2001).

En definitiva, este mecanismo de resistencia es de gran importancia en muchas bacterias, pero también ha sido estudiado en hongos (Weissman *et al.*, 2000) y en algunos organismos superiores como los mamíferos. Un ejemplo es la proteína transportadora denominada ZnT4, que es la responsable del bombeo extracelular del exceso de zinc en mamíferos (Choudhury and Srivastava, 2001). Finalmente, en el caso de los ciliados, es muy posible que también exista este mecanismo de resistencia ya que, según los análisis *in silico* del genoma macronuclear de *Tetrahymena thermophila*, los ciliados presentan un gran número de genes que codifican este tipo de transportadores: 485 bombas de las que 91 son ATPasas de tipo P (Gutiérrez *et al.*, 2011). Por lo tanto, muy probablemente alguna de estas bombas permitirá la expulsión activa de metal al exterior celular. Esta posibilidad se corrobora con el análisis de diversas genotecas de expresión obtenidas en *T. thermophila* tras la exposición a Cd^{2+} , Pb^{2+} o As^{5+} , que indican que del total de los ADNc estudiados aproximadamente un 4,6% de ellos codifican transportadores de membrana en presencia de Cd^{2+} y un 2,6% en presencia de As^{5+} (Gutiérrez *et al.*, 2008).

3- BIOACUMULACIÓN (SECUESTRO INTRACELULAR)

Consiste en la inmovilización y acumulación citoplasmáticas de los cationes metálicos mediante su unión a proteínas (metalotioneínas), péptidos específicos (fitoquelatinas o glutatión) o a otras moléculas orgánicas como los gránulos de reserva de polifosfatos. Una vez formados los complejos molécula ligando-metal, éstos pueden compartimentalizarse en

vacuolas, cloroplastos o mitocondrias y, posteriormente, eliminarse al exterior celular como formas ya no tóxicas (Klaassen *et al.*, 2009; Vasák and Hasler, 2000).

Se distinguen dos tipos de moléculas de naturaleza peptídica capaces de quelar metales pesados y generalmente implicadas en procesos de detoxificación celular:

3a-) Moléculas biosintetizadas enzimáticamente:

Entre éstas destacan el tripéptido glutatión (γ -Glu-Cys-Gly) y las fitoquelatinas (PCs). Las PCs se describieron por primera vez en la levadura de fisión *Schizosaccharomyces pombe* (Kondo *et al.*, 1984), donde se nombraron inicialmente como cadistidinas. Posteriormente, también se han encontrado PCs en plantas superiores (Grill *et al.*, 1988), en gran cantidad de hongos (Grill *et al.*, 1986; Guimarães-Soares *et al.*, 2006), en algunas microalgas como *Chlamydomonas reinhardtii* (Grill *et al.*, 1989; Bräutigam *et al.*, 2011) y *Euglena gracilis* (Mendoza-Cózatl *et al.*, 2002), en platelmintos como *Schistosoma mansoni* (Rigouin *et al.*, 2013) y en el nematodo *Caenorhabditis elegans* (Vatamaniuk *et al.*, 2000). Sin embargo, no se han descrito PCs en el ser humano ni en ningún otro mamífero (García-García *et al.*, 2016).

Las PCs son oligopéptidos derivados del glutatión (GSH) (Fig. 3A) que se sintetizan enzimáticamente por la fitoquelatín-sintasa (γ -glutamilcisteiniltransferasa; EC 2.3.2.15). Esta enzima se induce en presencia de metales como Cd^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Ag^+ o Hg^{2+} (Hirata *et al.*, 2005), con los que las PCs se unen y forman complejos (Fig. 3B). Por ello, se atribuyen a las PCs tanto las funciones de detoxificación celular frente a metales tóxicos como el mantenimiento de la homeostasis de los niveles intracelulares de metales esenciales (Mendoza-Cózatl *et al.*, 2011).

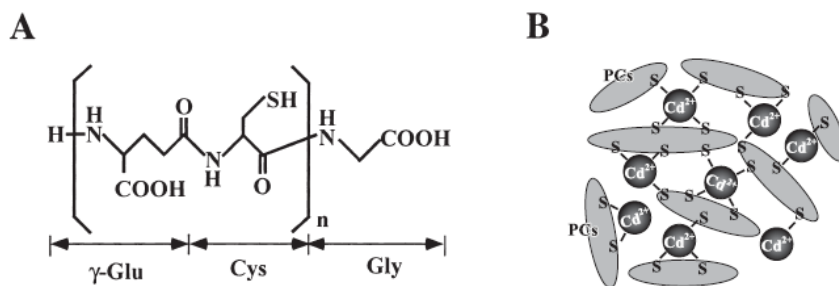


Fig. 3. Estructura primaria de las fitoquelatinas (PCs) (A) y complejos PCs- Cd^{2+} (B). Generalmente, se indica la estructura primaria de las PCs como $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Gly}$, donde $n=2-11$. Las formas iónicas de los metales pesados como el Cd^{2+} se unen de manera coordinada a uno, dos, tres o cuatro átomos de azufre, dando lugar a los complejos péptido-metal. Imagen tomada de Hirata *et al.*, 2005.

Por otro lado, los gránulos de volutina o polifosfatos también participan en los procesos de bioacumulación de metales pesados. Éstos han sido descritos en bacterias, protozoos, algas, plantas y células de mamíferos (Docampo and Moreno, 2008; Lemercier *et al.*, 2004; Ruiz *et al.*, 2001). Los polifosfatos son compartimentalizados en los acidocalcisomas, que son organelas ácidas con una elevada concentración de pirofosfato

(Pi), polifosfatos (P-Pn) y metales esenciales como Ca^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{3+} o Zn^{2+} (García-García *et al.*, 2016), en donde estos últimos pueden ser sustituidos por metales tóxicos.

3b-) Moléculas codificadas por genes:

Destacan las metalotioneínas (MTs), que son proteínas citosólicas de, en general, bajo peso molecular y caracterizadas por un elevado contenido en residuos de cisteína (Gutiérrez *et al.*, 2009). Las MTs se han descrito en algunos microorganismos procariontes, y en todos los organismos eucariotas, incluyendo el ser humano, en el que se han identificado al menos diez isoformas de MTs distribuidas en cuatro grupos distintos (MT-1, MT-2, MT-3 y MT-4) en función de su peso molecular, el metal al que se unen de manera prioritaria, los genes que las codifican, etc. En el ser humano estas MTs se sintetizan principalmente en el hígado y los riñones y tienen una localización celular y funciones características (Thirumoorthy *et al.*, 2011).

4- BIOSORCIÓN (SECUESTRO EXTRACELULAR)

Este mecanismo de resistencia se basa en el secuestro pasivo de los cationes metálicos por polímeros extracelulares, paredes celulares o cápsulas (Nies, 1999). Es un mecanismo rápido e independiente de cualquier actividad metabólica y, por tanto, a diferencia de los procesos de bioacumulación previamente explicados, los fenómenos de biosorción son llevados a cabo tanto por células vivas como por células muertas, así como por formas de resistencia metabólicamente inactivas (esporas bacterianas, quistes de resistencia de protistas, etc.) (François *et al.*, 2011). Un ejemplo es el proceso de biosorción que lleva a cabo el ciliado *Colpoda inflata*, cuyos quistes maduros son capaces de retener en sus cubiertas glucoproteicas los cationes de Cd^{2+} , disminuyendo su biodisponibilidad en el medio y, por tanto, su toxicidad (Gutiérrez *et al.*, 2008).

Las bacterias parecen ser los organismos con mayor capacidad para adsorber metales en su superficie debido a su mayor relación superficie-volumen y, junto con hongos y algas son cada vez más utilizadas en prácticas de biorremediación de metales pesados frente a otros métodos tradicionales más costosos y complejos (Rehman *et al.*, 2010; Javanbakht *et al.*, 2014). De esta forma, los biosorbentes pueden contener una gran variedad de sitios funcionales, tales como: grupos carboxilo, imidazol, sulfhidrilo, amino, fosfato, sulfato, tioéter, fenol, carbonilo, amida e hidroxilo, que permiten la adsorción/retención de los metales (Javanbakht *et al.*, 2014).

5- BIOTRANSFORMACIÓN

Esta estrategia permite obtener especies iónicas menos tóxicas o incluso no tóxicas mediante diferentes procesos metabólicos celulares. Las modificaciones químicas más frecuentes son la reducción y la metilación de los cationes tóxicos. Los procesos de biotransformación han sido ampliamente descritos en bacterias, hongos y protozoos ciliados. Un ejemplo de este mecanismo es el proceso de destoxificación del mercurio que llevan a cabo muchas bacterias gracias a la expresión del operón *mer*, que entre otras proteínas, codifica una mercurio-reductasa (MerA). Esta enzima es capaz de transformar la forma tóxica del mercurio (Hg^{2+}) en su forma volátil (Hg^0), menos tóxica para la célula (Silver and Phung, 2005). En ciliados, recientemente se ha descrito en *Tetrahymena pyriformis* una metil-transferasa de arsenito

(As³⁺), que es capaz de metilar y volatilizar este metal pesado (Ye *et al.*, 2014). Además, muchos organismos son capaces de reducir el Cr⁶⁺ a Cr³⁺ tanto en el exterior celular como en el interior de las células mediante la acción de las enzimas cromato-reductasas (Joutey *et al.*, 2015). De esta forma, muchos de estos procesos de biotransformación llevados a cabo por microorganismos son utilizados en prácticas naturales de biorremediación, más económicas que los métodos químicos tradicionales de retirada de metales pesados del medio (Joutey *et al.*, 2015).

6- BIOPRECIPITACIÓN

Consiste en la inmovilización de la forma catiónica tóxica del metal mediante la liberación al medio extracelular de productos del metabolismo, siendo así otra forma de secuestro extracelular. En este estado (acomplejados) los metales pesados no son biodisponibles y, por tanto, no son tóxicos para los seres vivos (Gadd, 2000). La bioprecipitación ha sido descrita principalmente en bacterias y hongos, conociéndose en detalle dos tipos de bioprecipitación de origen microbiano: a-) la formación de sulfuros metálicos como consecuencia del metabolismo respiratorio anaerobio de las bacterias sulfatorreductoras y b-) la formación de complejos metálicos con ácidos orgánicos (glucurónico, cítrico, oxálico, etc.) resultantes del metabolismo fermentativo de bacterias y hongos heterótrofos (Gadd, 2000). Un ejemplo es el caso de *Citrobacter spp.*, que gracias a la expresión de múltiples copias de su fosfatasa ácida periplasmática no específica (PhoN) es capaz de hidrolizar los fosfatos orgánicos e inorgánicos y liberar al medio aniones fosfato (HPO₄²⁻), que interaccionan y causan la precipitación de los cationes metálicos. Éstos, una vez cristalizados de esta forma, dejan de ser tóxicos (Appukuttan *et al.*, 2006). También los procesos de bioprecipitación son útiles para algunas aplicaciones biotecnológicas como la extracción de metales preciosos como el oro en las minas mediante el cianuro producido por bacterias, algas u hongos, con el que se disuelve el oro con alta eficacia y a bajo coste (Arshadi and Mousavi, 2014).

B.- LA SUPERFAMILIA DE LAS METALOTIONEÍNAS (MTs)

B.1. Características generales de las MTs y clasificación

Las metalotioneínas (MTs) constituyen una superfamilia de proteínas citosólicas de bajo peso molecular (2,5 - 8 KDa, 25 - 82 aminoácidos) (Gutiérrez *et al.*, 2011). Éstas son capaces de quelar metales pesados a través de sus numerosos residuos de cisteína (18 -23 Cys organizadas en dominios conservados), cuyos grupos tiol o sulfidrilo (-SH) (muy reactivos) presentan una gran afinidad por los cationes metálicos, a los que son capaces de unirse formando complejos metal-tiolato. En general, las MTs también se caracterizan por su bajo contenido en aminoácidos aromáticos e histidinas (Amaro *et al.*, 2008) (Tabla 1).

La primera MT fue aislada en 1957 del riñón de caballo como una proteína capaz de unir cadmio (Margoshes and Vallee, 1957). Desde entonces, más de 20.000 artículos se han dedicado al estudio de la estructura, bioquímica, características funcionales, estrategias de la

regulación de la expresión génica y patrones tisulares y ontogénicos de las MTs (Capdevila and Atrian, 2011). Se han descrito MTs en multitud de organismos diferentes: en vertebrados (incluyendo el ser humano), en invertebrados (moluscos, artrópodos, equinodermos, nematodos y anélidos), en plantas, en microorganismos eucariotas (hongos, algas y protozoos) y en algunos microorganismos procariontes (α - y γ -proteobacterias, cianobacterias y firmicutes) (Tabla 1) (Capdevila and Atrian, 2011; Gutiérrez *et al.*, 2011).

Tabla 1. Características generales de las 15 familias de MTs

Nº Familia	Organismos	Nº de aminoácidos	% Cys	CCC ¹	Residuos aromáticos	His	Estructura tridimensional (3D) (N _{term} → C _{term}) ²
1	Vertebrados	60-68	32-34	-	0	0-1	Dominio β + Dominio α *
2	Moluscos	64-75	28-30	+	0	0-1	Dominio β + Dominio α ** Algunas isoformas pueden tener más de dos dominios
3	Crustáceos	58-64	30-33	+	0	0	Dominio β + Dominio α *
4	Equinodermos	64-67	29-32	-	0-1	0	Dominio α + Dominio β *
5	Dípteros	40-43	25	-	0	0	Un dominio globular**
6	Nematodos	62-75	25-28	-	0-1	1-4	Dominio β + Dominio α **
7	Ciliados	107-168	22-30	+	0-4	0-2	Dominio β + Dominio α **
8	Hongos 1	25-27	27	-	0	0	Un dominio globular*
9	Hongos 2	63	28,6	-	0	3	
10	Hongos 3	52	30,8	-	1	1	
11	Hongos 4	54-55	16-17	+	1	1-2	
12	Hongos 5	61	19,7	-	2	1	
13	Hongos 6	69	27,5	-	0	2	
14	Procariontes	53-56	11-19	-	1-2	2	Un dominio con α -hélices*
15	Plantas tipo 1	45-75	16-29	-	1-2	0	Dos dominios separados por un segmento de 30-40 aminoácidos*
	Plantas tipo 2	77-81	17-18	-	1-4	0	
	Plantas tipo 3	60-69	15-17	-	1-3	0	
	Plantas tipo 4	76-81	19-21	-	0-1	0-2	

Las MTs se clasifican en 15 familias distintas en función de su estructura primaria. Esta tabla se ha construido teniendo en cuenta la clasificación realizada en 1999 por Binz y Kägi según Capdevila y Atrian (2011), considerando los datos aportados en este último trabajo. ⁽¹⁾ presencia (+) o ausencia (-) de los motivos de cisteína: Cys-Cys-Cys (CCC). ⁽²⁾ los datos sobre las estructuras 3D conocidas actualmente se han obtenido de la base de datos MMDB (*Molecular Modeling Database*) del NCBI y de numerosas publicaciones científicas citadas en el texto. (*) en estas familias existen ejemplos de estructuras de MTs obtenidas de manera experimental mediante resonancia magnética nuclear (RMN) o cristalografía con rayos X. (***) en estas familias sólo se dispone de estructuras de MTs inferidas *in silico*, no obtenidas de manera experimental.

Ante la gran heterogeneidad que existe entre las MTs de los diferentes seres vivos, inicialmente se estableció una clasificación en tres clases en función de la similitud que tuviese cada secuencia con la primera MT descrita en caballo (denominada como hIMT1): a) Clase I: incluye las MTs homólogas a hIMT1, con secuencias similares a ella; Clase II: reúne aquellas secuencias claramente divergentes y no homólogas a hIMT1 y Clase III: incluye las

fitoquelatinas, descritas en plantas y sintetizadas enzimáticamente a partir del glutatión (Fowler *et al.*, 1987). Posteriormente, se observó que esta clasificación era poco precisa ya que en la Clase II se agrupaban todas las MTs que no encajaban en la Clase I, aunque fuesen muy diferentes entre sí y, por esta razón, se estableció una nueva clasificación de las MTs en 15 familias. Cada familia, que suele incluir las MTs de uno de los grupos taxonómicos principales, agrupa a aquellas MTs con secuencias muy similares entre sí y relacionadas filogenéticamente (Tabla 1) (Binz and Kägi, 1999). Sin embargo, la heterogeneidad es tan elevada dentro de las MTs de hongos que éstas se dividen hasta en 6 familias diferentes (familias 8-13) y, en el caso de las MTs de plantas, su gran heterogeneidad queda plasmada en 4 tipos dentro de la familia 15 (Tabla 1).

Finalmente, en los últimos años se ha propuesto una nueva clasificación basada en la funcionalidad molecular de las MTs, que podría complementar la clasificación filogenética previamente expuesta. Dicha clasificación funcional se basa en la preferencia/capacidad de cada MT para formar complejos homometálicos con cationes divalentes (Zn^{2+} o Cd^{2+}) o monovalentes (Cu^+). De esta forma se distinguen dos categorías: Zn-tioneínas (o tioneínas de unión a cationes divalentes) y Cu-tioneínas, que se diferencian entre sí en su patrón de distribución de los residuos de Cys, el número y tipo de residuos intercalados entre ellos o la longitud total de los péptidos (Valls *et al.*, 2001). Entre ambos grupos se distingue una tercera categoría intermedia, a la que pertenecen por ejemplo la isoforma MT-4 de mamíferos y la Crs5 de levaduras, con preferencias ambivalentes de metal (Bofill *et al.*, 2009).

B.2. Estructura de las MTs

Muchos autores afirman que, en general, las MTs no presentan elementos de estructura secundaria (Cobine *et al.*, 2004; Calderone *et al.*, 2005; Isani and Carpenè, 2014). Sin embargo, encontramos α -hélices o láminas β en algunas MTs como en la SmtA de *Synechococcus sp.* (Blindauer *et al.*, 2001), la MT-1 del crustáceo *Callinectes sapidus* (Narula *et al.*, 1995) o la MT-3 humana (Wang *et al.*, 2006) (Fig. 4). Las MTs presentan una estructura tridimensional (3D) desordenada (*random coil*) cuando no se encuentran unidas a metal (apo-metalotioneína) y adquieren su estructura terciaria definitiva como consecuencia de la coordinación/unión de metal a través de sus residuos de Cys (Isani and Carpenè, 2014). De esta forma, la estructura 3D de una MT depende totalmente de la naturaleza y el número de iones metálicos que coordine, pudiendo adoptar distintas estructuras 3D según el complejo MT-metal que forme. Además, la estructura 3D de la MT será la principal responsable de su función e interacción con otras proteínas (Atrian and Capdevila, 2013).

Actualmente se conocen muy pocas estructuras 3D de MTs obtenidas experimentalmente del análisis de formas cristalinas. La primera que se dilucidó fue la de la MT-2 humana (Messerle *et al.*, 1990; PDB Nº 1MHU y 2MHU) y, para ello, se emplearon dos métodos: la resonancia magnética nuclear (RMN) multidimensional/multinuclear y la cristalografía con rayos X (Vasák, 2005). Posteriormente, tras obtenerse la estructura 3D mediante RMN de otras MTs de mamíferos como la MT-2 de rata (Schultze *et al.*, 1988; PDB Nº 1MRT y 2MRT), la MT-2a de conejo (Arseniev *et al.*, 1988; PDB Nº 1MRB y 2MRB) o la MT-1 de ratón (Zangger *et al.*, 1999; PDB Nº 1DFS y 1DFT), se observó que todas ellas presentaban estructuras similares, que

se denominaron estructuras en "yo-yo" (Fig. 4A). La estructura en "yo-yo" se caracteriza por la presencia de dos motivos globulares de diámetros comprendidos entre 15 y 20 Å y denominados α y β , correspondientes (en el caso de las MTs de mamíferos) a los extremos carboxilo y amino terminal, respectivamente. Estos dominios contienen en su interior los residuos de cisteína y, por tanto, las agrupaciones metal-tiolato. Cada metal es secuestrado por cuatro Cys, asumiéndose una distancia Cd-Cys de 2,60 Å (Isani and Carpenè, 2014). En todas las MTs de mamíferos los sitios de coordinación de metal están formados por 20 residuos de Cys, que permiten unir un total de 7 cationes divalentes ($\text{Cd}_7\text{Cys}_{20}$) en dos agrupaciones separadas: el dominio α (extremo carboxilo terminal) presenta 11 Cys y puede unir hasta 4 átomos de metal mientras que el dominio β (extremo amino terminal) contiene 9 Cys y puede unir los 3 átomos de metal restantes (Peroza *et al.*, 2009). Los dos dominios globulares están conectados entre sí mediante una región bastante lineal que contiene 30-31 residuos de lisina (Vasák, 2005) (Fig. 4A).

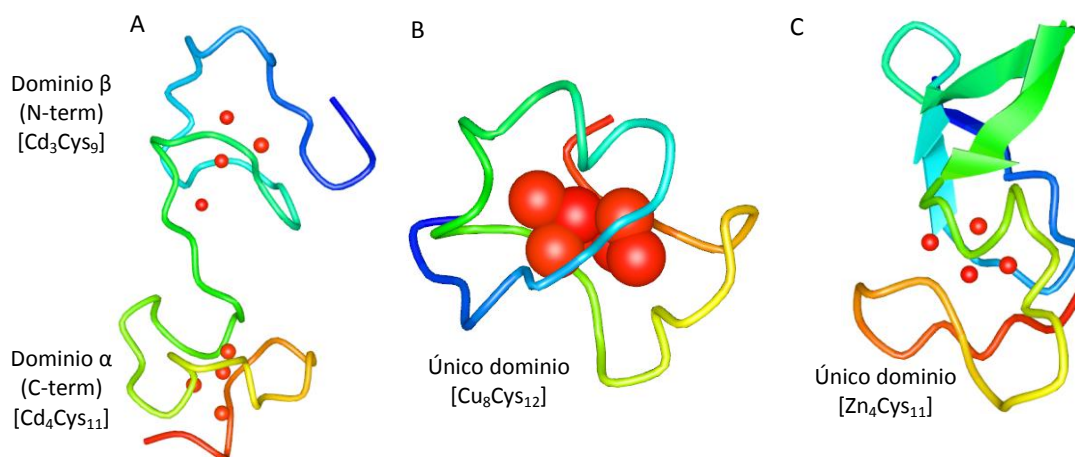


Fig. 4. Ejemplos de estructuras tridimensionales (3D) de MTs de distintos organismos. **(A)** La MT-2 de *Rattus rattus* (PDB N° 4MT2) con una estructura típica en "yo-yo". **(B)** La CuMT CUP1 de *S. cerevisiae* (PDB N° 1AQR), formada por un único dominio globular. **(C)** La SmtA de *Synechococcus sp.* (PDB N° 1JJD) está también formada por un único dominio globular pero destaca la presencia de láminas- β . Estas estructuras 3D se obtuvieron a partir de la base de datos MMDB (*Molecular Modeling Database*) del NCBI. Los cationes metálicos se representan con esferas rojas. Ente corchetes se indica la estequiometría con iones metálicos de cada MT o de cada dominio. N-term: extremo amino-terminal. C-term: extremo carboxilo terminal.

Algunas estructuras 3D de MTs de otros vertebrados no mamíferos también han sido dilucidadas, como es el caso de la MT-nc de *Notothenia coriiceps* (bacalao antártico) (Capasso *et al.*, 2003; PDB N° 1M0J y 1M0J), así como las estructuras de las MTs de tres invertebrados: la MT-1 de *Callinectes sapidus* (el cangrejo azul) (Narula *et al.*, 1995; PDB N° 1DMC, 1DMD, 1DME y 1DMF), la MT-1 de *Homarus americanus* (la langosta americana) (Muñoz *et al.*, 2002; PDB N° 1J5L) o la MT-A de *Strongylocentrotus purpuratus* (el erizo de mar púrpura) (Riek *et al.*, 1999; PDB N° 1QJK y 1QJL). Todas estas estructuras 3D, a pesar de tener un número menor de

Cys (18 residuos) frente a las MTs de mamíferos (20 Cys) y, por tanto, presentar ligeras diferencias en las agrupaciones metal-tiolato, son análogas a las MTs de mamíferos y también muestran una estructura en "yo-yo". Esta estructura en dos dominios también aparece en MTs de plantas, como la MT-1 de *Triticum aestivum* (Peroza *et al.*, 2009; PDB Nº 2L61, 2L62 y 2KAK). Además, según los estudios realizados *in silico* con algunas de las MTs conocidas en ciliados (las MTs del género *Tetrahymena*) y en nematodos, parece que éstas también podrían tener una estructura en "yo-yo" (Gutiérrez *et al.*, 2008; Stürzenbaum, 2009) (Tabla 1). De esta forma, la presencia de agrupaciones metal-tiolato tan similares entre MTs tan distantes evolutivamente pone de manifiesto la importancia de este motivo estructural (Vasák, 2005). Por otro lado, en el molusco *Crassostrea gigas* se ha propuesto un modelo 3D para una CdMT con un dominio α y dos dominios β (Tanguy and Moraga, 2001).

Finalmente, las estructuras de las MTs de hongos filamentosos como *Neurospora crassa* (Cobine *et al.*, 2004; PDB Nº 1T2Y) y de levaduras como *S. cerevisiae* (Peterson *et al.*, 1996; PDB Nº 1AQR) no presentan la estructura en "yo-yo" típica, sino que están formadas por un único dominio globular (Fig. 4B). Esta conformación estructural en un único dominio también parece estar presente en las MTs de dípteros (similares a la CUP1 de *S. cerevisiae*; Capdevila and Atrian, 2011) y de procariontes, como es el caso de la SmtA de *Synechococcus sp.* (PDB Nº 1JJD) (Fig. 4C, Tabla 1).

B.3. Diversidad funcional de las MTs

A pesar de que las MTs se descubrieron hace más de 50 años y que desde entonces se han producido grandes avances en el conocimiento de su estructura, características bioquímicas, distribución y regulación génica, su principal función biológica continua siendo un enigma y es un tema en constante debate (Palmiter *et al.*, 1998; Isani and Carpenè, 2014). Se sabe que las MTs son proteínas multifuncionales que participan en gran variedad de procesos biológicos y, debido a su gran capacidad para la unión de cationes metálicos, se les atribuyen las siguientes funciones básicas: a-) el mantenimiento de la homeostasis de metales esenciales, tales como el Cu^+ o el Zn^{2+} , b-) la protección celular frente a metales tóxicos mediante su secuestro intracelular y c-) la protección indirecta frente a especies reactivas de oxígeno (Vasák, 2005; Díaz *et al.*, 2007).

Muchos autores apoyan la hipótesis de que las MTs han evolucionado para cubrir diversas funciones según las necesidades fisiológicas y ecotoxicológicas de los seres vivos en determinadas circunstancias (Capdevila *et al.*, 2011). Ésta podría ser la razón de que la mayoría de los organismos presenten varias isoformas funcionales de MTs, especializadas en distintas funciones o que actúen en distintas circunstancias o diferentes partes del organismo. Un ejemplo muy claro es el caso de las MTs del ser humano, que presenta hasta 11 isoformas funcionales que se agrupan en cuatro clases distintas: MT1 (MT1A, B, E, F, G, H, M y X), MT2 (también denominada MT2A), MT3 y MT4. Las isoformas de las clases MT1 y MT2 son ubicuas y se inducen en respuesta a numerosos factores (estrés oxidativo, presencia/exceso de metal, etc), participando en los procesos de detoxificación de metales pesados y en el mantenimiento de la homeostasis del Zn^{2+} . La MT3 se sintetiza de manera constitutiva en el sistema nervioso central y se relaciona con el crecimiento neuronal y la regulación del

contenido en Zn^{2+}/Cu^+ . Finalmente, la isoforma MT4 se expresa exclusivamente en el tejido epitelial estratificado, participando en los procesos de proliferación y diferenciación del mismo (Vasák and Meloni, 2011).

Además, estudios recientes sobre las MTs de mamíferos han permitido observar que estas proteínas son capaces de interactuar (mediante un contacto físico directo o a través del intercambio de metal) con multitud de proteínas de diferente naturaleza, tales como: proteínas renales (megalina), proteínas del sistema nervioso central (LPR-1, transtiretina, GTPasa Rab3, creatinina-quinasa, enolasa, aldolasa, piruvato quinasa, actina, tubulina), ferritina, enzimas hidrolíticas, factores de transcripción, albúmina, proteínas relacionadas con el cáncer (p53, NF- κ B o la proteína-quinasa PKC μ), etc. De esta forma, las MTs ya no pueden ser consideradas como simples proteínas capaces de unir/almacenar metal sino que se definen como agentes celulares dinámicos implicados en procesos de neurotransmisión, control del metabolismo celular, regulación de la expresión génica, respuesta frente a distintos tipos de estrés, regulación del ciclo celular y control de gran cantidad de procesos patológicos (neurodegeneración, inflamación y carcinogénesis) (Atrian and Capdevila, 2013).

B.3.1. Utilización de cepas *knockout*/*knockdown* para analizar la función de las MTs

Las cepas *knockout* (KO) son aquellas cepas modificadas genéticamente en las que se ha eliminado por completo y de manera definitiva un gen de interés al sustituirlo mediante recombinación homóloga por otra secuencia o inactivándolo por otro método. En algunos casos, debido al carácter esencial de un gen (necesario para que el organismo pueda vivir), no es posible su eliminación completa pero sí una reducción parcial de su expresión. En este caso nos encontramos ante una cepa *knockdown* (KD), que puede obtenerse mediante el uso de ARNs de interferencia específicos que disminuyen la expresión de un gen concreto. Tanto las cepas *knockout* como las cepas *knockdown* son valiosas herramientas genéticas que nos permiten conocer más acerca de la relevancia y función de un gen al comparar éstas con las cepas silvestres (Capecchi, 1989).

Desde el descubrimiento de la primera MT en el año 1957 se han realizado numerosos estudios para definir las funciones biológicas y toxicológicas de las MTs. Con este fin, entre otras estrategias se han obtenido distintas cepas KO/KD de genes de MTs en distintos organismos. Por ejemplo, en ratón, los KO en los genes MT-I y MT-II se han empleado para el estudio de las MTs frente a la toxicidad provocada por distintos compuestos, tales como el cadmio (Klaassen and Liu, 1998), el plomo (Waalkes *et al.*, 2004) o el paracetamol, que se relaciona con daños por estrés oxidativo y hepatotoxicidad (Liu *et al.*, 1999). Estos ratones KO también se han empleado para conocer más sobre el papel de las MTs como moléculas señaladoras o indicadoras de peligro en los procesos inflamatorios (Devisscher *et al.*, 2014) o como moléculas neuroprotectoras ante posibles daños en el sistema nervioso central (West *et al.*, 2008).

En el nematodo *Caenorhabditis elegans*, que contiene dos genes (*mtl-1* y *mtl-2*) que codifican MTs, se han obtenido además de KO simples (uno para cada gen) un doble KO al anular por completo ambos genes. En estos mutantes se observa que, independientemente de

la presencia de Cd, aunque la viabilidad del organismo no se ve afectada, la delección de estos genes sí que disminuye el crecimiento volumétrico del mismo y su capacidad reproductora (Hughes and Stürzenbaum, 2007). Algo similar se observa en *Drosophila melanogaster*, organismo en el que se han eliminado los cuatro genes de MTs (*MtnA*, *MtnB*, *MtnC* y *MtnD*), mediante procesos de recombinación homóloga, tanto de manera independiente afectando a un solo gen como combinando las mutaciones, hasta incluso obtener un organismo KO en el que se han inactivado por completo estos cuatro genes (Egli *et al.*, 2006). Las moscas mutantes son viables y fértiles pero más sensibles a las elevadas concentraciones de cobre o cadmio. La comparación de unas cepas KO con otras ha permitido definir al gen *MtnB* como el gen más relevante en la defensa frente a Cd²⁺ mientras que el gen *MtnA* es el de mayor importancia en la defensa frente a cobre (Egli *et al.*, 2006).

En definitiva, la utilización de cepas *knockout* ha permitido profundizar enormemente en el conocimiento sobre la funcionalidad de las MTs. Además, debido a que todas las cepas *knockout* obtenidas hasta hoy para genes MTs son viables, se considera que las MTs no son esenciales para la supervivencia del organismo, independientemente de la situación de estrés a la que se encuentre sometido. Por tanto, aunque la expresión de las MTs aporta una serie de ventajas fisiológicas y evita la aparición o el desarrollo de diversas patologías, su ausencia normalmente es suplida o compensada por otras isoformas génicas de MTs (si no están todas anuladas), otras moléculas queladoras (fitoquelatinas) u otros genes de respuesta a metal como los genes *cdr*, que responden frente a la presencia de Cd²⁺ en *C. elegans* (Hughes and Stürzenbaum, 2007).

B.4. Regulación de la expresión de los genes codificantes de MTs

B.4.1. Regulación a nivel transcripcional

Aunque la mayoría de los genes MTs presentan cierto nivel de expresión en condiciones basales (en mayor o menor medida en función de cada organismo e isoforma génica), la expresión de los genes MTs se induce por una gran variedad de estímulos, tales como: metales pesados, agentes oxidantes y citotóxicos, hormonas, agentes inflamatorios y citoquinas, factores de crecimiento, antibióticos, radiaciones y otros factores que son interpretados por la célula como señales de estrés (Haq *et al.*, 2003). Además, sus niveles de expresión se modifican durante los procesos de diferenciación celular, las fases de desarrollo del organismo (Andrews *et al.*, 1991), el envejecimiento y algunos procesos patológicos como el cáncer (Miles *et al.*, 2000; Takahashi, 2015), la enfermedad de Crohn, el Alzheimer, la esclerosis lateral amiotrófica o las enfermedades de Wilson o de Menkes (desórdenes en el mantenimiento de la homeostasis del cobre) (Laukens *et al.*, 2009).

La regulación de la expresión de las MTs ocurre principalmente a nivel transcripcional mediante la presencia de elementos de respuesta o elementos *cis* en la región promotora, a los que se pueden unir distintos factores de transcripción. Además de las clásicas cajas TATA y las regiones de iniciación de la transcripción, los promotores de las MTs presentan, entre otros motivos inductores de la expresión, los siguientes elementos: los elementos de respuesta a

metal (MREs), los elementos de respuesta antioxidante (AREs) y los elementos de respuesta a glucocorticoides (GREs) (Günther *et al.*, 2012) (Fig. 5).

Los MREs (elementos de respuesta a metal) fueron descritos por primera vez en la región promotora de la MT-1 de ratón. Estos motivos normalmente se encuentran en multicopia y presentan la siguiente secuencia consenso: TGC(G/A)CNC, siendo N cualquier nucleótido (Stuart *et al.*, 1985). Además, los MREs parecen estar implicados tanto en la expresión basal como en la activación de la transcripción de los genes MTs en respuesta a metales pesados y agentes causantes de estrés oxidativo (Haq *et al.*, 2003). En 1988 se identificó el factor de transcripción MTF-1 (factor-1 de transcripción de respuesta a metales), indispensable para la inducción de la expresión de las MTs en respuesta a metales pesados (Heuchel *et al.*, 1994) y capaz de unirse a los elementos MREs en presencia de elevados niveles de Zn^{2+} (Westin and Schaffner, 1988). Este factor de transcripción, además de su papel en los procesos de homeostasis, detoxificación de metales pesados y protección frente a situaciones de estrés oxidativo e hipoxia, también parece ser importante para el desarrollo embrionario del hígado en mamíferos (Wang *et al.*, 2004). El factor MTF-1 aparece conservado desde insectos a mamíferos y ha sido caracterizado en el ser humano, los roedores ratón y carpincho, algunos peces (el pez globo, la trucha o el pez cebra) y *Drosophila* (Dalton *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2002; Cheung *et al.*, 2010; Lindert *et al.*, 2008). También se han encontrado ortólogos del gen *MTF-1* en el genoma de otros vertebrados e invertebrados (Günther *et al.*, 2012).

El gen *MTF-1* se expresa de manera constitutiva y, ante una situación de estrés, la proteína se traslada del citoplasma al núcleo, activándose y uniéndose a los motivos MREs de los promotores de los genes MTs, regulando su transcripción mediante interacciones directas o indirectas con distintos componentes de la maquinaria transcripcional de la ARN polimerasa II. Existen varios modelos que intentan explicar cómo tiene lugar la activación del factor MTF-1. En presencia de Zn^{2+} , metal requerido ya que este factor presenta en su región N-terminal 6 dominios en dedos de Zn^{2+} (Radtke *et al.*, 1993), algunos autores piensan que este metal activaría directamente al factor MTF-1, produciendo un cambio en su conformación y favoreciendo su unión a los elementos MREs de los genes MTs (Haq *et al.*, 2003). Sin embargo, para el resto de metales (incapaces de activar de manera directa al factor MTF-1), deberían plantearse otras vías alternativas de activación del MTF-1. Según el modelo propuesto en mamíferos, los metales tóxicos podrían desplazar al Zn^{2+} de proteínas intra- o extracelulares, causando de manera indirecta un aumento considerable del contenido de Zn^{2+} libre, que estaría disponible y activaría al factor de transcripción MTF-1 tal y como se ha explicado previamente (Koropatnick, 2000; Zhang *et al.*, 2003) (Fig. 5). Otros autores han propuesto un modelo de activación del MTF-1 basado en el aumento de sus niveles de fosforilación. En este caso, podría explicarse su activación independientemente del metal o la condición de estrés (estrés oxidativo, radiaciones) presente en el medio. Se cree que participan complejas rutas de transducción que incluyen, entre otras, la proteína quinasa C, la fosfoinositol-3-quinasa, la c-jun N-terminal quinasa, la tirosina-quinasa, la caseína-quinasa II o la señalización por calcio (Saydam *et al.*, 2002) (Fig. 5).

Además de la posible activación del factor MTF-1, la presencia de algunos metales (como el Cd^{2+}) puede activar la transcripción de los genes MTs mediante los elementos ARE como

consecuencia de la inducción de estrés oxidativo y la formación de radicales libres y ROS. Los elementos ARE (elementos de respuesta antioxidante) presentan la siguiente secuencia consenso: TGACNNNGC, a la que se une el factor de transcripción Nrf-2 (Nguyen *et al.*, 2003) (Fig. 5). Un ejemplo de la presencia de un elemento ARE la encontramos en el promotor de la MT-1 de ratón, que se implica en la inducción de la expresión de dicha MT en respuesta a la presencia de Cd^{2+} o H_2O_2 (Andrews, 2000).

Otras secuencias reguladoras involucradas en la expresión de genes MTs son las secuencias GRE (elementos de respuesta a glucocorticoides). Las hormonas glucocorticoides y la IL-6 (interleukina-6) aumentan sus niveles en respuesta a procesos infecciosos, situaciones de estrés físico o fisiológico o reacciones inflamatorias. Estas hormonas entran al interior celular y se unen a sus receptores citoplásmicos (GR), favoreciendo la formación de homodímeros y la activación de los mismos. Posteriormente, los receptores GR activos se desplazan al interior del núcleo y se asocian a las secuencias GRE, activando la transcripción de los genes MTs (Fig. 5). Estos elementos GRE aparecen en las regiones promotoras de genes MTs de mamíferos (Di Croce *et al.*, 1999).

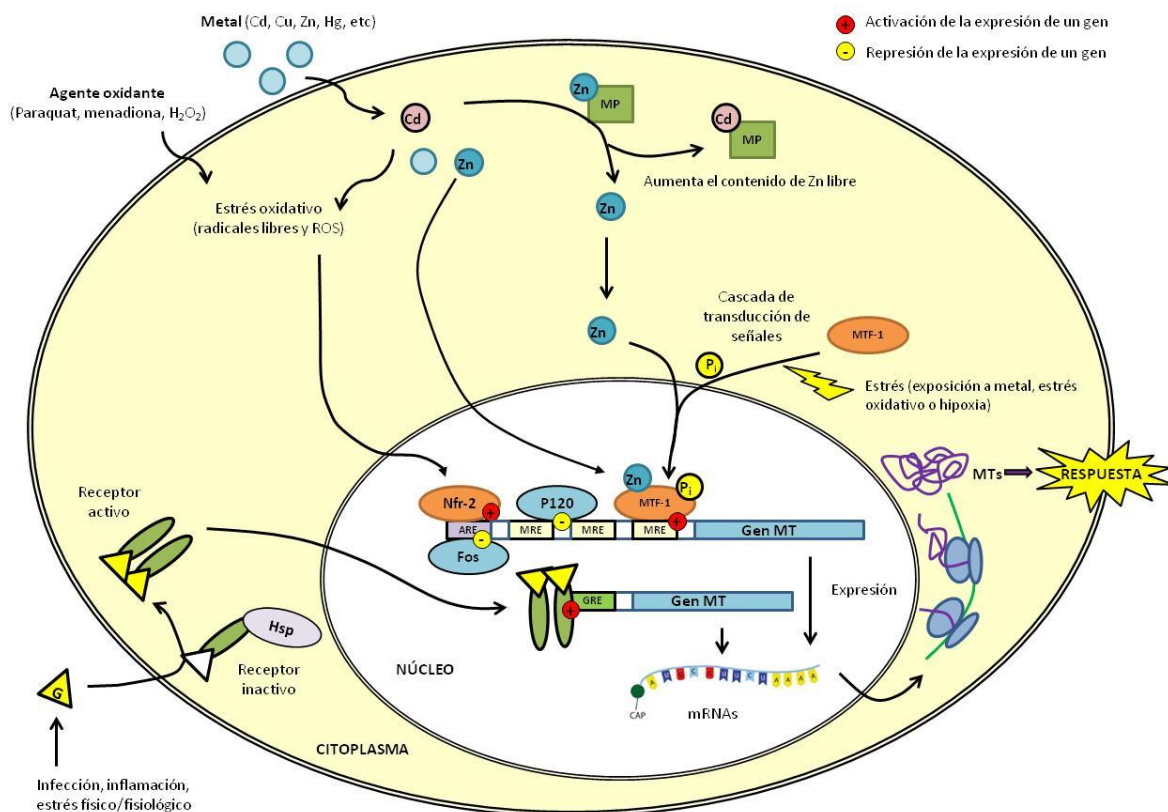


Fig. 5. Principales sistemas de inducción/represión de la transcripción de los genes codificantes de metalotioneínas (MT). MP: proteína reguladora de la concentración citoplasmática de metal. MRE: elemento de respuesta a metal. ARE: elemento de respuesta antioxidante. GRE: elemento de respuesta a glucocorticoides. G: hormona glucocorticoide. Hsp: proteína de choque térmico (inactiva los receptores de hormonas glucocorticoides).

Finalmente, en los promotores de genes MTs de algunos organismos también se han identificado distintos sitios de unión de factores GATA ([A/T]GATA[A/G]), como en el nematodo *Caenorhabditis elegans* (Moilanen *et al.*, 1999), AP-1 (TGA[G/C]TCA) (Jenny *et al.*, 2006; Gutiérrez *et al.*, 2011) y cajas GC (GGGGCGGGG), a la que se unen factores de transcripción con dedos de Zn de la familia Sp/XKLF como SP1 (Haq *et al.*, 2003), y que participan en la expresión basal de genes MTs. Por otro lado, además de todos los elementos que participan en los procesos de activación de la transcripción de los genes MTs, también se han descrito elementos represores que interactúan con las proteínas reguladoras como son Fos y Fra-1 (supresores mediante elementos ARE) (Haq *et al.*, 2003) o la proteína PZ120 (descrita en la MT-2 humana) que se une específicamente a la región de iniciación de la transcripción mediante dedos de Zn (Tang *et al.*, 1999; Takahashi, 2015).

B.4.1.1. La superfamilia de factores de transcripción bZIP: la familia AP-1

Los factores de transcripción (FT) pertenecientes a la superfamilia bZIP (*basic region leucine zipper*) presentan un especial interés en esta tesis doctoral, ya que se han relacionado con la regulación a nivel transcripcional de los genes MTs del género *Tetrahymena* (Díaz *et al.*, 2007).

Los factores bZIP han sido descritos en todos los organismos eucariotas analizados hasta el momento. Algunos de ellos como Jun/Fos o CREB han sido ampliamente estudiados en animales y sirven como modelos para comprender las interacciones ADN-FT, la formación de la estructura ternaria o las posibles modificaciones post-traduccionales que estos factores pueden experimentar (Jakoby *et al.*, 2002). La importancia de los factores bZIP radica en su multifuncionalidad y en su participación en múltiples procesos biológicos. Además, destaca su papel clave en la respuesta frente a diferentes situaciones de estrés, tales como: la presencia de un patógeno, condiciones de temperatura u osmolaridad extremas, una elevada salinidad, la detección de sustancias tóxicas en el medio, etc. (Sornaraj *et al.*, 2016).

A pesar de que la superfamilia de factores bZIP es muy amplia y engloba a diferentes tipos de FT, todos ellos se caracterizan por presentar en su estructura el dominio bZIP, compuesto por dos motivos diferenciados contiguos entre sí: a) una región básica formada por unos 16 aminoácidos que permite la unión del FT con la cadena de ADN; ésta contiene una señal de localización nuclear seguida por el motivo conservado N-X₇-R/K (donde N: Asparagina, R: Arginina, K: Lisina y X: cualquier aminoácido) y b) una hélice anfipática formada por 7 residuos de leucina localizados cada 6 aminoácidos exactamente. Los factores bZIP deben dimerizar entre sí (formando las estructuras conocidas como "cremalleras de leucina") para poder unirse a las moléculas de ADN. De esta forma, pueden formar tanto homo- como heterodímeros en función de los fenómenos de atracción/repulsión electrostática existentes entre los residuos polares de las regiones hidrofóbicas de las hélices de leucina (Jakoby *et al.*, 2002).

Dentro de la superfamilia bZIP, distinguimos la familia AP-1 (*activating protein-1* = proteína de activación-1). Los factores AP-1 son formas homo- o heterodiméricas que pueden estar compuestas por factores Jun (v-Jun, c-Jun, JunB, JunD), Fos/Fra (v-Fos, c-Fos, FosB, Fra1, Fra2), ATF (ATF2, ATF3/LRF1, B-ATF), Maf (v-Maf, c-Maf, MafB, MafF, MafG, MafK y Nrl) o JDP (JDP1 y JDP2). Todos los factores AP-1 se caracterizan porque se unen a las moléculas de ADN

mediante dos posibles elementos de respuesta: el elemento TRE (TPA (12-O-tetradecanoato-13-acetato)-*responsive element*) que tiene la secuencia consenso **TGACTCA** y el elemento CRE (cAMP-*responsive element*) cuya secuencia consenso es **TGACGTCA** (Karin *et al.*, 1997). Los factores AP-1 están implicados en la regulación de genes relacionados con la respuesta a diversos estímulos (citoquinas, factores de crecimiento, distintas condiciones de estrés e infecciones virales o bacterianas) y participan en el control de múltiples procesos celulares como la diferenciación, la proliferación o la apoptosis. Los factores AP-1 se inducen, a su vez, por diferentes agentes estresantes (metales, citoquinas, H₂O₂, etc.) a través de una cascada de señalización celular en la que están implicadas, entre otras, las MAP quinasas JNK, ASK1 y p38 (Valko *et al.*, 2005). La regulación de la expresión y la activación de los factores AP-1 es bastante compleja y depende tanto de la composición del dímero formado como de las diferentes modificaciones post-traduccionales que pueden experimentar o de su interacción con proteínas específicas (proteína-quinasas, coactivadores transcripcionales, etc.) (Kappelmann *et al.*, 2014). Todos estos factores determinan la estabilidad y la especificidad de unión de cada factor AP-1 a un determinado promotor (Schütze *et al.*, 2008).

El estudio de los factores AP-1 presenta un especial interés en este trabajo ya que existen numerosas publicaciones que relacionan la activación de estos factores de transcripción con las metalotioneínas (MTs) ante diferentes situaciones de estrés (estrés oxidativo y estrés por metales). Por ejemplo, en células de mamífero, Braithwaite y colaboradores (2010) detectaron un aumento considerable de la expresión del gen *MT-1* tras el tratamiento de las células con el inductor de estrés oxidativo HNE (4-hidroxinonenal), y este aumento de *MT-1* está correlacionado con un aumento de la actividad AP-1. Igualmente, Mattie y colaboradores (2008) detectaron un aumento de los niveles de expresión de los genes *MT-1*, *c-fos* y *c-jun* así como un aumento considerable de la unión de los factores AP-1 a sus correspondientes secuencias consenso tras el tratamiento con cobre durante 4h.

B.4.2. Regulación a nivel post-transcripcional

Como se ha comentado previamente, las MTs se regulan principalmente a nivel transcripcional pero también las modificaciones post-transcripcionales presentan una gran importancia, pues establecen una relación entre los niveles de ARN mensajero y los niveles de proteína que existen en una determinada situación (Haq *et al.*, 2003). Además, algunas de las señales presentes en las regiones 3'UTR de los ARNm de las MTs son claves para definir la longevidad del transcrito o su localización celular. Un ejemplo se observa en el ARNm de la *MT-1* de ratón, que generalmente se localiza en el citoplasma perinuclear gracias a la presencia de señales en su región 3'UTR (Hesketh, 2004).

Además, se ha observado en algunas MTs la existencia de procesamientos post-traduccionales que eliminan una parte de la proteína, originándose una proteína funcional más pequeña. Por ejemplo, esta posibilidad se ha descrito en la CdMT MTT1 de *T. thermophila*, en la que se ha detectado un procesamiento post-traduccional en el extremo amino terminal con la eliminación de los dos primeros aminoácidos por una potencial peptidil-proteasa (Dondero *et al.*, 2004).

B.4.3. Regulación epigenética

La expresión de los genes codificantes de MTs también se ve afectada por eventos epigenéticos, tales como: la variación en el nivel de condensación de la cromatina, la modificación post-traducciona l de histonas o la metilación del ADN (Haq *et al.*, 2003).

Las denominadas islas CpG se definen como regiones del ADN ricas en el dinucleótido GC. Éstas pueden ser metiladas por acción de las enzimas ADN-metiltransferasas (Dnmts) con el fin de favorecerse el silenciamiento de determinados genes. De esta forma, los procesos de metilación del ADN pueden inhibir la transcripción mediante diferentes mecanismos, tales como: la inhibición de la unión de factores activadores de la transcripción o el reclutamiento de factores represores de la transcripción. Un ejemplo de este tipo de regulación de la expresión se observa en el gen codificante de la MT-1 humana, en el que se reprime su transcripción mediante la metilación de islas CpG durante los procesos de diferenciación celular (Takahashi, 2015).

También se puede alterar la estructura de la cromatina y, por tanto, la expresión de determinados genes, mediante la modificación post-traducciona l de histonas. Un ejemplo son los procesos de acetilación/desacetilación y metilación de histonas que afectan a la región promotora del gen *MT-3* de ratón (Karpf and Jones, 2002; Wang *et al.*, 2012) en respuesta a la presencia de Cd²⁺.

B.5. Las MTs de ciliados: características generales, clasificación y peculiaridades estructurales

La bioacumulación de metal ha sido descrita en varios grupos de ciliados (Díaz *et al.*, 2007). Sin embargo, aunque se atribuye a las MTs el papel principal en este proceso de detoxificación, éstas sólo han sido identificadas en dos géneros: *Tetrahymena* y *Paramecium* (Gutiérrez *et al.*, 2011). *PMCd1* es el único gen codificante de una presumible MT que ha sido descrito en *Paramecium sp.*, con características muy distintas a las de los genes de MTs de *Tetrahymena sp.* (Shuja and Shakoori, 2009). Además, aún no se han llevado a cabo estudios sobre la expresión de este gen bajo estrés por metal, por lo que aún no se puede estar seguro de que se trate de una verdadera MT. Por lo tanto, en este trabajo sólo se tendrán en cuenta las MTs del género *Tetrahymena*.

Las MTs de ciliados se incluyen en la familia 7 que, a su vez, se subdivide en dos subfamilias: 7a o CdMTs y 7b o CuMTs. Ambas subfamilias se distinguen principalmente por sus patrones de residuos de cisteínas y por su inducción preferente por cadmio/zinc o cobre, respectivamente (Díaz *et al.*, 2007). La primera CdMT de ciliados (la MT-1 de *T. pyriformis*) fue identificada en 1994 y el gen que la codifica se secuenció en 1999 (Piccinni *et al.*, 1994; Piccinni *et al.*, 1999). A partir de entonces, se ha incrementado considerablemente nuestro conocimiento sobre las MTs del género *Tetrahymena* y actualmente (antes de publicar parte de los resultados de esta tesis) se conocen 14 CdMTs y 7 CuMTs entre las diferentes especies. Estas MTs se pueden, igualmente, agrupar en base a los dos principales grupos filogenéticos

del género *Tetrahymena* definidos según la secuencia del ARNr 18S: grupo "borealis" y grupo "australis" (Chantangsi and Lynn, 2008) (Fig. 6).

Uno de los puntos en que difieren las Cd- y las CuMTs de *Tetrahymena* es en su patrón de residuos de cisteínas. Las CdMTs se caracterizan por contener, además de las agrupaciones de Cys clásicas (XCCX, CXC o XXCCX, donde "C" es cisteína y "X" es cualquier otro aminoácido), otras agrupaciones casi exclusivas de esta subfamilia 7a, como son: CCC, CXCC y CXCXC. Sin embargo, estas agrupaciones prácticamente no aparecen en las CuMTs (subfamilia 7b). De esta forma, CCC y XCCX son las agrupaciones mayoritarias para las CdMTs, mientras que CXC es la agrupación predominante en las CuMTs de este ciliado (Gutiérrez *et al.*, 2011).

Además, las CdMTs de *Tetrahymena* (subfamilia 7a) presentan una estructura modular/submodular, definida según un patrón de cisteínas característico. En base a ello podemos encontrar CdMTs con una estructura bimodular (TpyrMT-1, TpigMT-1, TtheMTT5, ThegMT1, TrosMTT1), trimodular (TtheMTT1, TtheMTT3, TmobMT1, TvorMT1, TtroMTT1, ThegMT3), tetramodular (ThegMT2, ThegMT4) o incluso pentamodular, como es el caso de TpyrMT-2 (181 aa). Por otro lado, las CuMTs carecen de esta estricta estructura modular, aunque se aprecian en ellas repeticiones del motivo CKCX₍₂₋₅₎CXC, donde en algunas ocasiones la lisina (K) es sustituida por otros aminoácidos. La conservación de este patrón repetido de cisteínas en las CuMTs así como la estructura en módulos y submódulos de las CdMTs parecen indicar que la duplicación génica ha sido uno de los principales mecanismos implicados en la generación y evolución de las MTs (Gutiérrez *et al.*, 2009).

GRUPO "BOREALIS"	GRUPO "AUSTRALIS"
<i>T. pyriformis</i> : TpyrMT-1, TpyrMT-2 ●	<i>T. pigmentosa</i> : TpigMT-1 ●
<i>T. thermophila</i> : TtheMTT1, TtheMTT3, TtheMTT5 ●	TpigMT-2 ●
TtheMTT2, TtheMTT4 ●	<i>T. hegewischi</i> : ThegMT1, ThegMT2 ●
<i>T. rostrata</i> : TrosMTT1 ●	ThegMT3, ThegMT4 ●
TrosMTT2 ●	
<i>T. tropicalis</i> : TtroMTT1 ●	
TtropMT1, TtropMT2 ●	
<i>T. mobilis</i> : TmobMT1 ●	
<i>T. vorax</i> : TvorMT1 ●	
<i>T. farahensis</i> : TfCuMT ●	

Fig. 6. MTs del género *Tetrahymena*, en el que las diferentes especies se incluyen en dos grupos según la filogenia del ARNr 18S: "australis" y "borealis". En cada una de las especies, las CdMTs se indican con un círculo verde y las CuMTs con un círculo amarillo.

Las MTs de *Tetrahymena* son de especial interés porque presentan una serie de peculiaridades frente a las MTs clásicas descritas en otros organismos (Tabla 2). En primer lugar, las MTs de *Tetrahymena* destacan por su excepcional longitud (78-193 aa), muy superior a la de las MTs de vertebrados (25-82 aa). Esta mayor longitud se corresponde con un mayor contenido total en residuos de cisteínas: 22-54 Cys frente a las 7-21 Cys que presentan las MTs

de vertebrados. Sin embargo, a pesar de que el contenido total de Cys es mayor en las MTs de *Tetrahymena*, en ambos casos se mantiene un porcentaje similar de este aminoácido (16-32%) independientemente de su longitud. Debido a su mayor contenido en residuos de Cys las MTs de *Tetrahymena* presentan una mayor capacidad teórica de quelación de metal (Tabla 2), calculada según la estequiometría definida en vertebrados ($Cd_6(Cys)_{20}$ para las CdMTs y $Cu_{12}(Cys)_{20}$ para las CuMTs) que considera que todos los residuos de Cys están implicados en la unión de metal (Klaassen *et al.*, 1999). Además, se ha comprobado que algunos de estos datos teóricos coinciden con los experimentales obtenidos para algunas MTs de *T. thermophila* (Espart *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2011) y *T. pyriformis* (Domenech *et al.*, 2008).

Tabla 2. Comparación de las principales características entre las MTs de *Tetrahymena* y las MTs clásicas

CARACTERÍSTICAS	MTs clásicas ⁽¹⁾	MTs de <i>Tetrahymena</i>
Tamaño (nº aminoácidos)	25-82 aa	78-193 aa
Nº residuos Cys	7-21 Cys	22-54 Cys
Aminoácidos aromáticos e His	Presentes en algunos organismos (Tabla 1)	Presentes ocasionalmente
Capacidad de unión de Cd en las CdMTs	7 átomos Cd/ molécula	8-19 átomos Cd/ molécula
Capacidad de unión de Cu en las CuMTs	12 átomos de Cu/ molécula	13-19 átomos Cu/ molécula

⁽¹⁾ principalmente MTs de vertebrados

Tabla 3. Presencia/ausencia de intrones en las 15 familias de MTs

Nº Familia	Organismos	Nº exones	Nº intrones
1	Vertebrados	3 ⁽¹⁾	2 ⁽¹⁾
2	Moluscos	3	2
3	Crustáceos	3	2
4	Equinodermos	3	2
5	Dípteros	2	1
6	Nematodos	2	1
7	Ciliados	1	0 ⁽²⁾
8-13	Hongos	2 ⁽³⁾	1 ⁽³⁾
8-13	Levaduras	1	0
14	Procariotas	1	0
15	Plantas	3 ⁽⁴⁾	2 ⁽⁴⁾

⁽¹⁾ El gen MT descrito en el pez *Tanichthys albonubes* (neón chino) presenta 2 exones y 1 intrón. ⁽²⁾ El gen *MTT5* de *T. thermophila* tiene un intrón en su región 3'UTR aunque no se ha detectado ningún intrón en la ORF. ⁽³⁾ La tendencia general es que los genes MTs de hongos filamentosos presenten 2 exones y 1 intrón pero existen excepciones: en *Agaricus bisporus* y *Microsporium canis* tienen 3 exones y 2 intrones y los genes *MT1* y *MT2* de *Hebeloma mesophaeum* tienen 4 exones y 3 intrones. ⁽⁴⁾ Existen excepciones con 2 exones y 1 intrón en el gen MT de *Triticum turgidum*, *MT1a* de *Hordeum vulgare* o *MT2* de *Eleusine indica*.

Al igual que en algunos organismos (Tabla 1), las MTs de *Tetrahymena* a veces contienen aminoácidos aromáticos (Phe>Tyr>Trp) e histidina. Este último aminoácido solo está presente en una CdMT (TtheMTT3) y en cuatro CuMTs (TtheMTT2, TtheMTT4, TtropMT2 y TfCuMT) (Gutiérrez *et al.*, 2011; Chang *et al.*, 2014; Zahid *et al.*, 2016). Finalmente, los genes que

codifican las MTs de la mayoría de los organismos (vertebrados, moluscos, crustáceos, equinodermos o plantas) presentan una organización genómica muy conservada con tres exones y dos intrones (Isani and Carpenè, 2014) o, en otros casos con dos exones y un intrón, como los genes de MTs de dípteros, nematodos y hongos. Por el contrario, los genes MTs de *Tetrahymena* carecen de intrones, al igual que ocurre con genes MTs de levaduras y procariotas, favoreciéndose así una respuesta más rápida frente a una situación de estrés ambiental (Tabla 3).

B.5.1. Las MTs de *Tetrahymena thermophila*: características generales, estudios de expresión y regulación génica

En *T. thermophila* existen un total de cinco isoformas de MTs: 3 CdMTs, denominadas MTT1, MTT3 y MTT5 y dos CuMTs, conocidas como MTT2 y MTT4 (Díaz *et al.*, 2007). Sus principales características aparecen recogidas en la Tabla 4.

Tabla 4. Principales características de las cinco isoformas de MTs de *T. thermophila*

MT	Longitud (aa)	Peso molecular (KDa)	Cys totales	% Cys	Capacidad real ⁽¹⁾ y (teórica) de quelación	Nº Histidinas	Nº acceso GenBank
MTT1	162	16,7	48	29,6	17 (17) Cd ²⁺	0	DQ517937
MTT3	162	17,3	42	25,9	(15) Cd ²⁺	2	EF195744
MTT5	99	10,9	24	24,2	8 (8) Cd ²⁺	0	DQ517936
MTT2	108	11,1	32	29,6	20 (19) Cu ⁺	1	AY204351
MTT4	108	11,2	32	29,6	20 (19) Cu ⁺	1	AY660008

⁽¹⁾ Datos de la capacidad real de quelación obtenidos de Espart *et al.*, 2015.

En cuanto a su localización cromosómica en el micronúcleo de *T. thermophila*, los genes *MTT1* y *MTT3* (con un 79,6% de identidad entre sus secuencias nucleotídicas) se sitúan en el brazo izquierdo del cromosoma 4 metacéntrico, separados únicamente por 1,7 Kb. El gen *MTT5* se localiza en el cromosoma 5 telocéntrico y los genes *MTT2* y *MTT4* se encuentran en el brazo derecho del cromosoma 2 metacéntrico, separados por 1,4 Kb (Fig. 7). Estos últimos genes, que posiblemente surgieron por un proceso de duplicación génica en tándem, presentan entre sus secuencias nucleotídicas un 98% de identidad (Gutiérrez *et al.*, 2011) y, por tanto, es imposible diseñar cebadores específicos para cada uno de ellos y poder diferenciarlos mediante ensayos de PCR. En el caso de los genes codificantes de CdMTs se han realizado estudios de expresión mediante técnicas de RT-PCR cuantitativa tras el tratamiento de los cultivos celulares con distintos agentes estresantes: metales, agentes oxidantes, estrés térmico, cambios de pH y condiciones de inanición (Díaz *et al.*, 2007). Se observa que estas tres isoformas génicas presentan un patrón de expresión diferente y, por tanto, probablemente se les puedan atribuir distintas funciones.

El gen *MTT5* es el más inducible de los tres, siendo el que mayores niveles de expresión presenta en todos los tratamientos ensayados y el que responde a un mayor número de

agentes estresantes. Este hecho se podría explicar teniendo en cuenta que el gen *MTT5* presenta una duplicación interna de 416 pb en su región promotora y, por tanto, tiene un mayor número de secuencias presumiblemente reguladoras de la transcripción (13 motivos MTCM1) (Díaz *et al.*, 2007) (Fig. 7). Por el contrario, el gen *MTT3* es el que presenta menores niveles de inducción en general, y también es el que tiene el menor número de motivos MTCM1 entre las tres isoformas de Cd/ZnMT presentes en este ciliado. De esta forma, se ha establecido el siguiente ranking de inducción para estos genes de CdMTs: *MTT5* >> *MTT1* > *MTT3* (Díaz *et al.*, 2007). Los genes *MTT1* y *MTT3* presentan un patrón de inducción muy similar ante los mismos agentes estresantes aunque *MTT3* suele alcanzar, en general, menores niveles de expresión. *MTT1* se induce predominantemente en presencia de Cd²⁺ (tratamientos 1 y 24h), *MTT3* alcanza sus mayores niveles de inducción tras el tratamiento con Cd²⁺ (24h) o Zn²⁺ (1h) y *MTT5* se induce preferentemente ante la presencia de Pb²⁺ (24h), Cd²⁺ (1 y 24h) o As⁵⁺ (24h) (Díaz *et al.*, 2007). Según estos estudios de expresión *MTT1* y *MTT5* se han considerado MTs relacionadas con los procesos de detoxificación de metales (Gutiérrez *et al.*, 2011). Esta afirmación ha sido corroborada mediante el análisis de dos cepas recombinantes de *T. thermophila*: *pVGF::MTT1* y *pVGF::MTT5* (Amaro *et al.*, 2014), que presentan en su citoplasma múltiples copias de las construcciones plasmídicas P_{MTT1}::GFP::MTT1 ó P_{MTT1}::GFP::MTT5. Estas cepas sobre-expresan las proteínas *MTT1* ó *MTT5*, respectivamente y, por tanto, son mucho más resistentes a la presencia de Cd²⁺ (Amaro *et al.*, 2014). Por otro lado, la isoforma *MTT3* parece estar implicada en la homeostasis del zinc, ya que su expresión se induce considerablemente en presencia de este metal y además presenta dos histidinas en su secuencia aminoacídica, que aumentan la afinidad de la proteína por este metal esencial (Gutiérrez *et al.*, 2011).

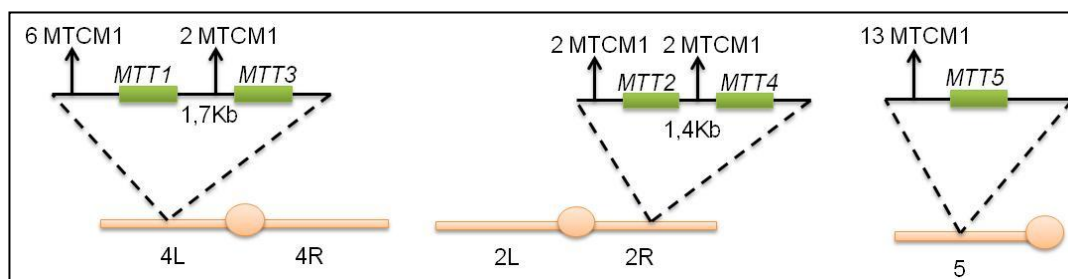


Fig. 7. Esquema de la localización cromosómica de cada uno de los genes codificantes de MTs en *T. thermophila*. L: brazo izquierdo del cromosoma. R: brazo derecho del cromosoma. En la región promotora de cada uno de ellos se indica el número de motivos conservados MTCM1.

Conocemos muy poco sobre la regulación de la expresión de los genes MTs en *T. thermophila*. No se han identificado elementos MREs, AREs o GREs en sus regiones promotoras (comentados en el apartado B.4.1.), pero sí se han identificado unos nuevos motivos conservados en todos los promotores de estos genes, que se han denominado MTCM1 (*Metallothionein Conserved Motif 1*) (Díaz *et al.*, 2007) (Fig. 7). El gen *MTT1* presenta 6 motivos MTCM1 en su promotor, *MTT3* tiene sólo 2 y *MTT5* contiene hasta 13 motivos MTCM1 en su región promotora (Díaz *et al.*, 2007) (Fig. 7). Los motivos MTCM1 presentan la secuencia

consenso: GTGTGAATCATGAGT, muy similar a las secuencias de unión de los factores de transcripción eucariotas del tipo AP-1 (TGA[G/C]TCA) (Shaulian and Karin, 2002). Estos factores de transcripción, pertenecientes a la superfamilia bZIP, se relacionan en *S. cerevisiae* con la regulación de la expresión de genes que responden al estrés por metales y estrés oxidativo (Wu *et al.*, 1993). Igualmente, factores de transcripción similares a AP-1 han sido identificados como reguladores de la expresión de genes MTs en *D. melanogaster* o en el molusco *C. virginica* (Jenny *et al.*, 2006).

C.- ADAPTACIÓN DE LOS SERES VIVOS A LA PRESENCIA DE METALES

C.1. Adaptación vs aclimatación: comparación de conceptos

Actualmente no existe una diferenciación clara ni universalmente establecida entre los términos "adaptación" y "aclimatación" y su uso varía en función del criterio del autor. Muchas veces los términos de adaptación y aclimatación se utilizan indistintamente para referirnos a la capacidad de cambio de un organismo para acomodarse a las nuevas condiciones de su entorno. De hecho, según el diccionario de la Real Academia Española (RAE), observamos sólo ligeros matices al comparar ambos conceptos:

- Adaptarse: acomodarse a las condiciones de su entorno.
- Aclimatarse: acostumbrarse a climas y condiciones diferentes de los que le eran habituales.

Incluso, la ambigüedad entre ambos conceptos se pone de manifiesto en el Dicciomed (Diccionario médico-biológico, histórico y etimológico de la Universidad de Salamanca), que define la aclimatación como un tipo de adaptación que experimenta un organismo frente a los cambios en el medio ambiente y que surge como una respuesta fisiológica a corto plazo y no como un cambio genético irreversible. Otra interpretación de ambos términos se recoge en el diccionario científico (*The Science Dictionary*) y en el diccionario *online* de Cambridge, que definen el concepto de adaptación como cualquier alteración estructural o funcional de un ser vivo o de cualquiera de sus partes como consecuencia de la selección natural y por la que el organismo es capaz de sobrevivir y multiplicarse en el nuevo ambiente. Igualmente, la aclimatación también se define como un tipo de adaptación que permite al organismo acostumbrarse a un nuevo clima o ambiente.

En el contexto de las publicaciones científicas esta ambigüedad se mantiene, sin existir un criterio claro sobre el uso de ambos términos. Muchos autores también utilizan indistintamente los dos conceptos considerándolos prácticamente sinónimos (Hanna and Tait, 2015; Gittins *et al.*, 2015) o incluyendo la aclimatación como un tipo de adaptación (concepto más amplio). En otros casos se aprecia una ligera pero marcada diferencia entre ambos términos. Por un lado, el término aclimatación (que en Inglés presenta dos posibilidades: *acclimatization* o *acclimation*, con diferentes matices que posteriormente comentaremos) se considera, en general, como un tipo de adaptación que experimenta un organismo al cambiar a un hábitat diferente (estacional o geográfico) al que se encontraba acostumbrado y por el que desarrolla una serie de cambios compensatorios. Suele considerarse un proceso más

rápido y temporal (reversible) que tiene lugar frente a cambios graduales del ambiente y que no afecta a los patrones evolutivos de las especies ("adaptación fenotípica"). En Inglés, esta última definición se correspondería con el término *acclimatization* (Yang *et al.*, 2015b) mientras que *acclimation* se utiliza para referirnos a aquellos cambios adaptativos que experimenta un organismo en respuesta a los cambios de las condiciones ambientales inducidas artificialmente en el laboratorio (Teigen *et al.*, 2015). Por otro lado, el concepto de adaptación (*adaptation*) se define como cualquier característica del desarrollo, comportamiento, morfología o fisiología que surge en un ambiente determinado como resultado de la selección natural irreversible y que mejora la oportunidad de un ser vivo para sobrevivir y dejar descendencia fértil. Por lo tanto, el término adaptación lleva implícito el concepto de "adaptación genotípica" y suele relacionarse con un proceso más largo y marcado por cambios irreversibles (Zufall and Rausher, 2004).

En definitiva, ante la ambigüedad que existe en el uso de ambos términos, podemos concluir que tanto la adaptación como la aclimatación son las respuestas que da el individuo a las exigencias del medio ambiente. Ambos son conceptos muy similares, en muchos casos utilizados de manera indiferente o con pequeños matices que diferencian uno de otro. En cualquier caso, en este trabajo se empleará el término adaptación, que se considera un concepto más amplio y es el utilizado de manera predominante en las publicaciones científicas, englobando muchas veces ambos términos (Zhao *et al.*, 2016; Lachapelle *et al.*, 2015). Además, a nivel teórico e independientemente del uso que los diferentes autores dan a ambos conceptos, en nuestra opinión parece difícil definir un límite claro entre ambos pues la exposición de un organismo a condiciones cambiantes en su hábitat (tanto de manera natural como inducidas artificialmente en el laboratorio) puede conllevar cambios fisiológicos temporales (alteraciones fenotípicas) que muchas veces estarán sustentados por modificaciones genéticas (alteraciones genotípicas), que pueden ser o no reversibles según las circunstancias.

C.2. Organismos adaptados a la presencia de metales pesados: desarrollo de nuevas estrategias moleculares y celulares

Hace más de 50 años se publicaron los primeros estudios sobre "evolución dirigida por contaminación", es decir, sobre la fuerza selectiva y los procesos de micro-evolución que desencadenan los fenómenos de contaminación de origen antropogénico (Busvine, 1954; Kettlewell *et al.*, 1955). Los contaminantes ambientales generalmente son considerados como agentes estresantes y, frente a ellos, los organismos desarrollan una serie de mecanismos protectores que les permiten sobrevivir, tales como: la producción de proteínas de choque térmico (proteínas de respuesta general a estrés), el aumento de los mecanismos de defensa frente al estrés oxidativo o la activación del sistema inmune (Kültz, 2005). Además, ante un estrés recurrente o persistente, los seres vivos desarrollan mecanismos de tolerancia que favorecen ciertas capacidades fisiológicas, predominando poco a poco aquellas variables genéticas que permiten neutralizar de manera rápida el estrés y prevenir sus efectos adversos (van Straalen *et al.*, 2011).

Existen multitud de estudios sobre organismos adaptados a determinadas condiciones de estrés (temperaturas extremas, presencia de algún compuesto tóxico (antibióticos, xenobióticos, productos no metabolizables), extrema salinidad, cambios de pH, condiciones de hipoxia, etc.), a las que se exponen tanto en un ambiente natural (Khan *et al.*, 2015) como en condiciones artificialmente inducidas en el laboratorio. En este último caso, nos encontramos ante procesos denominados como "ingeniería evolutiva" (Butler *et al.*, 1996), en los que los organismos, tras ser expuestos progresivamente a concentraciones crecientes de un determinado contaminante, llegan a adquirir nuevas capacidades metabólicas y desarrollan un nuevo fenotipo tras la adaptación evolutiva llevada a cabo por mutaciones originadas al azar a lo largo de varias generaciones (Sauer, 2001).

El análisis de los mecanismos moleculares y celulares que permiten la supervivencia de los organismos adaptados a un estrés extremo es de vital importancia para aumentar nuestro conocimiento sobre las estrategias de defensa que presentan los seres vivos. Como ya se ha comentado previamente, los metales pesados son uno de los contaminantes más tóxicos, persistentes y abundantes del planeta y, por ello, el estudio de los organismos adaptados a la presencia de los mismos tiene un especial interés.

Actualmente, conocemos algunas de las estrategias de defensa que presentan estos organismos adaptados:

- ✓ El aumento de los niveles de expresión constitutivos o basales de genes codificantes de proteínas de unión a metal, como son las metalotioneínas, mediante la aparición de nuevas secuencias reguladoras en sus regiones promotoras

En general, los genes MTs presentan unos niveles bajos de expresión basal y su expresión se induce en respuesta a la presencia de agentes estresantes en el medio, como son los metales pesados. Por consiguiente, el aumento de sus niveles de expresión basal contribuye a la protección frente a la toxicidad de los metales, evitando el daño celular y favoreciendo la adaptación de los organismos regularmente expuestos a metales en sus hábitats (Costa *et al.*, 2012). Un ejemplo de esto nos lo ofrece el colémbolo *Orchesella cincta*, que puede habitar en suelos altamente contaminados con metales pesados en donde otras especies de invertebrados están ausentes. Una mayor expresión constitutiva de su gen MT se ha detectado en aquellos especímenes aislados de sitios altamente contaminados por metales pesados, como Plombières (mina en Bélgica), Noyelles (horno de fundición en Francia) o Arnoldstein (Austria) (Timmermans *et al.*, 2005). En algunos organismos se ha asociado este aumento de los niveles basales de expresión a la aparición de nuevos polimorfismos en la secuencia de la región promotora de los genes MTs, con un número variable de elementos MREs (Costa *et al.*, 2012). Janssens y colaboradores (2007) identificaron en *Drosophila* al menos 7 variedades alélicas (pMtA1, pMtA2, pMtB, pMtC, pMTD1, pMTD2, pMtF) del promotor de su gen MT, observándose que las variedades pMtD2 y pMtF permitían mayores niveles de expresión basal que el promotor silvestre pMtA1. Estas variedades de promotores fuertes fueron los predominantes en aquellas poblaciones expuestas constantemente a cadmio, existiendo así una correlación entre la concentración de Cd²⁺ en el suelo y los niveles de expresión de los genes MTs regulados por estos promotores (Janssens *et al.*, 2008).

- ✓ El incremento de la expresión de otros genes (no codificantes de MTs) posiblemente relacionados con la respuesta a estrés.

Muchos autores opinan que la adaptación a la exposición de elevadas y continuadas concentraciones de metal en el medio no sólo depende de los mayores niveles de expresión basal de genes MTs, sino que la respuesta adaptativa es más compleja y afecta a toda una red de genes y proteínas (van Straalen *et al.*, 2011). Así, en poblaciones del artrópodo *Orchesella cincta* adaptadas a la contaminación por metales se observan mayores niveles de expresión en genes de la ruta de proteína-quinasa activadas por estrés (SAPK) (Costa *et al.*, 2012). En el caso de levaduras adaptadas a elevadas concentraciones de cobre (metal caracterizado por su elevada acción oxidante), destaca un incremento en la expresión de genes que codifican enzimas antioxidantes, tales como la superóxido dismutasa, la catalasa, la peroxirredoxina o la glutatión peroxidasa, asociadas a la disminución de la producción de ROS (Perrone *et al.*, 2008; Adamo *et al.*, 2012a). Igualmente, se ha detectado un mayor contenido de enzimas relacionadas con el metabolismo del sulfuro y la biosíntesis de aminoácidos como la cisteína (cistationina- γ -liasa o aspartato-semialdehído deshidrogenasa) en levaduras y algas adaptadas a elevadas concentraciones de cobre, e igualmente mayores tasas en la síntesis de glutatión (Adamo *et al.*, 2012a; Ritter *et al.*, 2010). La sobre-expresión de enzimas glucolíticas, como la triosa-fosfato isomerasa o la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH3), se asocia con una reconfiguración del flujo glucolítico, asociado con la defensa frente al estrés oxidativo en humanos, plantas y levaduras. Además, la enzima GAPDH3 parece tener un papel de sensor al estrés oxidativo frente a procesos de reparación del ADN o situaciones de apoptosis (Morigasaki *et al.*, 2008).

- ✓ Amplificación diferencial de genes clave en la respuesta frente a metales

Varios autores han afirmado que los procesos de reorganización cromosómica a gran escala (como la amplificación génica diferencial) parecen ser cruciales para los procesos de adaptación, ya que permiten un cambio rápido de los niveles de expresión de determinados genes al aumentarse el número de copias de los mismos. Por ejemplo, en el hígado de ratón se detectó un aumento de dos veces en el número de copias de la MT-1 tras el tratamiento de 6h con elevadas concentraciones de sales de cadmio. Además se confirmó que las copias extra de las MTs eran transcripcionalmente activas y, por tanto, funcionales (Koropatnick, 1988). Así mismo, en cepas de *S. cerevisiae* adaptadas artificialmente a elevadas concentraciones de cobre se ha detectado una amplificación génica diferencial de hasta 7 veces del gen *CUP1*, codificante de una metalotioneína. Esta amplificación génica permitía mayores y constantes niveles de expresión de este gen (Adamo *et al.*, 2012b). Este hecho pone de manifiesto que durante el proceso de adaptación tienen lugar fenómenos de reorganización genética, como las duplicaciones en tándem, que permiten un incremento del número de copias de un grupo de genes relacionados entre sí y localizados en el mismo locus o región cromosómica (Zhang, 2003).

De forma análoga, en cepas naturales de *S. cerevisiae* aisladas en Israel se observó que la presencia continuada de elevadas concentraciones de cobre había desencadenado procesos dinámicos de reestructuración cromosómica, como la duplicación de determinados segmentos

de los cromosomas 7 y 8, que favorecían un aumento del número de copias de los genes *CUP1* y *CUP2* (factor de transcripción activador de *CUP1*), relacionados con la regulación de los niveles de cobre (Chang *et al.*, 2013). Además, se cree que las múltiples copias del transposón *Ty* son las responsables de la iniciación de estos procesos de reestructuración en el genoma de levaduras (Mieczkowski *et al.*, 2010). Por otro lado, se cree que en estos procesos de reorganización génica no sólo se aumenta el número de copias de los genes implicados en la respuesta estrés, sino que también se incrementará el número de copias de otros genes presentes en el mismo segmento cromosómico y que no tendrán un efecto tan claro en el proceso adaptativo (Chang *et al.*, 2013).

Finalmente, es importante señalar que aún no se conoce el grado de estabilidad de estas reestructuraciones genéticas; algunos autores indican que estos efectos adaptativos son estables y se mantienen incluso tras retirar la presión selectiva del medio durante un tiempo y posteriormente volverla a aplicar, permitiendo la supervivencia de las cepas pre-adaptadas y expuestas de nuevo a las máximas concentraciones de metal tras un tiempo sin exposición al estrés (Adamo *et al.*, 2012a). Sin embargo, en otros casos, las mutaciones parecen inestables y temporales, permitiendo una respuesta rápida y provisional hasta el momento en que tiene lugar otra mutación más estable o cambian de nuevo las condiciones ambientales, pudiendo recuperarse la situación original de manera reversible (Chang *et al.*, 2013).

✓ Reducción o limitación de la entrada del metal al interior celular

Otra estrategia de defensa que aparece en algunas cepas adaptadas a elevadas concentraciones de metal es la reducción o limitación de la captación de metal a través de sus membranas y/o paredes celulares. En estas cepas se observan menores tasas de acumulación intracelular de metal en comparación con las cepas no adaptadas (Adamo *et al.*, 2012a; White and Gadd, 1989). Por ejemplo, en cepas de *S. cerevisiae* adaptadas a elevadas concentraciones de cobre, los genes *CTR1*, *CTR3* y *FET4* (codificantes de transportadores de cobre) aparecen inhibidos, impidiéndose así la entrada del metal al interior celular (Adamo *et al.*, 2012b).

✓ Aumento de la capacidad de biosorción de metal

En algunas bacterias como *Bacillus subtilis* se aumenta la producción de exopolisacáridos (EPS) como un mecanismo de adaptación a elevadas concentraciones de metales, y este incremento es proporcional a la concentración de los mismos. El EPS puede liberarse al medio extracelular o quedarse unido a la superficie de la célula y, de esta manera, incrementar la capacidad de biosorción del metal. Por ejemplo, Sundar y colaboradores (2011), adaptaron a una cepa de *B. subtilis* a crecer en presencia de elevadas concentraciones de Cr^{3+} y detectaron una mayor producción de EPS con el correspondiente aumento de su capacidad de biosorción y eliminación del metal del medio.

C.3. Aplicaciones biotecnológicas de los organismos adaptados a la presencia de metales

El estudio de los mecanismos de defensa que presentan los organismos adaptados a la presencia de metales pesados tiene un especial interés, no sólo porque aumenta nuestro conocimiento sobre las respuestas de estos organismos frente a la situación de estrés (los genes implicados en el proceso, su regulación, etc.) sino también porque algunos de ellos nos permiten comprender mejor determinadas enfermedades humanas. Un ejemplo de ello es el análisis de levaduras adaptadas en el laboratorio a crecer en presencia de elevadas concentraciones de cobre, que nos puede aportar información valiosa sobre las enfermedades relacionadas con la alteración del metabolismo del cobre en el ser humano (Adamo *et al.*, 2012). Por otro lado, las cepas adaptadas también pueden tener diferentes aplicaciones biotecnológicas:

- La producción de alimentos enriquecidos en micronutrientes tales como: cobre, hierro, cobalto, manganeso o formas orgánicas del selenio (Zolotov *et al.*, 1998). Las levaduras tolerantes a elevadas concentraciones de cobre y que son capaces de acumular estos cationes metálicos pueden utilizarse como complementos alimenticios al ser considerados como organismos GRAS (*Generally Recognised As Safe* = Generalmente Reconocidos como Seguros) (Adamo *et al.*, 2012).
- La obtención de cosméticos, pro-bióticos, productos dietéticos y alimentos funcionales, nutracéuticos o de diseño (Manzoni *et al.*, 2009). Un ejemplo es la utilización de cepas de *Lactobacillus brevis* adaptadas a elevadas concentraciones de cobre como inóculo en procesos biotecnológicos a gran escala. Estas bacterias se usan, entre otros procesos industriales, en la producción de queso, que generalmente se realiza en recipientes de cobre (Mrvčić *et al.*, 2013).
- Su utilización como biomarcadores para estudios ecotoxicológicos, ya que un organismo adaptado puede permanecer en un ecosistema contaminado frente a otros que desaparecen y revelar así la presencia del contaminante (Adamo *et al.*, 2012a).
- La utilización de cepas adaptadas en procesos de biolixiviación, en los que se liberan metales de interés (cobre, zinc, níquel, oro, plata y estaño, entre otros) desde minerales o menas. El uso de organismos más tolerantes o adaptados a la presencia de metales pesados (como son distintas cepas de *Aspergillus niger* adaptadas a crecer con elevadas concentraciones de níquel, molibdeno, aluminio o hierro) permite llevar a cabo estos procesos con una mayor eficacia (Yang *et al.*, 2009; Santhiya and Ting, 2006).
- La utilización de las cepas adaptadas en procesos de biorremediación, que permitan la eliminación de metales pesados en ecosistemas contaminados de una forma eficaz y sin tener que liberar cepas genéticamente modificadas al medio.

Además, una ventaja adicional de los organismos adaptados a metal es que, en ocasiones, tienen lugar fenómenos de resistencias-cruzadas, por lo que los organismos adaptados no sólo toleran la presencia de un determinado metal sino que son resistentes a otros metales u otros

tipos de estrés. Así, cepas de *S. cerevisiae* tolerantes a cobalto también son resistentes a otros metales próximos en la tabla periódica, como son el hierro, manganeso, zinc o níquel, pero no a cobre o cromo (Çakar *et al.*, 2009). Esto permite un uso más amplio de estos organismos adaptados en procesos de biorremediación de metales.

C.3.1. Utilización de las cepas adaptadas a metales en procesos de biorremediación

Actualmente, se conocen una gran variedad de técnicas físico-químicas que permiten la eliminación de metales pesados de ecosistemas contaminados, entre las que destacan: la precipitación química, el intercambio iónico, los procesos de oxidación y reducción, la filtración, los métodos electroquímicos o los procesos de ósmosis inversa (Hlihor *et al.*, 2013). Sin embargo, estas técnicas suelen llevar asociados elevados costes económicos y no son efectivas para concentraciones de metal inferiores a 100 mg/L o para metales solubles en agua (como en las aguas residuales). Por ello, frente a estos métodos clásicos, fue el ingeniero norteamericano George M. Robinson el que utilizó en 1960, por primera vez, bacterias para remediar la contaminación por petróleo. La biorremediación se basa en la utilización de macroorganismos (plantas), microorganismos (bacterias, hongos filamentosos, levaduras, algas) o productos metabólicos originados por ellos para la eliminación de compuestos tóxicos contaminantes (orgánicos o inorgánicos) (Adamis *et al.*, 2003; Wang and Chen, 2006; Kuroda and Ueda, 2010). Este proceso presenta una serie de ventajas frente a los métodos físico-químicos: un bajo consumo energético, la eliminación simultánea de gran variedad de contaminantes y sus bajos costes económicos. Sin embargo, la biorremediación también presenta algunas limitaciones marcadas por el nivel de biodegradabilidad de algunos compuestos orgánicos, la sensibilidad de las células a las condiciones extremas de pH o a las elevadas concentraciones de metales o, en algunos casos, la larga duración del proceso (Kulshreshtha *et al.*, 2014; Malik, 2004).

En la biorremediación de metales pesados se pueden aplicar: a) procesos de biosorción (secuestro pasivo extracelular, generalmente realizado por células muertas pre-tratadas con calor), b) bioacumulación (secuestro intracelular del metal tras el transporte activo del mismo al interior de la célula) y/o c) bioprecipitación (Geva *et al.*, 2016). En ocasiones, en los procesos de biorremediación llevados a cabo por células metabólicamente activas, se pueden eliminar de manera simultánea varios metales tóxicos y otros contaminantes orgánicos. Un ejemplo lo encontramos en la bacteria halófila *Delftia lacustris*, muy resistente a la presencia de cromo, mercurio, plomo o cadmio y capaz de utilizar diferentes compuestos orgánicos (naftaleno, 2-metilnaftaleno, benceno y tolueno) como única fuente de carbono (Wu *et al.*, 2016).

Las cepas adaptadas o resistentes a metales son buenos potenciales candidatos para el tratamiento de ecosistemas contaminados por estos tóxicos inorgánicos (Malik, 2004). Estas cepas pueden aislarse de ambientes naturales altamente contaminados (Wu *et al.*, 2016) u obtenerse artificialmente en el laboratorio (Geva *et al.*, 2016), ya sea mejorando su capacidad de resistencia por ingeniería genética o por experimentos de adaptación evolutiva sin necesidad de introducir genes foráneos en el organismo. Esta última posibilidad es menos conflictiva con las normas internacionales cuando se requiere aplicar los organismos directamente (*in situ*) en el medio contaminado.

Introducción

Objetivos

Material y Métodos

Resultados

Discusión

Conclusiones

Cuestiones por resolver en el futuro

Bibliografía

Anexos

OBJETIVOS

En este trabajo de tesis doctoral se persiguen cinco objetivos principales, que a su vez se subdividen en una serie de objetivos más específicos:

A.- Ampliar nuestro conocimiento sobre los genes codificantes de metalotioneínas (MTs) dentro del género *Tetrahymena*

1- Aislar nuevos genes codificantes de MTs en cinco especies hasta el momento no exploradas: *T. patula*, *T. borealis*, *T. americanis*, *T. malaccensis* y *T. ellioti*. Se llevará a cabo un análisis comparativo de todos los genes codificantes de CdMTs (subfamilia 7a) y CuMTs (subfamilia 7b) conocidos hasta la actualidad dentro del género *Tetrahymena*, identificando las diferencias existentes entre ambas subfamilias y frente a las MTs de otros organismos.

2- Obtener los ADNc de los nuevos genes MT y analizar los potenciales motivos de interés de las regiones 5' y 3' UTRs implicados en la regulación de la expresión génica.

3- Analizar la expresión de algunos de estos nuevos genes mediante RT-PCR cuantitativa bajo diferentes condiciones de estrés.

4- Realizar un análisis *in silico* de las estructuras 3D de todas las MTs de *Tetrahymena* conocidas hasta ahora y compararlas con las de otros organismos.

B.- Aislar y caracterizar diferentes cepas de *T. thermophila* adaptadas a elevadas concentraciones de un determinado metal, cuyo análisis nos aportará valiosa información sobre la respuesta celular frente al estrés por metales

1- Aislar tres cepas de *T. thermophila* adaptadas a elevadas concentraciones de metal (Cd^{2+} , Cu^{2+} o Pb^{2+}) mediante su exposición prolongada a concentraciones crecientes de estos contaminantes.

2- Caracterizar estas cepas adaptadas a nivel morfológico-estructural y estudiar sus cinéticas de crecimiento.

3- Comparar los perfiles de expresión (incluyendo los niveles basales) de los genes MT entre las diferentes cepas de *T. thermophila* adaptadas metal. Calcular mediante PCR cuantitativa el número de copias/ μl de los genes MT en estas cepas.

4- Comparar los perfiles de proteínas totales y proteínas ricas en residuos tiol entre las diferentes cepas adaptadas de *T. thermophila* y otras cepas seleccionadas de este mismo ciliado.

Objetivos

C.- Aislar y caracterizar cepas *knockout* de *T. thermophila* en algunos genes MT (*MTT1* y/o *MTT5*)

- 1- Obtener cepas *knockout* para los genes *MTT1* y/o *MTT5* de *T. thermophila* mediante transformación biolística. Analizar dichas cepas frente al estrés por metales.
- 2- Comparar los perfiles de expresión (incluyendo los niveles basales) obtenidos por RT-PCR cuantitativa de los genes MT en las diferentes cepas *knockout* de *T. thermophila*. Llevar a cabo un análisis comparativo con otras cepas (incluyendo las cepas adaptadas a metal).
- 3- Calcular mediante PCR cuantitativa el número de copias/ μ l de los genes MT en las diferentes cepas *knockout* aisladas de *T. thermophila*.

D.- Analizar los genes codificantes de factores de transcripción del tipo AP-1 (familia bZIP) como posibles reguladores de la expresión génica de los genes MT en *T. thermophila*

- 1- Identificar y caracterizar *in silico* los genes codificantes de posibles factores de transcripción del tipo AP-1 en *T. thermophila*. Realizar un análisis comparativo con otras especies: *T. malaccensis*, *T. borealis* y *T. elliotti*.
- 2- Analizar los perfiles de expresión (incluyendo los niveles basales) de los genes AP-1 en diferentes cepas de *T. thermophila*. Igualmente, se podría elaborar un posible modelo de la regulación de la transcripción de los genes MT por estos factores AP-1.

E.- Evaluar la posible utilización de las cepas adaptadas a metal en procesos de biorremediación de metales presentes en medios contaminados

Introducción

Objetivos

Material y Métodos

Resultados

Discusión

Conclusiones

Cuestiones por resolver en el futuro

Bibliografía

Anexos

MATERIAL Y MÉTODOS

1. MATERIAL BIOLÓGICO Y CONDICIONES DE CULTIVO

1.1. Especies del género *Tetrahymena*

En este trabajo se han utilizado seis especies diferentes del protozoo ciliado (microorganismo eucariota modelo) *Tetrahymena* (*Eukaryota*; *Alveolata*; *Ciliophora*; *Intramacronucleata*; *Oligohymenophorea*; *Hymenostomatida*; *Tetrahymenina*; *Tetrahymenidae*; *Tetrahymena*): *T. patula* LFF (ATCC 50064), *T. ellioti* 4EA (SD01607), *T. borealis* (SD01609), *T. americanis* (80C03), *T. malaccensis* 436 (SD01608) y *T. thermophila*. Las cinco primeras fueron suministradas por la ATCC (*American Type Culture Collection*) y por el Centro Nacional de cultivos de *Tetrahymena* (*National Tetrahymena Stock Center*) de la Universidad de Cornell. Estas cinco especies presentan un genotipo y fenotipo silvestres y, por tanto, no tienen ninguna característica génica destacable.

Por el contrario, en el caso de la especie *T. thermophila*, hemos utilizado cinco cepas diferentes. Las cepas SB1969, SB210 y CU428, cuyas características genotípicas y fenotípicas se indican en la Tabla 5, fueron amablemente cedidas por el Dr. Eduardo Orias (*University of California*, Santa Bárbara, EEUU) y el Dr. Aaron Turkewitz (*The University of Chicago*, Chicago, Illinois, EEUU). Además, también se analizaron dos cepas transformadas, denominadas GFPMTT1 y GFPMTT5 (Amaro *et al.*, 2014), que contienen múltiples copias de la construcción plasmídica P_{MTT1}::GFP::MTT1 o P_{MTT1}::GFP::MTT5. Estas cepas transformadas, obtenidas a partir de la cepa CU428, sobre-expresan genes recombinantes que codifican las proteínas de fusión GFP (*Green Fluorescent Protein* o Proteína Verde Fluorescente)-MTT1 o GFP-MTT5 (Fig. 8), respectivamente. Ambas construcciones se encuentran bajo el control del promotor del gen *MTT1*.

Tabla 5. Características genotípicas y fenotípicas de tres de las cepas de *T. thermophila* empleadas en este trabajo

Cepa	Genotipo micronuclear	Genotipo macronuclear	Fenotipo macronuclear	Tipo conjugante	Fuente
SB1969	<i>chx1-1/chx1-1</i> <i>mpr1-1/mpr1-1</i>	Tipo silvestre	pm-S, cycl-S	II	E. Orias
SB210	<i>gal1-1/gal1-1</i>	Tipo silvestre	2dg-S	VI	E. Orias
CU428	<i>mpr1-1/mpr1-1</i>	Tipo silvestre	pm-S, mp-S	VII	A. Turkewitz

A nivel micronuclear: *chx1-1*: gen que confiere resistencia a cicloheximida. *mpr1-1*: gen de resistencia a 6-metilpurina. *gal1-1*: gen que confiere resistencia a la 2-desoxi-D-galactosa. A nivel macronuclear: pm-S: sensibilidad a paromomicina. cycl-S: sensibilidad a cicloheximida. 2dg-S: sensibilidad a la 2-desoxi-D-galactosa. mp-S: sensibilidad a 6-metilpurina. En números romanos se indica el tipo conjugante de cada cepa.

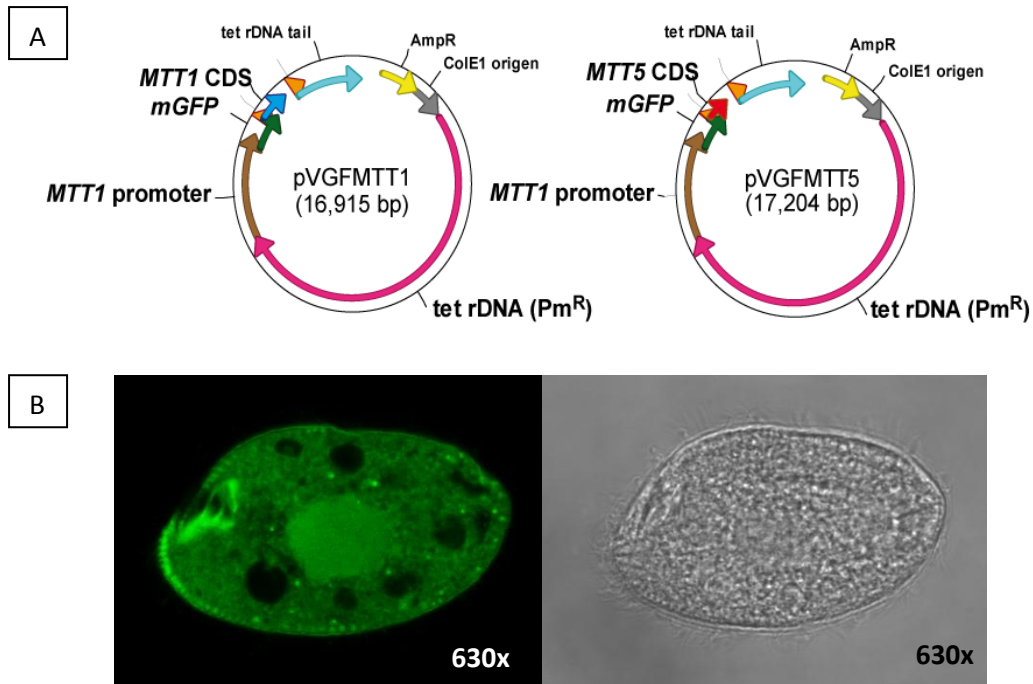


Fig 8. Cepas GFPMTT1 y GFPMTT5 utilizadas en este trabajo. **(A):** Esquema de las construcciones plasmídicas empleadas para la obtención de las cepas GFPMTT1 y GFPMTT5 de *T. thermophila* (Amaro *et al.*, 2014). **(B):** Micrografía de microscopía confocal de fluorescencia de la cepa GFPMTT5 tras la exposición a Cd^{2+} ($2,5 \mu\text{M}$) durante 24h. Se muestra (a la derecha) la misma imagen en campo claro.

1.2. Cepas de *Escherichia coli*

Se han utilizado dos estirpes bacterianas competentes de *E. coli*: *One Shot TOP10* (Invitrogen) y *DH5 α* (Invitrogen). Ambas se emplean en los procesos de clonación, permitiendo el mantenimiento y la amplificación de las construcciones plasmídicas obtenidas (apartado 9).

1.3. Condiciones de cultivo y mantenimiento

Los medios de cultivo empleados para el crecimiento y mantenimiento de los distintos microorganismos utilizados en este trabajo se detallan en la Tabla 6.

1.3.1. Mantenimiento y conservación de cepas de *Tetrahymena*

Las distintas especies y cepas de *Tetrahymena* se crecieron axénicamente en los medios de cultivo PP210, SPP y SPPA (Tabla 6) a una temperatura constante de $31^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ para las cepas de *T. thermophila* y de $28^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ para las otras cinco especies de *Tetrahymena*. *T. patula* presenta mayores requerimientos nutricionales y, por tanto, esta especie se cultiva en el medio Loeffler (Tabla 6). El mantenimiento de las cepas a medio plazo (3-4 meses) se realiza en el medio SOJA (Tabla 6) a $28^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ y en condiciones de baja concentración de oxígeno. Además, todas las cepas también se conservan indefinidamente congeladas en nitrógeno líquido. Para ello, los cultivos en fase exponencial de crecimiento ($2-6 \times 10^5$ células/ml) son

sometidos a un proceso de inanición en tampón Tris-HCl 0,01M pH 6,8 durante 3 días. Posteriormente, se recogen las células por centrifugación (2.000 g, 3 minutos) y se resuspenden en una solución crioprotectora de DMSO al 10% en tampón Tris-HCl 0,01M pH 6,8 (Tabla 6). La suspensión celular se incuba en esta solución a temperatura ambiente durante 30 minutos, posteriormente se mantiene a -80°C durante 72h y, finalmente, se almacena en un contenedor con nitrógeno líquido (-196°C).

Tabla 6. Medios de cultivo y soluciones empleadas para el crecimiento y mantenimiento de los microorganismos utilizados en este trabajo

MEDIO/SOLUCIÓN	COMPOSICIÓN	APLICACIÓN
PP210	Proteosa peptona Nº 3 al 2% (Pronadisa) suplementada con: FeCl ₃ 100 µM (Panreac) Sulfato de estreptomycin 200 µg/ml (Calbiochem) Penicilina G 200 µg/ml (Sigma) ⁽¹⁾ Sulfato de paromomicina 12 µg/ml (Sigma)	Cultivo de las distintas especies y cepas de <i>Tetrahymena</i>
SPP	Proteosa peptona 2% (Difco) Extracto de levadura 0,1% (Difco) D-Glucosa 0,2% (Sigma); Fe-EDTA 0,003% (Sigma)	Cultivo de las cepas <i>knockout</i> inmediatamente después de la transformación
SPPA	Medio SPP suplementado con: Sulfato de estreptomycin 100 µg/ml (Sigma) Penicilina G 61,5 µg/ml (Sigma) Anfotericina B 0,25 µg/ml (Sigma)	Cultivo de las cepas de <i>T. thermophila</i> y de las cepas <i>knockout</i> durante el proceso de segregación fenotípica ⁽²⁾
Medio Loeffler	Proteosa peptona 1,5% (Pronadisa) Tryptona 0,5% (Difco); Dextrosa 0,5% (Panreac) NaCl 0,2% (Panreac); Na ₂ HPO ₄ 0,1% (Fluka) KH ₂ PO ₄ 0,1% (Panreac) Extracto de levadura 0,05% (Pronadisa) MgCl ₂ 0,03% (Sigma) Solución de L-α-lecitina en etanol 1% (Acros Organics)	Cultivo de <i>T. patula</i> ⁽³⁾
SOJA	H ₂ O bidestilada estéril suplementada con: Sulfato de estreptomycin 200 µg/ml (Calbiochem) Penicilina G 200 µg/ml (Sigma) 1 semilla de <i>Glycine max</i> (soja)	Mantenimiento a medio plazo (3-4 meses) de las especies de <i>Tetrahymena</i>
Luria Bertani (LB) (Pronadisa)	Tryptona 10g/L; Extracto de levadura 5g/L NaCl 5g/L Agar bacteriológico 15g/L (para placas de LB agar)	Cultivo de los clones de <i>E. coli</i>
SOC (Invitrogen)	Tryptona 2% Extracto de levadura 0,5% NaCl 10mM; KCl 2,5 mM MgCl ₂ 10 mM; MgSO ₄ 10 mM Glucosa 20 mM	Cultivo de las cepas de <i>E. coli</i> inmediatamente después de la transformación
Solución crioprotectora I	CaCl ₂ 100 mM Glicerol 15%	Mantenimiento de los clones de <i>E. coli</i> congelados a -80°C
Solución crioprotectora II	Tampón TrisHCl 0,01 M pH 6,8 DMSO 10% (Merck)	Mantenimiento de cepas de <i>Tetrahymena</i> congeladas en N ₂ líquido

⁽¹⁾ El sulfato de paromomicina solamente se añade a los cultivos de las cepas recombinantes GFPMTT1 y GFPMTT5 para evitar que pierdan el plásmido. ⁽²⁾ El medio SPPA se utiliza, suplementado con concentraciones crecientes de paromomicina o cicloheximida, para el cultivo de las cepas *knockout/knockdown* durante el proceso de segregación fenotípica (apartado 3.3). ⁽³⁾ *T. patula* presenta mayores requerimientos nutricionales y, por eso, es la única que precisa del medio Loeffler para crecer.

1.3.2. Mantenimiento y conservación de cepas de *E. coli*

Tras los procesos de transformación por choque térmico (apartado 9), las bacterias transformadas de *E. coli* se incuban durante 1h a 37°C en el medio SOC (Invitrogen) (Tabla 6). Posteriormente, se cultivan en placas con el medio LB (Luria-Bertani)-agar (Tabla 6) durante 16-20h. Este medio se suplementa con el antibiótico kanamicina (50 µg/ml) o ampicilina (100 µg/ml) y con Xgal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido) (40 µg/ml). Los transformantes positivos (colonias blancas) se crecen en el caldo LB (Tabla 6) en presencia de kanamicina (100 µg/ml) o ampicilina (100 µg/ml) a 37°C y en agitación.

Las bacterias recombinantes se conservan a corto plazo (2-3 semanas) a 4°C en las placas de LB agar con kanamicina o ampicilina. También se conservan de forma prolongada congeladas a -80°C en el medio LB líquido conteniendo el antibiótico y una solución crioprotectora al 25% (Tabla 6).

2. ADAPTACIÓN DE CEPAS DE *T. thermophila* A ELEVADAS CONCENTRACIONES DE METAL

En esta tesis doctoral se han obtenido tres cepas de *T. thermophila* adaptadas a elevadas concentraciones de metal: Cd-ADAP (cepa adaptada a cadmio), Cu-ADAP (cepa adaptada a cobre) y Pb-ADAP (cepa adaptada a plomo). El proceso de adaptación, que duró más de dos años, consistió en exponer gradualmente a la cepa SB1969 a concentraciones crecientes de metal (Cd^{2+} , Cu^{2+} o Pb^{2+}) hasta alcanzarse las máximas concentraciones toleradas (MCT): 115 µM de Cd^{2+} (CdCl_2 , Sigma) en el caso de la cepa Cd-ADAP, 4 mM de Cu^{2+} ($\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$, Sigma) en la cepa Cu-ADAP y 5,5 mM de Pb^{2+} [$\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$, Sigma] para la cepa Pb-ADAP. Estas concentraciones máximas de metal son muy superiores a los valores de las CL_{50} previamente obtenidas para estos tres metales en la cepa SB1969 creciendo en el medio PP210.

Las cepas adaptadas se han mantenido a lo largo del tiempo en el medio PP210 en constante presencia del metal (Cd^{2+} , Cu^{2+} o Pb^{2+}) a sus MCTs.

3. OBTENCIÓN DE CEPAS *KNOCKOUT* y/o *KNOCKDOWN* PARA LOS GENES *MTT1* y *MTT5*

Se han obtenido y analizado tres cepas *knockout* (KO) y/o *knockdown* (KD) macronucleares en *T. thermophila*: dos mutantes simples para los genes codificantes de CdMTs *MTT1* (MTT1KO) y *MTT5* (MTT5KD) y el doble mutante MTT1KO + MTT5KD.

3.1. Construcciones genéticas

En la Fig. 9 se representan las construcciones genéticas que se crearon para la obtención de las tres cepas KO/KD. Se prepararon tres construcciones diferentes, una para cada KO/KD simple (Fig. 9A y 9B) y otra para construir el doble mutante a partir de la cepa MTT1KO fijada

(Fig. 9C). En las tres construcciones se incorporaron fragmentos de las regiones 5' y 3' UTRs del gen MT a eliminar flanqueando al gen de resistencia y así, posteriormente, el gen que deseamos inactivar o noquear fue sustituido, tras una recombinación homóloga, por el gen de resistencia que lleva la construcción genética (Fig. 10).

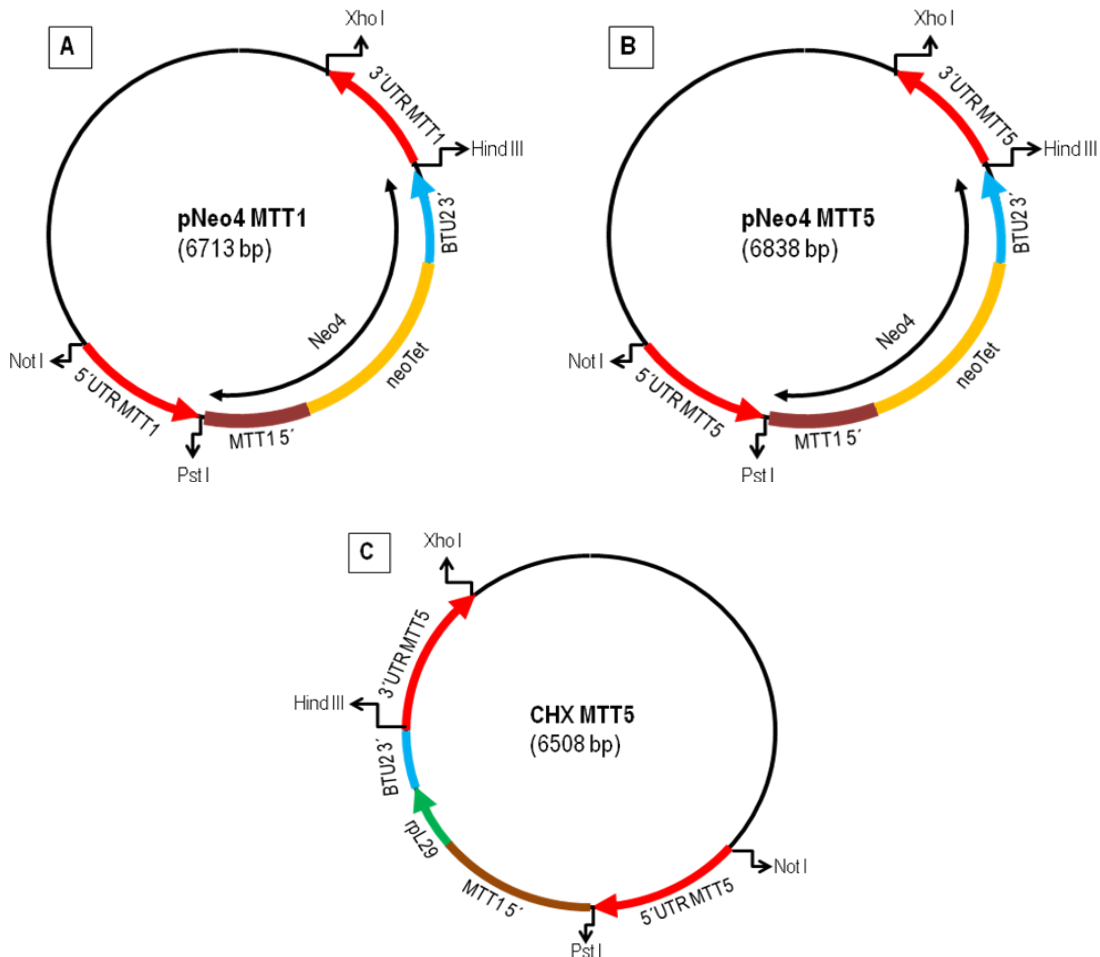


Fig. 9. Representación esquemática de las construcciones genéticas utilizadas para la obtención de las tres cepas *knockout* (KO) y/o *knockdown* (KD) de *T. thermophila*. **(A):** construcción pNeo4 MTT1 para la obtención de la cepa MTT1KO. **(B):** construcción pNeo4 MTT5 para la obtención de la cepa MTT5KD. **(C):** construcción CHX MTT5 para la obtención del doble mutante MTT1KO+MTT5KD. *neoTet*: gen de resistencia a neomicina o paromomicina. *rpl29*: gen de resistencia a cicloheximida. BTU2 3': parte de la región 3'UTR del gen de la β -tubulina 2.

Para la obtención de las cepas KO simples se utilizó el plásmido pNeo4, amablemente donado por el Dr. Aaron Turkewitz. Este plásmido contiene el gen de resistencia al antibiótico paromomicina (neomicina), cuya expresión está regulada por el promotor del gen *MTT1* (Fig. 9A y 9B). Por otro lado, en el caso del doble mutante, se preparó una tercera construcción genética utilizando el plásmido CHX (Fig. 9C y 10), igualmente donado por el Dr. A. Turkewitz. Este segundo vector presenta el gen de resistencia al antibiótico cicloheximida (*rpl29*), cuya expresión es también controlada por el promotor del gen *MTT1*. Flanqueando los genes de

Material y métodos

resistencia se insertaron de manera secuencial los fragmentos de las regiones 5' y 3' UTRs de los genes *MTT1* (Fig. 9A) ó *MTT5* (Fig. 9B y 9C), según el caso (Fig. 10). Estos fragmentos fueron previamente amplificados por PCR estándar (consultar apartado 7.2) utilizando cebadores específicos que incluían determinadas dianas de restricción (Tabla 11, Fig. 10), que facilitaron la clonación de estos fragmentos en los correspondientes vectores de manera dirigida. Para ello se llevaron a cabo digestiones dobles, tanto del plásmido como de los amplicones obtenidos, utilizando 20 U de las siguientes endonucleasas de restricción: NotI HF y PstI para la clonación de las regiones 5'UTRs y HindIII y XhoI para las regiones 3'UTRs (Fig. 9 y 10). Las condiciones en que se realizaron las dobles digestiones se muestran en la Tabla 7. Todas las reacciones de digestión fueron analizadas y purificadas mediante electroforesis de ADN en geles de agarosa (apartados 5.4 y 8.1).

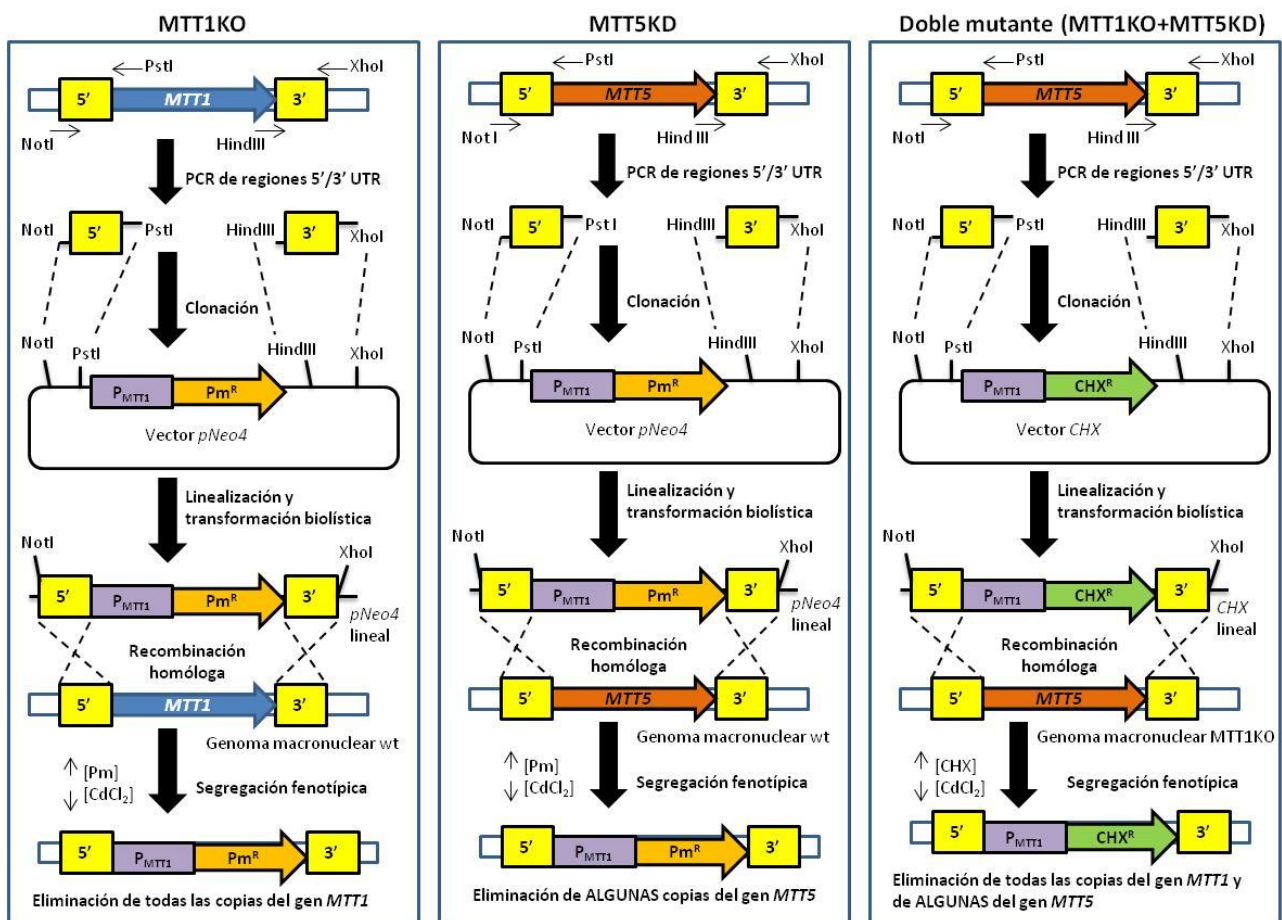


Fig. 10. Representación esquemática del proceso de obtención de las tres cepas *knockout* y/o *knockdown* obtenidas en este trabajo. KO: cepa *knockout*. KD: cepa *knockdown*. PstI, XhoI, NotI y HindIII son dianas para estas endonucleasas de restricción. P_{MTT1}: región promotora del gen *MTT1*. Pm^R: gen de resistencia al antibiótico paromomicina (Pm). CHX^R: gen de resistencia al antibiótico cicloheximida (CHX). wt: tipo silvestre.

Posteriormente, para los procesos de ligación se mezclaron 50 ng del vector digerido y la cantidad de inserto necesaria para obtener una relación molar vector:inserto de 1:3, calculada según la fórmula: [(ng vector x tamaño inserto)/tamaño del vector] x 3. Se utilizó la enzima

Quick Ligase (*Quick Ligation Kit*, NEB) para la reacción de ligación, que se lleva a cabo a temperatura ambiente durante 5 minutos. Finalmente, tanto las construcciones intermedias como las tres construcciones finales (Fig. 9) se introdujeron por choque térmico en bacterias competentes *E. coli* DH5 α (apartado 9) para mantenerlas y amplificarlas. Estas bacterias se conservan indefinidamente a -80°C. Además, antes de llevar a cabo la transformación biolística de *T. thermophila*, se comprobó mediante secuenciación (cebadores universales M13) la correcta ligación de las regiones UTRs en las construcciones finales (Fig. 9).

Tabla 7. Condiciones y endonucleasas de restricción empleadas en la creación de las construcciones génicas necesarias para la obtención de las cepas *knockout* y/o *knockdown*

Enzimas empleadas	Condiciones	
	Tampón de reacción	Tiempo y temperatura
NotI HF (NEB) + PstI (NEB)	Tampón 2.1 (NEB) 100% actividad NotI HF 75% actividad PstI	4-16h a 37°C
HindIII (NEB) + XhoI (NEB)	Tampón 2.1 (NEB) 100% actividad Hin III 100% actividad XhoI	4-16h a 37°C
NotI HF (NEB) + XhoI (NEB)	Tampón 2.1 (NEB) 100% actividad NotI HF 100% actividad XhoI	4-16h a 37°C

HF: *High Fidelity* (alta fidelidad). NEB: casa comercial New England Biolabs.

3.2. Transformación biolística de *T. thermophila*

Se utilizó la cepa CU428 de *T. thermophila* (Tabla 5) para la transformación biolística y la obtención de las cepas *knockout* y/o *knockdown*. En primer lugar, se crecieron las células en 50 ml del medio de cultivo SPPA (Tabla 6) a 30°C y en agitación (100 rpm) hasta alcanzarse una densidad celular de 3×10^5 células/ml. Posteriormente, las células se sometieron a condiciones de inanición manteniéndolas en el tampón Tris HCl 0,01M pH 6,8 (Tabla 10) a 30°C durante las 16-18h previas al proceso de transformación.

Paralelamente se prepararon las construcciones genéticas linealizadas. Para ello, se extrajeron mediante una miniprep (consultar apartado 5.3) los plásmidos recombinantes a partir de cultivos bacterianos crecidos en el medio LB con ampicilina (25 ml) a 37°C y en agitación durante 16-18h. Las construcciones se linealizaron con una doble digestión utilizando ≈ 95 U de las endonucleasas de restricción NotI HF y XhoI (Tabla 7). Tras la digestión y purificación de las construcciones linealizadas se debe alcanzar una concentración $\approx 1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ para cada una de las construcciones.

Inmediatamente antes de llevar a cabo la transformación biolística se prepararon los microproyectiles de oro (*Seashell technology*). Éstos se sonicaron durante 30 segundos para disociar los agregados y, posteriormente, se mezclaron 3 mg de partículas de oro con 15 μg de ADN (construcción genética a introducir en las células). La mezcla fue concentrada en etanol absoluto frío hasta un volumen de 15 μl y, una vez sonicada, se dispuso en el centro de un

disco de ruptura (*rupture disk*) en el *macrocarrier* de la pistola. Las células de *Tetrahymena* se recogieron por centrifugación, se concentraron en 1 ml de tampón Tris HCl 0,01M pH 6,8 y se transfirieron a una placa Petri conteniendo una membrana circular estéril *Whatman* 3mm previamente humedecida con este mismo tampón. Finalmente, los microproyectiles de oro recubiertos con nuestras construcciones plasmídicas fueron introducidos en las células mediante bombardeo biolístico utilizando el sistema *PDS-1000/He Biolistic Particle Delivery System* (Bio-Rad) con una presión de disparo de 900 psi aproximadamente y un vacío de 27 mm Hg. Inmediatamente después, las células fueron transferidas a 50 ml del medio SPP (Tabla 6) y mantenidas a 30°C y en agitación durante 4-5h. Posteriormente, se añadió al medio la mezcla de antibióticos penicilina G y sulfato de estreptomycin a la concentración normalmente utilizada en el medio SPPA (Tabla 6), el antibiótico seleccionador (sulfato de paromomicina 360 µg/ml en el caso de los KO sencillos o cicloheximida 12 µg/ml para el doble mutante) y CdCl₂ 3 µg/ml como agente inductor de la expresión del gen de resistencia incluido en la construcción. Las células transformadas fueron distribuidas en microplacas de 96 pocillos en alícuotas de 200 µl/pocillo e incubadas a 30°C en una cámara húmeda para evitar la evaporación. Tras tres días en estas condiciones, se seleccionaron 8 clones positivos que habían sido transformados correctamente y que, por tanto, eran capaces de crecer en presencia del antibiótico.

3.3. Segregación fenotípica y comprobación de la fijación completa de las cepas *knockout*

A partir de los transformantes positivos se establecieron líneas clonales tomando 1 µl de las células transformadas (pocillos seleccionados) y exponiéndolas a 150 µl del medio SPPA suplementado con una concentración creciente del antibiótico seleccionador [paromomicina (Pm) o cicloheximida (CHX)], junto con una concentración decreciente del agente inductor CdCl₂. Los clones recombinantes se dispusieron en una placa multipocillo y se fueron seleccionando bajo presión selectiva continua y creciente hasta asegurar que el 100% de las copias de los genes *MTT1* ó *MTT5* habían sido reemplazados por la construcción reportera, según el proceso de segregación fenotípica macronuclear (*phenotypic assortment*) (Merriam and Bruns, 1988; Doerder *et al.*, 1992). Para ello, las células se transferían cada 24h a medios con concentraciones cada vez mayores de Pm o CHX durante más de tres semanas, hasta alcanzarse las concentraciones máximas de 1.100 µg/ml de Pm y 150 µg/ml de CHX. Tras este proceso, los clones resistentes se mantuvieron en el medio PP210 durante una semana sin la presencia del antibiótico seleccionador. Posteriormente, se confirmó o no que todas las copias de los genes MTs habían sido sustituidas aplicando dos aproximaciones diferentes: a-) la extracción del ARN total y su paso a ADNc tras el tratamiento con Cd²⁺ 44,5 µM (24h) y la amplificación mediante PCR estándar de los ADNc derivados de los genes *MTT1* ó *MTT5* y b-) cuantificación por PCR cuantitativa del número de copias de los genes supuestamente eliminados por completo. Tras comprobar que ya no existen copias activas del gen MT, las cepas KO estables se mantienen en el medio PP210 sin necesidad de continuar con la presión selectiva del antibiótico.

En las cepas *MTT5KD* y *MTT1KO+MTT5KD*, para mantener reducido el número de copias/µl del gen *MTT5* es necesario mantener de manera constante la presión selectiva del antibiótico a

niveles compatibles con la viabilidad celular: 800 µg/ml de Pm para la cepa MTT5KD y 60 µg/ml de CHX para el doble mutante MTT1KO+MTT5KD. A su vez, se mantienen constantemente expuestas a dosis muy bajas del agente inductor de la expresión del gen de resistencia: 0,5 µg/ml de CdCl₂.

4. TRATAMIENTOS CON AGENTES ESTRESANTES

En el presente trabajo, las especies de *Tetrahymena* se han expuesto a diferentes condiciones/agentes estresantes: metales pesados, agentes causantes de estrés oxidativo, inductores apoptóticos, cambios de pH, choques térmicos o condiciones de inanición (Tabla 8). Estos tratamientos se aplicaron sobre cultivos en fase exponencial tardía (1-3 x 10⁵ células/ml).

Tabla 8. Condiciones de estrés a las que fueron sometidas las distintas especies de *Tetrahymena*

Agente estresante	Procedimiento	Tiempo de exposición
METAL PESADO* (Cd ²⁺ , Cu ²⁺ , Pb ²⁺ , As ⁵⁺ , Zn ²⁺)	Se adiciona al cultivo crecido la solución metálica correspondiente a una concentración final determinada; se utilizan concentraciones variables según el metal, la especie o cepa de <i>Tetrahymena</i> y el análisis o técnica aplicada.	1 y 24
CHOQUE TÉRMICO	Se somete al cultivo celular tanto a temperaturas bajas (4°C) como elevadas (42°C)	24h
CAMBIOS DE pH	Se transfiere el cultivo celular a otro matraz con el medio PP210 con pH ácido (pH 5, ajustado con HCl 0,2N) o básico (pH 9, ajustado con NaOH)	3 y 24h
ESTRÉS OXIDATIVO*	Se adiciona al cultivo una solución de paraquat (7,7 mM; Sigma) o de menadiona (2mM; Sigma), ambos agentes causantes de estrés oxidativo	1 y 24h ⁽¹⁾
INDUCCIÓN DE APOPTOSIS*	Se adiciona al cultivo una solución de camptotecina (100 µM; Calbiochem), que es un potente inductor de la apoptosis celular	1 y 24h
CONDICIONES DE INANICIÓN	Se transfiere el cultivo al tampón Tris HCl 0,01 M pH 6,8	48h, 4 días

(*) Las soluciones de estos agentes estresantes se preparan recientes (inmediatamente antes del tratamiento) en el mismo medio en el que se encuentran las células (PP210 o tampón Tris HCl 0,01M pH 6,8) y se esterilizan por filtración. ⁽¹⁾ Los tratamientos con menadiona sólo se aplicaron durante 1h debido a su alta toxicidad.

Los tratamientos con metales se llevaron a cabo en diferentes condiciones en función de la especie o cepa a analizar y la técnica que posteriormente se iba a aplicar. En el caso de los estudios de expresión génica, las concentraciones de metal y los tiempos de exposición para cada cepa o especie se muestran en la Tabla 9. En todos los casos, estas concentraciones eran subletales, obteniendo bajos niveles de muerte celular tal y como se comprobó por citometría de flujo (consultar apartado 14). Las condiciones de exposición para el resto de técnicas se especifican en cada uno de los apartados correspondientes.

Material y métodos

En el caso de las cepas de *T. thermophila* adaptadas (Cd-ADAP, Cu-ADAP y Pb-ADAP), que constantemente se encuentran expuestas a su correspondiente metal, los tratamientos de 1 y 24h (tratamientos de choque) se hicieron tras lavar las células con el tampón Tris HCl 0,01 M pH 6,8 y mantenerlas en el medio PP210 durante 24h en ausencia de metal (situación control). Por otro lado, el metal no fue eliminado del medio en el caso de los tratamientos denominados MCT, que simulan las condiciones normales de crecimiento de estas cepas adaptadas (constantemente expuestas a la máxima concentración de metal tolerada).

Tabla 9. Condiciones de los tratamientos con metales utilizadas en los estudios de expresión génica

Metal pesado	Sal metálica empleada ⁽¹⁾	Especies o cepas	Concentración (μM)	Tiempo de exposición (h)
Cd ²⁺	CdCl ₂	<i>T. borealis</i>	10	1 y 24
		<i>T. elliotti</i> , <i>T. americanis</i> , <i>T. malaccensis</i>	44,5	1 y 24
		<i>T. thermophila</i> SB1969	44,5	1 y 24
		GFPMTT1, GFPMTT5	115	1 y 24
		Cd-ADAP, Cu-ADAP, Pb-ADAP	115	1 y 24 (MCT sólo en Cd-ADAP)
		MTT1KO, MTT5KD, MTT1KO+MTT5KD	44,5	1 y 24
Cu ²⁺	CuSO ₄ · 5 H ₂ O	<i>T. borealis</i> , <i>T. elliotti</i>	315	1 y 24
		<i>T. americanis</i> , <i>T. malaccensis</i>	315	1 y 24
		<i>T. thermophila</i> SB1969	315	1 y 24
		GFPMTT1, GFPMTT5	4.000	1 y 24
		Cd-ADAP, Cu-ADAP, Pb-ADAP	4.000	1 y 24 (MCT sólo en Cu-ADAP)
		MTT1KO, MTT5KD, MTT1KO+MTT5KD	315	1 y 24
Pb ²⁺	Pb(NO ₃) ₂	<i>T. borealis</i> , <i>T. elliotti</i>	965	1 y 24
		<i>T. americanis</i> , <i>T. malaccensis</i>	965	1 y 24
		<i>T. thermophila</i> SB1969	965	1 y 24
		GFPMTT1, GFPMTT5	5.500	1 y 24
		Cd-ADAP, Cu-ADAP, Pb-ADAP	5.500	1 y 24 (MCT sólo en Pb-ADAP)
		MTT1KO, MTT5KD, MTT1KO+MTT5KD	965	1 y 24
As ⁵⁺	Na ₂ HAsO ₄	<i>T. borealis</i> , <i>T. elliotti</i>	100	1 y 24
		<i>T. americanis</i> , <i>T. malaccensis</i>	100	1 y 24
Zn ²⁺	ZnSO ₄ · 7 H ₂ O	<i>T. borealis</i> , <i>T. elliotti</i>	2.000	1 y 24
		<i>T. americanis</i> , <i>T. malaccensis</i>	2.000	1 y 24

⁽¹⁾ Suministradas por la casa comercial Sigma.

5. AISLAMIENTO DE ÁCIDOS NUCLEICOS

5.1. Aislamiento de ADN genómico

El ADN genómico total (ADNg), principalmente constituido por ADN macronuclear, se aisló a partir de cultivos de *Tetrahymena* en fase exponencial tardía (1-3 x 10⁵ células/ml). Se aplicó el protocolo descrito en Martín-Platero *et al.* 2007, con las siguientes modificaciones: a-) Las células se recogieron por centrifugación a 2.000 rpm durante 3 minutos y b-) Previamente a la lisis celular, las células se incubaron con una mezcla (relación 2:1) del tampón NDS:Proteinasas K (6,7 mg/ml, Takara) (Tabla 10) durante un mínimo de 48h a 55°C en agitación. En este protocolo de aislamiento de ADNg se utilizan los tampones B y C (Tabla 10) y una posterior

precipitación con isopropanol y etanol absoluto. Finalmente, el ADN se resuspende en agua desionizada estéril y se mantiene congelado a -20°C hasta su utilización.

Las muestras de ADNg se trataron con RNasa A (0,1 mg/ml, Thermo Scientific) durante 2h a 37°C para eliminar la posible contaminación con restos de ARN. Su concentración y pureza ($A_{260\text{nm}}/280\text{nm}$) se determinaron espectrofotométricamente utilizando el Nanodrop-1000 (Thermo Scientific). Los valores de pureza obtenidos se encontraron dentro del intervalo óptimo 1,8 - 2,0. Por otro lado, la integridad de las muestras de ADNg se analizó mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1,5% en tampón TAE 1x (Tabla 10; apartado 8.1), donde el ADNg total de *Tetrahymena* se detecta como una única banda en el límite de resolución electroforética (Fig. 11A).

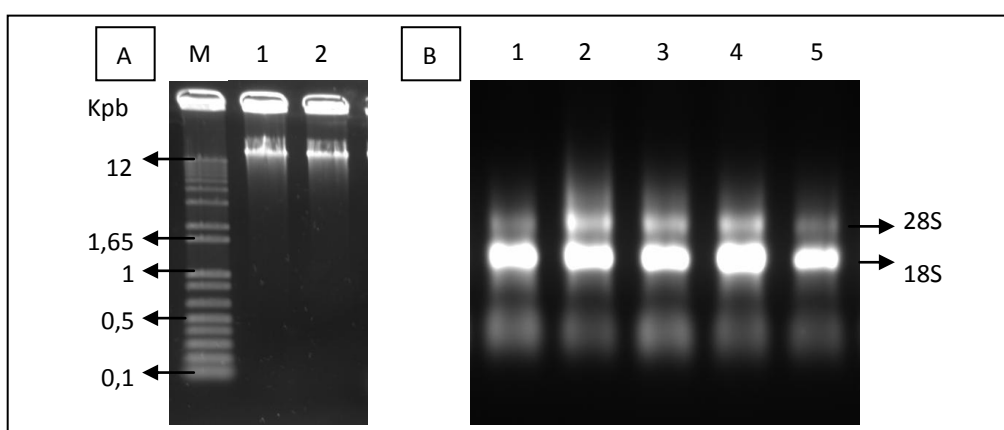


Fig. 11. Ejemplos de aislamientos de ADN genómico total (A) y ARN total (B). **(A):** M: marcador de tamaño *1 Kb Plus DNA Ladder* (Invitrogen), con un rango definido entre 0,1 y 12 Kpb; 1: ADNg de *T. borealis*; 2: ADNg de *T. americanis*. **(B):** Ejemplos de muestras de ARN total aisladas a partir de cultivos de *T. thermophila* tras ser expuestos a diferentes condiciones de estrés: 1: Tratamiento con Cd^{2+} 1h; 2: Tratamiento con Cu^{2+} 1h; 3: Tratamiento con Pb^{2+} 1h; 4: Tratamiento con Cd^{2+} 24h; 5: Tratamiento con Cu^{2+} 24h. La calidad del ARN se define utilizando como referencia los dos ARNs ribosómicos mayoritarios: ARNr 28S y 18S.

5.2. Aislamiento de ARN

Las muestras de ARN total se aislaron a partir de cultivos en fase exponencial tardía ($1-3 \times 10^5$ células/ml). Las células se recogieron por centrifugación a 2.000 rpm durante 3 minutos, y posteriormente se indujo la lisis celular adicionando el reactivo TRI Reagent (Molecular Research Center, MRC) a las muestras. El proceso de aislamiento se basa en la extracción de ARN con cloroformo y en su posterior precipitación con isopropanol. Finalmente, el ARN se disolvió en agua libre de RNasas y se mantuvo congelado a -80°C hasta su utilización. Además, con el fin de inactivar las posibles RNasas presentes, todo el material y las soluciones empleadas para el aislamiento y la manipulación del ARN se trataron previamente con dietilpicrocarbonato (DEPC) al 0,1% en agua bidestilada durante 24h a 37°C .

Las muestras de ARN se trataron con DNasa I (Roche) para eliminar la posible contaminación con ADN celular. Para ello, unos 20 µg de ARN se incubaron a 37°C durante 30 minutos con 10 unidades de la enzima DNasa I en su tampón correspondiente. Finalmente, se inactivó la DNasa al incubar las muestras de ARN durante 10 minutos a 75°C en presencia de EDTA 50mM pH 8. La concentración y la pureza ($A_{260\text{nm}}/280\text{nm}$) de las muestras de ARN se determinaron espectrofotométricamente utilizando el Nanodrop-1000 (Thermo Scientific). Los valores de pureza obtenidos estaban dentro del intervalo óptimo 1,8 - 2,1. La integridad de las muestras se determinó mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1,2% en condiciones desnaturalizantes (tampón FA 10x) (apartado 8.2; Tabla 10), utilizando como referencia la integridad de los ARNs ribosómicos (ARNr) mayoritarios (18S y 28S), mucho más abundantes que el resto de los ARNs (Fig. 11).

5.3. Aislamiento de ADN plasmídico (*miniprep*)

El ADN plasmídico se aisló utilizando el kit *QIAprep Spin Miniprep Kit* (Qiagen), según el protocolo recomendado por la casa comercial para células animales. Este kit se basa en la lisis celular mediante NaOH y posterior precipitación del ADN cromosómico junto con los restos celulares. El ADN plasmídico, presente en el sobrenadante, se pasa a través de una columna de fibra de vidrio donde queda retenido. Tras varios pasos de lavado, el ADN plasmídico es eluido en un tampón con una baja concentración de sales y se conserva a -20°C hasta su utilización.

5.4. Extracción de bandas de ADN de geles de agarosa

Esta técnica permite la purificación y separación del ADN correspondiente a bandas electroforéticas concretas (con un determinado tamaño) obtenidas tras los procesos de digestión mediante endonucleasas de restricción o mediante amplificación por PCR, en los que pueden aparecer varios subproductos de diferente tamaño y entre los cuales hay uno concreto que nos interesa.

Las bandas seleccionadas se cortaron con una cuchilla estéril bajo iluminación con luz UV. En este trabajo, se han utilizado dos kits distintos para la extracción de los fragmentos de ADN de los geles de agarosa: el kit *QIAquick Gel Extraction Kit* (Qiagen) y el kit *NucleoSpin Gel PCR Clean-Up* (Macherey-Nagel). Ambos kits se basan en el mismo fundamento y permiten, tras fundir la agarosa a 50°C en el tampón suministrado por la casa comercial, utilizar una columna de fibra de vidrio para retener y lavar los fragmentos de ADN escindidos, que posteriormente serán eluidos. El ADN aislado se conserva a -20°C hasta su utilización.

Tabla 10. Soluciones y tampones utilizados

Tampón	Composición	Aplicación
Tampón Tris HCl 0,01M pH 6,8	Tampón Tris HCl 0,01M (Amresco) Ajustado a pH 6,8 con HCl	Lavado y resuspensión de células
Tampón Tris HCl 1,5 M pH 8,8	Tampón Tris HCl 1,5 M (Amresco) Ajustado a pH 8,8 con HCl	Preparación del gel separador (electroforesis de proteínas)
Tampón Tris HCl 0,5 M pH 6,8	Tampón Tris HCl 0,5 M (Amresco) Ajustado a pH 6,8 con HCl	Preparación del gel concentrador (electroforesis de proteínas)
Tampón NDS 1x	Tris HCl 6,3 mM pH 8 (Amresco) EDTA 0,3 M pH 8 (Roth) SDS 0,63% (Panreac)	Tampón de lisis celular para el aislamiento de ADN genómico de <i>Tetrahymena</i>
Tampón B	Tris HCl 0,01 M pH 8 (Amresco) EDTA 0,1 M pH 8 (Roth) NaCl 0,01M (Panreac) SDS 1% (Panreac)	Aislamiento de ADN genómico de <i>Tetrahymena</i>
Tampón C	Acetato sódico 3M pH 5,2 (Calbiochem)	Aislamiento de ADN genómico de <i>Tetrahymena</i>
Tampón TAE 50x (Pronadisa)	Tris Acetato 2 M Na ₂ EDTA 100 mM	Tampón de electroforesis de ADN en geles de agarosa
Tampón FA 10x	MOPS 200 mM (Fisher Chemical) Acetato sódico 50 mM (Calbiochem) EDTA 10 mM (Roth) Ajustado a pH 7 con NaOH Se adiciona en el momento de utilizarse formaldehído 0,7% (Panreac)	Tampón de electroforesis de ARN en condiciones desnaturalizantes
Tampón de carga 5x para electroforesis de ARN	Glicerol 20% (Panreac) EDTA 4 mM pH 8 (Roth) Formaldehído 8,9 M (Merck) Formamina 30% (Merck) Tampón FA 2x Azul de bromofenol (Bio-Rad) (saturación)	Tampón de carga de muestras de ARN
Tampón de carga 4x para electroforesis de proteínas	Tris HCl 0,5 M pH 6,8 (Amresco) Glicerol (Panreac); SDS 10% (Panreac) Azul de bromofenol 0,5% (Bio-Rad) β-mercaptoetanol (Bio-Rad): añadido inmediatamente antes de su uso	Tampón de carga de muestras de proteínas
Tampón Tris Glicina SDS 10x (NzyTech)	Tris base 0,25 M Glicina 1,92 M SDS 1%	Tampón de electroforesis de proteínas SDS-PAGE
Solución de tinte (Azul de Coomassie)	Coomassie Blue R-250 al 0,2% (BioRad) Ácido acético glacial 12,5 % (Labkem) Metanol 19% (Panreac)	Tinción de geles de poliacrilamida
Solución de desteñido (Azul de Coomassie)	Metanol 36% (Panreac) Ácido acético glacial 9% (Labkem)	Desteñido de geles preteñidos con azul de Coomassie
Solución de fijación (marcaje fluorogénico)	Alcohol absoluto 30% (Panreac) Ácido acético glacial 7,5% (Labkem)	Fijación de geles de proteínas preteñidas con un agente fluorogénico
Tampón cacodilato	Cacodilato sódico 200 mM (TAAB) Ajustado pH a 7,2 con HCl 0,1N	Preparación de muestras para microscopía electrónica de transmisión

6. EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES

La extracción de las muestras de proteínas totales se realizó mediante el kit comercial *Proteaprep Bacterial and Mammalian Cell Lysis Kit* (ProteaBiosciences). Las células se recogieron por centrifugación (3 min a 2.000 rpm) y se lavaron con tampón Tris HCl 0,01 M pH 6,8. Posteriormente, se incubaron 10 minutos en hielo con el tampón de lisis (*Proteaprep Cell Lysis Buffer*) en presencia de un cóctel de inhibidores de proteasas (Biotool). Finalmente, se centrifugó el lisado celular (10 minutos, 12.000 g a 4°C) y se transfirió el sobrenadante (con las proteínas en solución) a un tubo eppendorf limpio y estéril. La concentración de proteínas y la pureza de las muestras (A_{260nm}/A_{280nm}) se cuantificó espectrofotométricamente utilizando el Nanodrop-1000. Las muestras se mantuvieron congeladas a -20°C hasta su utilización.

7. AMPLIFICACIONES BASADAS EN PCR

7.1. Cebadores utilizados

Los cebadores utilizados en este trabajo fueron sintetizados y purificados mediante cromatografía en fase reversa por las casas comerciales Invitrogen e IDT (*Integrated DNA Technologies*). Sus secuencias y características principales se detallan en las Tablas 11 y 12.

En la Tabla 11 se muestran los cebadores utilizados tanto en reacciones de PCR estándar como en el sistema 5'/3' RACE. Los cebadores degenerados (MET1/MET2 y MTCU1/MTCU2) fueron diseñados a partir de la secuencia aminoacídica de la CdMT TpyrMT-1 (Piccinni *et al.*, 1999) y de la secuencia nucleotídica de la CuMT *TtheMTT2* (Amaro *et al.*, 2008), respectivamente. Estos cebadores degenerados nos permitieron buscar nuevos genes codificantes de MTs en especies de *Tetrahymena* hasta ahora no exploradas. Igualmente, mediante técnicas de 5'/3' RACE (apartado 7.3) se completaron los correspondientes ADNc en sus extremos 5' y 3'. En la Tabla 12 se muestran los cebadores utilizados en reacciones de PCR cuantitativa, tanto en los estudios de expresión (qRT-PCR) (apartado 7.5.1) como en el cálculo del número de copias/ μ l (qPCR) (apartado 7.5.2).

7.2. PCR estándar

El volumen total de cada reacción de PCR fue de 50 μ l, conteniendo: el tampón de amplificación 1x (*PCR Gold Buffer*, Applied Biosystems), 2,5 mM de MgCl₂ (Applied Biosystems), 0,2 mM de los distintos dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) (Applied Biosystems), 0,2 μ M de los diferentes cebadores, 1,25 unidades de la enzima Taq ADN polimerasa (*AmpliTaq Gold DNA Polymerase*, Applied Biosystems) y 100-500 ng de ADN molde. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en el termociclador *Mastercycler gradient* (Eppendorf) utilizando el siguiente programa de PCR en gradiente de temperatura: 1 ciclo de 7 min a 94°C, 30 ciclos de 1 min a 94°C (fases de desnaturalización), 1 min a 50°C \pm 3°C (fase de re-naturalización) y 2 min a 72°C (fase de polimerización), y finalmente, un ciclo de 5 min a 72°C (fase de extensión final).

Tabla 11. Características y aplicaciones de los cebadores empleados en las reacciones de PCR estándar y en el sistema 5'/3' RACE

Cebador	Secuencia (5'-3')	Longitud (b)	%(G+C)	Tm (°C)	Aplicación
MET1*	AAVTGYTYGGWGAARAAY	21	42	49	Aislamiento de nuevas CdMTs
MET2*	TCRTRCARCARGCVYTRGCY	21	54	53	
MTCU1*	ATGGAYACTCAAACCTTCAAAC	21	35	49	Aislamiento de nuevas CuMTs
MTCU2	TTACAGTTGGAAGTAGAACCC	20	40	49	
AAP (Invitrogen)	GGCCACGCTCGACTAGTACGGGIIIGGGIIG	36	64	50	5'RACE de Cd- y CuMTs
TborMTT1-5RACE	CACCAGTACTGTGCAGCAT	20	55	57,6	5'RACE de la CdMT <i>TborMTT1</i>
TamerMTT1-5RACE	CAGGTTTCAGCATTAGCAA	20	45	54	5'RACE de la CdMT <i>TamerMTT1</i>
TamerMTT3-5RACE	TGCATTTGCAAGCAGAAGTC	20	45	54,2	5'RACE de la CdMT <i>TamerMTT3</i>
5RACE-PAT1	TTCTCAGTGCAACAATCC	19	47,4	52,8	5'RACE de la CdMT <i>TpatMTT1</i>
5RACE-PAT2	CAAGAGCATCCACTGTAGG	20	50	53	5'RACE de la CdMT <i>TpatMTT2</i>
MET1*	AAVTGYTYGGWGAARAAY	21	42	49	3'RACE de CdMTs (amplificación inespecífica)
MTCU1*	ATGGAYACTCAAACCTTCAAAC	21	35	49	3'RACE de CuMTs (amplificación inespecífica)
AP (Invitrogen)	GGCCACGCTCGACTAGTACT(T) ₁₆	37	35	50	3'RACE de Cd- y CuMTs
AUAP (Invitrogen)	GGCCACGCTCGAACTAGTAC	20	65	50	3'RACE de Cd- y CuMTs
BORZA	TGTACTGACTGTAATGCTGTAA	23	39,1	53,9	3'RACE de la CdMT <i>TborMTT2</i>
BOR7A	TGTAGCTCCTGCTAGTGTAGT	21	47,6	54,7	3'RACE de la CuMT <i>TborMTT7</i>
3RACE-BOR8	TTTCTGATGGTTGTAAAG	17	35,3	43,1	3'RACE de la CuMT <i>TborMTT8</i>
3RACE-ELLI2	GCTGTAAACCTGAATAA	17	35,3	43,2	3'RACE de la CdMT <i>TellimTT2</i>
3RACE-ELLI8	GACTTCAGCTGTAAAT	17	35,3	43,5	3'RACE de la CuMT <i>TellimTT8</i>
3RACE-TMALA1	TAGTGGATGCTGCTGTGTAG	21	47,6	54,5	3'RACE de la CdMT <i>TmalalMTT1</i>
3RACE-TMALA2	GGTTCTGCAGAGGAAGTAAAT	22	45,5	54,7	3'RACE de la CdMT <i>TmalalMTT2</i>
3RACE-TMALA3	GTGCTGCTGCTAGTGAAT	21	47,6	55	3'RACE de la CdMT <i>TmalalMTT3</i>
3RACE-TMALA4	TGAGTGAAGTGTGGACCTAATG	23	43,5	54,2	3'RACE de la CdMT <i>TmalalMTT4</i>
NTMALA5A	CGGATCCCACGCTGAAA	17	58,8	55,2	3'RACE de la CuMT <i>TmalalMTT5</i>
3RACE-PAT2	CCTAACAGTGGATGCTCTGG	20	50	53	3'RACE de la CdMT <i>TpatMTT2</i>
MTT1A-ORF	ATGGATAAAGTTAATAGCTGTTCG	24	33,3	51,4	3'RACE de las tres isoformas génicas de la CdMT <i>TtheMTT1</i> identificadas en el MTT5KD
5UTRMTT1A ¹	GAAAAAGCGCCGCTTAGTGACAAATGTTGAATGT	37	43,2	65,1	Amplificación de la región 5' UTR de la <i>TtheMTT1</i>
5UTRMTT1B ²	AAAACTGCAGGGATCATTGCATAAAATCGTGAAT	33	36,4	60,6	
3UTRMTT1A ³	CCCAAGCTTCATAATTGCATAAAAATCAGTTTCG	33	36,4	58,7	Amplificación de la región 3' UTR de la <i>TtheMTT1</i>
3UTRMTT1B ⁴	CCGCTCGAGTCCAAA GATGTTTATGAGATAAATACA	36	38,9	60,6	
5UTRMTT5A ¹	GAAAAAGCGCCGCTTGTAAATTTACAAAATCTAAT	38	34,2	61,4	Amplificación de la región 5' UTR de la <i>TtheMTT5</i>
5UTRMTT5B ²	AAAACTGCAGTGGTGAACCTCATGATTGATTTCAAG	35	37,1	60,5	
3UTRMTT5A ³	CCCAAGCTTTGCAATCAAATGAATGATTAA	30	33,3	57,1	Amplificación de la región 3' UTR de la <i>TtheMTT5</i>
3UTRMTT5B ⁴	CCGCTCGAGTTGAAATTCCTGATGATGTTT	31	45,2	62	
MTT1A-ORF	ATGGATAAAGTTAATAGCTGTTCG	24	33,3	51,4	Amplificación de los ORF completos de las diferentes isoformas génicas de <i>MTT1</i>
MTT1B-ORF	TCATTTACAACATTAACAAGTCTA	24	25	48,3	

(*) Cebadores degenerados, donde R = A o G; W = A o T; Y = C o T. Estos cebadores degenerados permitieron aislar nuevos genes MTs en especies de *Tetrahymena* hasta ahora no exploradas, así como completar los extremos 3' de algunas de las nuevas Cd- y CuMTs aisladas mediante el sistema RACE. Los cebadores AUAP, AAP y AP fueron suministrados en los kits comerciales 3' RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends (Invitrogen) y 5' RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends (Invitrogen). Tm: temperatura de fusión teórica para cada cebador. Algunos cebadores presentan en sus extremos 5' determinadas dianas de restricción: ⁽¹⁾ NotI (GC'GGCCGC), ⁽²⁾ PstI (CTGCA'G), ⁽³⁾ HindIII (A'AGCTT) o ⁽⁴⁾ XhI (C'TCGAG), que permiten que el producto amplificado por PCR se pueda insertar posteriormente en los vectores pNeo4 ó CHX.

Material y métodos

Por otro lado, para la creación de las construcciones genéticas necesarias para la obtención de las cepas *knockout* y/o *knockdown*, se utilizó una ADN polimerasa más rápida y fiable: la Pfx ADN polimerasa (*AccuPrime Pfx DNA Polymerase*, Invitrogen). En este caso, el volumen total de cada reacción de PCR también fue de 50 μ l, conteniendo: el tampón de amplificación al 1x (*AccuPrime Pfx Reaction Mix*, Invitrogen) que incorpora los dNTPs y el $MgCl_2$, 0,3 mM de los diferentes cebadores, 1,25 unidades de la enzima Pfx ADN polimerasa y 100-200 ng del ADN molde. Con esta enzima se utilizó el siguiente programa de PCR: 1 ciclo de 2 min a 95°C, 30 ciclos de 30 segundos a 95 °C (fase de desnaturalización), 30 segundos a 50 \pm 3°C (fase de re-naturalización) y 1 min a 68° (fase de polimerización) y, finalmente, un ciclo de 10 min a 68°C.

Tabla 12. Características de los cebadores empleados en las distintas reacciones de PCR cuantitativa

Cebador	Secuencia (5' - 3')	Longitud (b)	%(G+C)	Tm (°C)	Aplicación
ATUB1	TGTCGTCCCAAGGAT	16	56,2	52,8	qRT-PCR del gen de la α -tubulina
ATUB2	GTTCTCTGGTCTTGATGGT	20	45	52,1	
TtACT1	CTCTCTTTCTACCTTCCAACT	22	40,9	51,8	qPCR y qRT-PCR del gen de la β -actina
TtACT2	AGGACCAGATTCATCATATTC	21	38,1	49,3	
BOR1A	TGGATGTTGCTGTGTAAGTAA	21	38,1	51,8	qRT-PCR del gen <i>TborMTT1</i>
BOR1B	TACAAGCATCACCAGTACCT	20	45	53,1	
BOR2A	TGTACTGACTGTGAATGCTGTAA	23	39,1	53,9	qRT-PCR del gen <i>TborMTT2</i>
BOR2B	CACCCACTCTTAGGATCTGTGC	22	54,5	57,2	
BOR7A	TGTAGCTCCTGCTAGTGTAGT	21	47,6	54,7	qRT-PCR del gen <i>TborMTT7</i>
BOR7B	AGAAGCAGAGACACCACATTT	21	42,9	54,3	
ELLI6A	GGAACCTACTCTGCTCAACT	21	47,6	54,7	qRT-PCR del gen <i>TelliMTT6</i>
ELLI6B	TCAGAGCATCCACAAGGATTA	21	42,9	53,4	
Tam-MTT3A	CCAACCTTGCAGAAACT	17	47,1	50,5	qRT-PCR del gen <i>TamerMTT3</i>
Tam-MTT3B	TTAGTGTGAGATCCACATT	19	36,8	48	
NTMALA5A	CGGATCCACGCTGAAA	17	58,8	55,2	qRT-PCR del gen <i>TmalaMTT5</i>
NTMALA5B	TGGAGGTAGAACCACACTTG	20	50	54,1	
MTT1QA	ATGGATAAAGTTAATAGCTGTTGCTG	26	34,6	53,6	qPCR y qRT-PCR del gen <i>TtheMTT1</i>
MTT1QB	AAAGCAGCAGGGTTTAG	17	47,1	49,6	
MTT3QA	ACAATGTAATTGTGCTT	17	29,4	43,4	qPCR y qRT-PCR del gen <i>TtheMTT3</i>
MTT3QB	TAAGCAGCTGGATTTGA	17	41,2	48	
MTT5QA	TGTGTCGGTTCAGGAGAAGGA	21	52,4	57,8	qPCR y qRT-PCR del gen <i>TtheMTT5</i>
MTT5QB	AGGTCCGCATTTACATTCAGCTT	23	43,5	57	
MTT2QA*	ATGCAAATGTGGATCTC	17	41,2	46,7	qPCR y qRT-PCR de los genes <i>TtheMTT2</i> y <i>TtheMTT4</i> *
MTT2QB*	CAGTTGGAAGTAGAACC	17	47,1	46,6	
CYCLIC-A	GAAACGGACGAATAATATG	19	36,8	45,8	qPCR del gen CYCLIC ⁽¹⁾
CYCLIC-B	ATACGAAGGTCTCTTAATG	19	36,8	46	
TtAP1I-A	AAGCTCTAAAGCTAGTGCAA	20	40	51,6	qRT-PCR del gen <i>TtAP1-I</i>
TtAP1I-B	CATTTATGCTGATTTCGATT	20	30	46,3	
TtAP1II-A	TTGCATTTTGGTATGTC	18	38,9	48,3	qRT-PCR del gen <i>TtAP1-II</i>
TtAP1II-B	GCTCAAGAAAGCATTTACC	19	42,1	49,1	
TtAP1III-A	TGGAGCAACTGGAAGAAT	18	44,4	51	qRT-PCR del gen <i>TtAP1-III</i>
TtAP1III-B	GAACGATTTATACATGTGCTTA	22	31,8	48,5	
TtAP1IV-A	GAATAGCGGTAGTTAAG	17	41,2	43,5	qRT-PCR del gen <i>TtAP1-IV</i>
TtAP1IV-B	GTTGAGTTATCTATCTGG	18	38,9	43,5	

(*) Los cebadores MTT2QA y MTT2QB amplifican ambos genes codificantes de CuMTs *TtheMTT2* y *TtheMTT4*. Tm: temperatura de fusión teórica para cada cebador. Los fragmentos amplificados suelen presentar un tamaño dentro del rango 100-150 pb.

7.3. Sistema 5'/3' RACE (*Rapid Amplification of cDNA Ends*)

Esta técnica permite completar en sus extremos 5' y 3' las secuencias de ADNc previamente seleccionadas mediante el uso de cebadores degenerados. En este trabajo utilizamos dos kits comerciales: *3'RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends* (Invitrogen) y *5'RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends* (Invitrogen).

En ambos casos, en un primer paso se sintetiza la primera cadena de ADNc a partir de 5 µg de ARN total, utilizando la retrotranscriptasa *SuperScript II* (Invitrogen). En el sistema 3'RACE, en este primer paso se emplea el cebador adaptador (AP) (Tabla 11) que, debido a sus numerosos residuos de timidina, es capaz de unirse a la cola poli-A de todos los ARNs aislados. Sin embargo, en el sistema 5'RACE, la retrotranscripción se realiza con un cebador específico para cada una de las secuencias a completar (Tabla 11). Tras la reacción de retrotranscripción, se elimina el ARN que había servido de molde con un tratamiento de 30 minutos a 37°C con la enzima RNasa H (Invitrogen).

Posteriormente, en el sistema 3'RACE se amplifican los ADNc obtenidos mediante una PCR estándar, utilizando un cebador incluido en el kit (AUAP) junto con un cebador específico, diseñado para cada secuencia en concreto, o bien junto con los cebadores degenerados MET1 o MTCU1, que realizarán una amplificación inespecífica de Cd- o CuMTs, respectivamente (Tabla 11). Por otro lado, en el sistema 5'RACE, se debe añadir una cola de poli-dCTP en el extremo 5' de los ADNc obtenidos mediante la enzima TdT (*Terminal deoxynucleotidyl transferase*). A continuación, los ADNc se amplificarán por completo utilizando el cebador comercial AAP (con una cola de poli-dGTP) y el cebador específico para cada secuencia (Tabla 11).

7.4. RT-PCR

La síntesis de la primera cadena de ADNc a partir del ARNm se realizó según el protocolo indicado en el kit comercial *1st Strand cDNA Synthesis kit for RT-PCR* (AMV) (Roche). Nosotros utilizamos el cebador poli(dT)₁₅ en un volumen de reacción de 20 µl, conteniendo: el tampón de reacción 1x, 5 mM de MgCl₂, 1 mM de la mezcla de dNTPs, 1,6 µg del oligo(dT), 50 unidades del inhibidor de RNasas, 40 U de la retrotranscriptasa *MultiScribe Reverse Transcriptase* (Applied Biosystems) y 3,5 µg de ARN. La cantidad de ARN total empleada en cada reacción fue la misma con el fin de comparar distintas muestras (control y tratadas) obtenidas en los diferentes experimentos. Para ello, las muestras de ARN total fueron previamente cuantificadas espectrofotométricamente tal y como se describe en el apartado 5.2.

Las reacciones de retrotranscripción se llevaron a cabo en el termociclador *Mastercycler gradient* (Eppendorf) utilizando el siguiente programa: 10 min a 25°C, 60 min a 42°C y 5 min a 99°C. Los ADNc se conservaron congelados a -20°C hasta su amplificación mediante reacciones de PCR estándar o PCR cuantitativa.

7.5. PCR cuantitativa o a tiempo real

Las muestras de ADN (ADN genómico o ADNc) se amplificaron por duplicado en placas de 96 pocillos, empleándose el agente intercalante SYBR Green (Takara) como detector. Cada reacción de PCR contenía 4 µl de una dilución 10^{-1} de la correspondiente muestra y 16 µl de una mezcla maestra, compuesta por: SYBR Green 1x (Takara), el colorante Rox 1x, que se utiliza para normalizar la intensidad de la fluorescencia (Takara), agua estéril y la pareja de cebadores previamente diseñada (0,2 µM) (Tabla 12). La especificidad de cada pareja de cebadores se comprobó tanto mediante el análisis del amplicón por electroforesis en geles de agarosa y secuenciación, como con la construcción de curvas de disociación, que deben presentar un único pico correspondiente a un único producto de PCR (Fig. 12A). Las reacciones de PCR a tiempo real se han llevado a cabo en el equipo *iQ5 real-time PCR detection system* (Bio-Rad) de la Unidad de Genómica del CIB (Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC) y, en todos los análisis, se ha seguido el siguiente programa: 5 min a 95°C, 40 ciclos compuestos por las fases: 30 s a 95°C, 30 s a 55 °C y 20 s a 72°C, y finalmente 1 min a 95°C tras 1 min a 55°C.

Tanto en los estudios de expresión (qRT-PCR) como en los cálculos del número de copias/µl (qPCR), se construyeron curvas estándar utilizando diluciones decimales de determinadas muestras de ADN. Estas curvas se obtienen al representar los valores C_t frente al logaritmo de la cantidad de ADN molde de cada dilución (Fig. 12B). Los valores C_t (ciclo umbral o *cycle threshold*) representan el número de ciclos de PCR que son necesarios para alcanzarse el nivel mínimo de detección (umbral). Por lo tanto, cuanto mayor sea el nivel de expresión o el número de copias de un gen, menor será el valor C_t . La eficacia de amplificación de una pareja de cebadores puede calcularse a partir de la pendiente de su curva estándar, según la fórmula: Eficacia = $10^{(-1/pendiente)}$. Los parámetros de las curvas estándar, construidas para cada una de las cepas de *Tetrahymena* y de los genes analizados por qPCR, se recogen en la Tabla A1 (Anexo I).

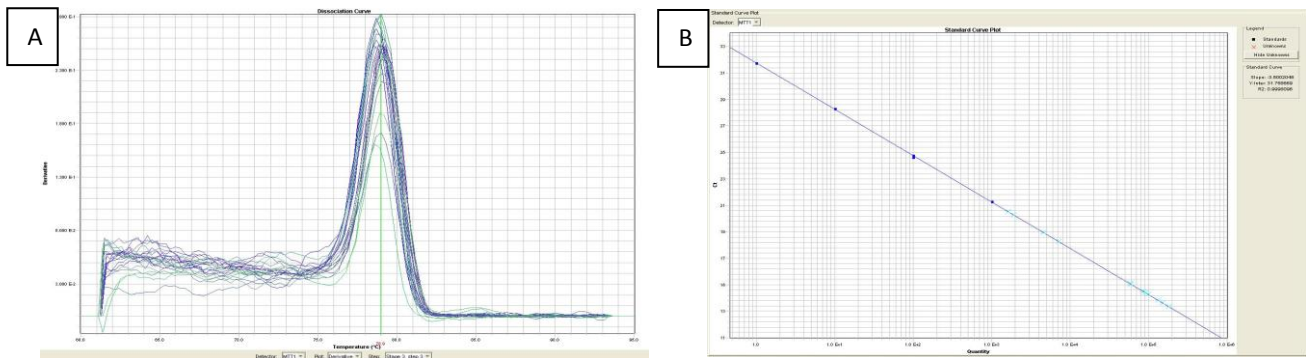


Fig. 12. (A) Ejemplo de curva de disociación obtenida en una reacción de PCR cuantitativa con los cebadores BOR1A y BOR1B (Tabla 12), que amplifican un fragmento del gen *TborMTT1*. La presencia de un único pico indica la amplificación específica de una única secuencia. Se obtuvieron curvas de disociación semejantes a ésta para todas las parejas de cebadores usadas en las reacciones de qRT-PCR y qPCR. **(B)** Ejemplo de curva estándar obtenida con cuatro diluciones decimales de ADNc control (no tratado) amplificado con los cebadores BOR1A y BOR1B. Las curvas se obtienen representando los valores C_t frente al logaritmo de la cantidad de ADN molde de cada dilución. La pendiente de la recta nos permite calcular la eficacia de la amplificación para una pareja de cebadores.

7.5.1 Estudios de expresión génica (qRT-PCR)

En los estudios de expresión de genes se amplifican diferentes muestras de ADNc (control y tratados) con distintos cebadores para comparar los niveles de inducción de los diferentes genes tanto en situaciones control como tras la exposición de las células a distintas condiciones de estrés. Como controles endógenos de expresión o genes normalizadores se han utilizado dos genes: α -tubulina y β -actina (Tabla 12). Además, en cada ensayo se incorporaron dos tipos de controles: a) Controles RT-, en los que se utiliza ARN como molde en lugar de ADNc para detectar la posible contaminación de las muestras de ARN con ADN genómico, por no haber sido eliminado correctamente tras el tratamiento con la DNasa I, y b) Controles NTC, que permiten detectar la posible contaminación de alguno de los componentes utilizados en la reacción así como la formación de dímeros por parte de los cebadores (*primer-dimers*). En estos controles NTC se sustituye el ADNc molde por agua-nanopura estéril.

Los resultados de los estudios de expresión (corroborados por cuadruplicado, con réplicas intra-placa e inter-placa) se analizaron según el método de cuantificación relativa de la curva estándar (Larionov *et al.*, 2005). Este método calcula la cantidad de cada gen en las diferentes muestras (controles y tratados) interpolando los valores C_t obtenidos en su curva estándar. Estos valores se normalizan con los controles endógenos de expresión y, posteriormente, comparando los valores obtenidos en las situaciones control y tras la exposición a estrés, se pueden definir los niveles de inducción de la expresión normalizados para cada gen en cada circunstancia concreta. Además, también se pueden comparar los niveles de expresión basal de los diferentes genes utilizando la fórmula: $2^{(C_{t1}-C_{t2})}$, donde C_{t1} y C_{t2} son los valores C_t de ambos genes calculados en una situación control (no estrés).

7.5.2. Cálculo del número de copias/ μ l de un gen (qPCR)

Para el cálculo del número de copias génicas se amplificaron por qPCR muestras de ADN genómico aisladas de las distintas cepas en situaciones control (no estrés). Previamente, todas las muestras de ADNg se ajustaron a una concentración de 1.000 ng/ μ l para poder comparar los resultados obtenidos. A partir de los valores C_t obtenidos, se calculó el número medio de copias/ μ l utilizando la siguiente ecuación: $C_t = \text{pendiente} \times \log(\text{número de copias}/\mu\text{l}) + \text{y-intercept}$ (Gong *et al.*, 2013). Los resultados se corroboraron al menos con dos experimentos independientes, cada uno realizado con duplicados.

8. MÉTODOS ELECTROFORÉTICOS

8.1. Electroforesis de ADN en geles de agarosa

Las electroforesis estándar de ADN se realizaron en geles de agarosa (Pronadisa) al 1,5% en tampón TAE 1x (Tabla 10), tal y como se describe en Sambrook and Russell, 2001. Los geles se corrieron en condiciones de voltaje constante (100 V) y amperaje variable durante unos 40 minutos y, posteriormente, se tiñeron con GelRed 3x (Biotium) en agitación durante 30

minutos. Finalmente, los geles se visualizaron bajo luz ultravioleta de 320 nm mediante el transiluminador *UVIpro Platinum System* (Durviz S.L.). Como marcador de tamaño molecular de ADN se empleó el *1Kb Plus DNA Ladder* (Invitrogen), que presenta un rango de tamaño comprendido entre 0,1 y 12 Kb.

8.2. Electroforesis de ARN en geles desnaturalizantes de agarosa

Las electroforesis de ARN se realizaron en geles de agarosa (Pronadisa) al 1,2% conteniendo formaldehído (Merck) al 0,7% como agente desnaturalizante, según el protocolo descrito en Sambrook and Russell, 2001. Las muestras de ARN se incubaron en el tampón de carga (5x) (Tabla 10) durante 3 minutos a 65°C para evitar la formación de estructuras secundarias. Posteriormente, se añadió a las muestras bromuro de etidio (Sigma) 1 µg/ml para su posterior visualización. Los geles se corrieron en un tampón de electroforesis específico (1x) (Tabla 10), en condiciones de voltaje constante (100 V) y amperaje variable durante 1h aproximadamente. Finalmente, los geles se visualizaron bajo luz ultravioleta de 320 nm mediante el transiluminador *UVIpro Platinum System* (Durviz S.L.). Todo el material y las soluciones empleadas se trataron con DEPC (Panreac) al 0,1% (v/v) en agua bidestilada con el fin de inactivar las RNasas presentes.

8.3. Electroforesis de proteínas en geles de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE)

Las electroforesis de proteínas se realizaron según el procedimiento descrito por Laemmli (1970) y utilizando el sistema vertical *Protean II Xi Cell* (Bio-Rad). Se emplearon geles de poliácridamida discontinuos o compuestos por dos fases: a-) un gel superior de entrada o concentrante, que permite que la mayoría de las proteínas entren a la vez en el gel separador y, por tanto, logra una mejor resolución de las bandas y b-) un gel inferior o separador, en el que se separarán las proteínas en función de su masa molecular. En la Tabla 13 se indica la composición de cada una de las fases de estos geles discontinuos.

Las muestras de proteínas se resuspendieron en el tampón de carga (Tabla 10) y se hirvieron a 95°C durante 4 minutos. El gel se cargó con 500 µg de proteína total para cada una de las muestras utilizando una jeringa Hamilton. Los geles se corrieron a amperaje constante (25-40 mA) y voltaje variable en tampón Tris Glicina SDS 1x (Tabla 10). Como patrones de masa molecular se utilizaron unos marcadores pre-teñidos con un rango de tamaño de 7,1-209 KDa (Bio-Rad).

8.3.1. Tinción con azul de Coomasie

Una vez finalizada la electroforesis, los geles de poliácridamida se tiñeron con azul de Coomassie (Bio-Rad) para la visualización de las bandas proteicas. Para ello, los geles se mantuvieron toda la noche en agitación inmersos en la solución de teñido (Tabla 10). Al día siguiente, se aplicó el proceso de desteñido manteniendo el gel durante unas 2-3h en agitación con la solución de desteñido (Tabla 10).

Tabla 13. Composición de los geles de poliacrilamida empleados en las electroforesis de proteínas

GEL SEPARADOR (12-15% de acrilamida:bisacrilamida, pH 8,8)	
Componentes	Volúmenes (ml) para geles al 15%
Agua destilada	5,86
Acrilamida:Bisacrilamida (29:1) (ICN Biomedicals; Sigma)	12,5
Tris HCl 1,5 M pH 8,8 (Amresco)	6,25
SDS 10% (Panreac)	0,250
Persulfato amónico 10% (Bio-Rad)*	0,125
TEMED (Sigma)*	0,0125
TOTAL	25
GEL CONCENTRADOR (4% de acrilamida:bisacrilamida, pH 6,8)	
Componentes	Volúmenes (ml) para geles al 4%
Agua destilada	6,1
Acrilamida:Bisacrilamida (29:1) (ICN Biomedicals; Sigma)	1,3
Tris HCl 0,5 M pH 6,8 (Amresco)	2,5
SDS 10% (Panreac)	0,100
Persulfato amónico 10% (Bio-Rad)*	0,050
TEMED (Sigma)*	0,010
TOTAL	10

(*): El persulfato amónico 10% y el TEMED se añaden al resto de los componentes tras desgasificar la mezcla durante 15 minutos con una bomba de vacío.

8.3.2. Marcaje fluorogénico de proteínas ricas en residuos tiol (-SH)

Asociado a la electroforesis de proteínas en geles SDS-poliacrilamida, se utilizó el kit comercial *MT PAGE Cell* (Ikzus) para el marcaje fluorogénico con monobromobimano (mBrB), que detecta los grupos -SH (reducidos) de proteínas como las metalotioneínas (MT). El mBrB, que no es una molécula fluorescente por sí misma, reacciona (alquilación) con los grupos tiólicos desplazando el bromo (Br) de la molécula y haciendo que el complejo Proteína-S-Bimano sea fluorescente (Peng *et al.*, 2012; Rudyk and Eaton, 2014). Las muestras de proteínas totales, aisladas según se indica en el apartado 6, se incubaron con el agente fluorogénico comercial (1 minuto a 65°C). Posteriormente, se añadió a las muestras el tampón de carga habitual (Tabla 10) y se prepararon de la forma previamente descrita (apartado 8.3). Tras la electroforesis, el gel se lavó dos veces con agua destilada y se fijó durante 30 minutos en agitación (Tabla 10). Por último, se visualizaron bajo luz ultravioleta (excitación a 320 nm/emisión 480 nm) las bandas correspondientes a aquellas proteínas ricas en residuos tiol marcadas con el fluorógeno mBrB.

9. CLONACIÓN DE FRAGMENTOS DE ADN Y TRANSFORMACIÓN DE *E. coli*

A excepción de la creación de las construcciones genéticas necesarias para la obtención de las cepas *knockout* y/o *knockdown*, en las que se utilizaron vectores específicos (*pNeo4* y *CHX*)

Material y métodos

tal y como se detalla en el apartado 3, la clonación de los demás productos obtenidos por PCR estándar y mediante las técnicas de 5'/3' RACE se llevó a cabo utilizando el vector *pCR 2.1* (Fig. 13) suministrado con el kit comercial *TA Cloning Kit* (Invitrogen). El proceso de ligación en este vector se basa en que los amplicones producidos por la enzima Taq ADN polimerasa presentan en sus extremos 3' un residuo de dATP. Este residuo genera extremos protuberantes con los que el fragmento amplificado puede unirse directamente con el vector, que a su vez tiene extremos 3'-T complementarios. Esta unión es sellada gracias a la acción de la enzima ADN ligasa T4 (*ExpressLink T4 DNA ligase*), suministrada en el mismo kit comercial.

Tanto las construcciones obtenidas con el plásmido *pCR 2.1* como las creadas con los vectores *pNeo4* o *CHX* se introdujeron en bacterias químicamente competentes (*E. coli* TOP10 ó *E. coli* DH5 α , respectivamente) mediante transformación por choque térmico. Para ello, tras incubar las bacterias competentes junto con el producto de la reacción de ligación (\approx 5 ng) durante 30 minutos en hielo, se llevó a cabo el choque térmico incubando las bacterias durante 30 segundos a 42°C e, inmediatamente después, manteniéndolas en hielo durante 5 minutos. A continuación, se añadieron 200 μ l del medio SOC (Tabla 6) a las bacterias transformadas, que se mantuvieron a 37°C durante 1h en agitación suave y, finalmente, se sembraron en césped sobre placas del medio LB agar (Tabla 6) suplementado con kanamicina (50 μ g/ml) o ampicilina (100 μ g/ml) según el vector empleado (Tabla 14). Estos antibióticos se utilizan como marcadores de resistencia y permiten la selección de los transformantes positivos. En el caso del vector *pCR2.1*, en el que el proceso de clonación no fue dirigido y, por tanto, las bacterias TOP10 podían transformarse con el vector recircularizado sin contener el inserto, la selección de colonias transformadas se realizó añadiendo Xgal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido) (40 μ g/ml) al medio LB-agar y analizando la actividad β -galactosidasa.

Tabla 14. Características y aplicación de los vectores utilizados en este trabajo

Plásmido	Marcadores	Aplicación	Procedencia
<i>pCR 2.1</i>	Amp ^R , Kn ^R plac-lacZ	Vector de clonación en <i>E. coli</i>	Invitrogen
<i>pNeo4</i>	Amp ^R , Pm ^R	Obtención de cepas <i>knockout</i> en <i>T. thermophila</i>	A. Turkewitz
<i>CHX</i>	Amp ^R , CHX ^R	Obtención de un doble mutante (KOMTT1 + KDMTT5) en <i>T. thermophila</i>	A. Turkewitz

Amp^R: gen de resistencia a ampicilina. Kn^R: gen de resistencia a kanamicina.

Pm^R: gen de resistencia a paromomicina. CHX^R: gen de resistencia a cicloheximida.

plac-lacZ: promotor y gen lacZ (codificante de la β -galactosidasa).

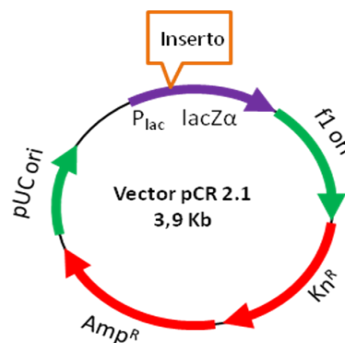


Fig. 13. Representación esquemática del vector *pCR 2.1* (Invitrogen).

Amp^R: gen de resistencia a ampicilina. Kn^R: gen de resistencia a kanamicina. P_{lac}-lacZ α : promotor y gen lacZ. pUC ori y f1 ori: orígenes de replicación.

El Xgal es un compuesto sacárido que puede ser hidrolizado por la enzima β -galactosidasa (codificada por el gen *lacZ*) a galactosa y 5-bromo-4-cloro-3-hidroindol. Éste último es

oxidado a 5,5'-dibromo-4-4'-dicloro-índigo, un compuesto azul insoluble. De esta forma, las colonias con el vector recombinante, en las que el inserto incorporado ha interrumpido el gen *lacZ*, presentan un color blanco mientras que las colonias con el vector no recombinante (sin el inserto incorporado y, por tanto, con el gen *lacZ* intacto) aparecen de color azul.

Los transformantes positivos se crecieron en el medio líquido LB en presencia del antibiótico seleccionador durante 16h a 37°C en agitación. Finalmente, tras la extracción del ADN plasmídico (apartado 5.3), la presencia del inserto se confirmó mediante la digestión de la construcción con determinadas endonucleasas de restricción: EcoRI (Takara) en el caso del vector *pCR 2.1* y las combinaciones NotI HF + PstI ó HindIII + XhoI para los vectores *pNeo4* o *CHX* según la región UTR clonada (consultar apartado 3).

10. SECUENCIACIÓN DE ADN

La secuenciación de los insertos introducidos en las construcciones plasmídicas se realizó tanto en la Unidad de Genómica de la Universidad Complutense de Madrid (UCM) como en el Centro de Secuenciación de ADN y Genotipado de la Universidad de Chicago (UCCCC-DSF), utilizando los cebadores estándar del bacteriófago M13 y los secuenciadores multicapilares *ABI Prism 3730/3730 XL DNA Analyzers* y *3130 Genetic Analyzer* (Applied Biosystems).

11. ANÁLISIS *IN SILICO* DE LAS SECUENCIAS NUCLEOTÍDICAS Y AMINOACÍDICAS

11.1. Análisis de similitud de las secuencias. Alineamiento múltiple y construcción de árboles filogenéticos

El análisis y la identificación de nuevas secuencias de metalotioneínas y de factores de transcripción del tipo AP-1 se realizó mediante la herramienta BLAST a partir de dos bases de datos: la del genoma de *Tetrahymena* (*Tetrahymena Genome Database Wiki*: <http://ciliate.org/>) (última consulta: febrero 2017) y la base de datos comparativa de *Tetrahymena* del Instituto Broad (*Tetrahymena Comparative Database*: <http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/Tetrahymena/MultiHome.html>) (última consulta: febrero 2014). Esta búsqueda fue posible gracias a que recientemente han sido secuenciados los genomas macronucleares de *T. ellioti*, *T. borealis* y *T. malaccensis*. Como secuencias de referencia para la búsqueda de nuevas MTs se utilizaron las secuencias aminoacídicas de las CdMTs TtheMTT1, TtheMTT3 y TtheMTT5 y de las CuMTs TtheMTT2 y TtheMTT4, previamente descritas en *T. thermophila*. Por otro lado, en el caso de la búsqueda de nuevos posibles factores de transcripción del tipo AP-1 se utilizaron como secuencias de referencia las ya conocidas en *T. thermophila*: TthebZIP1, TthebZIP2, TthebZIP3 y TthebZIP4. Igualmente, mediante el algoritmo *tblastn* y usando los parámetros establecidos por defecto, también se analizó bioinformáticamente el genoma macronuclear del ciliado parásito de peces *Ichthyophthirius multifiliis*, utilizando la herramienta BLAST de la base de datos de este

microorganismo (*Ichthyophthirius Genome Database Wiki*: <http://ich.ciliate.org/>) (última consulta: mayo 2015). Los números de acceso de todas las secuencias utilizadas en este trabajo incluidas las nuevas secuencias descritas se recogen en las Tablas A2-A5 del Anexo I.

En las nuevas secuencias nucleotídicas se localizaron los posibles ORFs (*Open Reading Frames* o marcos abiertos de lectura) mediante el programa ORF Finder (NCBI): <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/> (última consulta: abril 2016). Los alineamientos múltiples de las diferentes secuencias aminoacídicas se llevaron a cabo mediante el programa *T-Coffee* (*Tree-based Consistency Objective Function for Alignment Evaluation*) (Notredame *et al.*, 2000), utilizando el método de Clustal-Wallis y los parámetros establecidos por defecto.

La construcción de las matrices de identidad y de los árboles filogenéticos se realizó utilizando el programa MEGA 5.05. Se emplearon varios métodos de inferencia filogenética, tanto métodos basados en distancias filogenéticas (Neighbor joining, NJ) como métodos basados en caracteres (Máxima verosimilitud, ML y Máxima parsimonia, MP). En los tres casos se realizaron 2.000 réplicas de cada árbol, definiéndose así los valores *bootstrap* y construyendo un árbol consenso para cada uno de los algoritmos de inferencia seleccionados. Los valores *bootstrap* indican las probabilidades de que los miembros de un clado siempre pertenezcan a ese mismo clado e indican la fiabilidad de cada una de las ramas del árbol.

11.2. Análisis de motivos conservados en secuencias nucleotídicas

El análisis de motivos conservados relacionados con la regulación de la expresión génica en las regiones 5' y 3' UTRs de los ADNc de las nuevas MTs se realizó teniendo en cuenta aquellos motivos ya identificados previamente en las MTs de *T. thermophila* (Díaz *et al.*, 2007). Por otro lado, la búsqueda de nuevos motivos conservados en las regiones 5' UTR de los factores de transcripción del tipo AP-1 se llevó a cabo utilizando el programa MEME (*Multiple Em for Motif Elicitation*) v.4.11.2 (Bailey and Elkan, 1994).

11.3. Predicción de la estructura tridimensional (3D) de proteínas

La predicción de la estructura 3D de las metalotioneínas y de los factores AP-1 se llevó a cabo a partir de su secuencia aminoacídica utilizando el modo intensivo del programa informático *Phyre2* (Protein Homology/analogY Recognition Engine, Kelley *et al.*, 2015): (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index>) (última consulta: marzo 2017). Para la visualización de estas estructuras 3D se aplicó el programa *PyMOL Viewer* 1.7.4.5. (*PyMOL Molecular Graphics System*: <http://pymol.org/>) (última consulta: marzo 2017).

11.4. Otros análisis *in silico*

11.4.1. Diseño de cebadores

Los cebadores utilizados en las reacciones de PCR estándar, PCR cuantitativa y técnicas de 5'/3' RACE fueron diseñados utilizando la aplicación online *Primer Quest Tool* (IDT, *Integrated DNA Technologies*): <http://eu.idtdna.com/primerquest/home/index> (última consulta: enero 2017).

11.4.2. Análisis de los posibles factores de transcripción AP-1 en *Tetrahymena*

La composición aminoacídica y el cálculo aproximado de su masa molecular se realizaron utilizando la aplicación online *Protein Information Resource* (PIR) (http://pir.georgetown.edu/pirwww/search/comp_mw.shtml) (última consulta: octubre 2016) (Wu *et al.*, 2003). La identificación de posibles cremalleras de leucina y dominios *coiled-coil* en las secuencias aminoacídicas de estos factores de transcripción se hizo utilizando dos aplicaciones informáticas: *2ZIP-Server* (<http://2zip.molgen.mpg.de/>; Bornberg-Bauer *et al.*, 1998) (última consulta: octubre 2016) y *COILS* (http://embnet.vital-it.ch/software/COILS_form.html; Lupas *et al.*, 1991) (última consulta: octubre 2016). El programa *PSIPRED* (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>) (última consulta: octubre 2016) se utilizó para predecir la estructura secundaria de los hipotéticos motivos bZIP de los nuevos posibles factores de transcripción (Jones, 1999). La probabilidad de interacción entre las regiones *coiled-coil* de las diferentes isoformas de los factores bZIP se calculó mediante el programa informático *bZIP coiled-coil scoring form* (<http://compbio.cs.princeton.edu/bzip/>; Fong *et al.*, 2004) (última consulta: octubre 2016).

11.4.3. Análisis estadístico

Para determinar si las diferencias obtenidas entre los niveles de expresión genética bajo una situación de estrés y los correspondientes a su expresión basal (situación control) son estadísticamente significativas, se llevó a cabo un análisis estadístico de comparación de los valores medios de dos muestras independientes (prueba t de *Student*) utilizando el programa bioinformático *Statgraphics Centurion XVI* versión 16.1.15. Dependiendo del experimento, se fijó un P-valor $\leq 0,05$ ó $\leq 0,01$.

12. ESTUDIO DE LAS CINÉTICAS DE CRECIMIENTO

En el presente trabajo se han comparado las cinéticas de crecimiento de diferentes cepas de *T. thermophila*: las cepas control SB1969 y CU428, las tres cepas adaptadas a elevadas concentraciones de metal (Cd-ADAP, Cu-ADAP y Pb-ADAP) y las cepas *knockout* y/o *knockdown* (MTT1KO, MTT5KD y MTT1KO+MTT5KD). Se han ensayado diferentes condiciones: situaciones control, exposiciones a un metal (Cd²⁺, Cu²⁺ o Pb²⁺), e incluso, en el caso de las cepas

adaptadas, se han estudiado sus cinéticas de crecimiento tras exposiciones a la mezcla de dos metales. Las concentraciones utilizadas en cada ensayo según la cepa analizada se recogen en la Tabla 15.

Las curvas de crecimiento se obtuvieron midiendo con el espectrofotómetro los valores de absorbancia a 540 nm (A_{540nm}) de los cultivos a diferentes tiempos de incubación. Posteriormente, mediante la aplicación informática DMFit (ComBase, <http://browser.combase.cc/DMFit.aspx>) (última consulta: junio 2015), se construyeron las curvas de crecimiento según el modelo de Baranyi y Roberts (Baranyi and Roberts, 1994), representando los valores de la concentración celular (número de células/ml) en una escala logarítmica (logaritmos neperianos) respecto del tiempo de crecimiento. Para poder establecer una relación entre los valores de A_{540nm} y el número de células/ml de un cultivo, previamente se construyó una recta patrón o de calibrado en la que se relacionaron ambos parámetros. Para ello, se midió la A_{540nm} de varias diluciones de un cultivo control y se calculó su número de células/ml mediante el recuento con una cámara de Neubauer. La recta patrón que se utilizó en estos ensayos es: $y = 399,44x - 9,6277$, siendo "x" los valores de A_{540nm} e "y" el número de células/ml calculado para cada recuento en el microscopio. Tras el ajuste lineal realizado con todos los datos obtenidos, el coeficiente de correlación de Pearson (R^2) presentó un valor de 0,9967.

Tabla 15. Concentraciones de metales utilizadas en el estudio de las cinéticas de crecimiento

EXPOSICIONES SIMPLES (1 metal)			
Cepa	[Cd²⁺] (μM)	[Cu²⁺] (μM)	[Pb²⁺] (μM)
CU428	5	315	965
Cd-ADAP	115	4.000	5.500
Cu-ADAP	115	4.000	5.500
Pb-ADAP	NV	4.000	5.500
MTT1KO	5	315	965
MTT5KD	5	315	965
MTT1KO+MTT5KD	5	315	965
EXPOSICIONES DOBLES (2 metales)			
Cepa	[Cd²⁺]+[Cu²⁺] (μM)	[Cd²⁺]+[Pb²⁺] (μM)	[Cu²⁺]+[Pb²⁺] (μM)
Cd-ADAP	115+2.000	115+2.750	-
Cu-ADAP	57,5+4.000	-	4.000+2.750
Pb-ADAP	-	57,5+5.500	NV

NV: no viabilidad: bajo estas condiciones las células eran incapaces de crecer y no pudieron trazarse las correspondientes curvas de crecimiento. (-): ensayo no realizado: en el análisis de exposiciones metálicas dobles, las cepas adaptadas se exponen siempre al metal al que se encuentran adaptadas (en su concentración máxima tolerada) y a uno de los otros dos metales seleccionados.

Una vez obtenidas las curvas de crecimiento, se calcularon dos parámetros: la tasa específica o neperiana de crecimiento (μ) en h^{-1} y el tiempo de generación (T_g) en h. La μ se calcula como la pendiente de la recta obtenida a partir de los valores correspondientes a la fase exponencial de crecimiento (fase lineal). Por otro lado, el tiempo de generación (T_g) se calcula a partir de la μ utilizando la siguiente fórmula: $T_g = (\ln 2)/\mu$.

13. ANÁLISIS MICROSCÓPICO DE DIFERENTES CEPAS DE *T. thermophila*

13.1. Análisis mediante microscopía de fluorescencia

Se han utilizado dos fluorocromos diferentes: DAPI y Leadmium (consultar los siguientes apartados). En todos los casos las muestras se prepararon a partir de cultivos en fase exponencial tardía. Las células se recogieron por centrifugación (2.000 rpm, 3 min) y se resuspendieron en 1 ml de tampón TrisHCl 0,01 M pH 6,8.

13.1.1 Microscopía de fluorescencia con DAPI

El fluorocromo DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol dihidrocloruro) (Sigma) se une específicamente a las moléculas de ADN emitiendo en color azul. En este trabajo hemos comparado el sistema nuclear de las células control SB1969 con el de las cepas Cd-ADAP, Cu-ADAP y Pb-ADAP, con el fin de detectar posibles alteraciones morfológicas en ellos. Para lo cual, todas las suspensiones celulares fueron expuestas durante cinco minutos a una solución acuosa de DAPI a una concentración final de 0,1 µg/ml. Posteriormente, las células fueron fijadas con una solución de paraformaldehído al 4% (Roth) y se montaron sobre portaobjetos de polilisina (Electron Microscopy Sciences) utilizando la solución de montaje Fluoro-Gel (Electron Microscopy Sciences). La observación de los núcleos se hizo teniendo en cuenta las longitudes de onda de excitación (340 nm) y emisión (488 nm) de este fluorocromo. Las preparaciones fueron observadas utilizando un microscopio láser confocal modelo Olympus FV1200 perteneciente al CAI de Citometría y Microscopía de Fluorescencia de la Universidad Complutense de Madrid.

13.1.2 Microscopía de fluorescencia con el fluorocromo Leadmium Green AM Dye

El Leadmium Green AM Dye (Life Technologies) es un fluorocromo que se une específicamente a los acúmulos intracelulares de cadmio y plomo, emitiendo en color verde. El ensayo con este fluorocromo se llevó a cabo en las cepas Cd-ADAP y Pb-ADAP. El Leadmium Green AM Dye se disuelve en DMSO y se preparó una solución stock a una concentración de 0,1 µg/µl. Las células se trataron con una concentración final de 0,5 ng/µl durante 40 minutos a 37°C. Las observaciones en el microscopio confocal se hicieron *in vivo* teniendo en cuenta las longitudes de onda de excitación (490 nm) y emisión (520 nm) de este fluorocromo.

13.2. Análisis mediante microscopía electrónica de transmisión (MET)

Se han estudiado por MET varias cepas de *T. thermophila*: la cepa control SB1969, las cepas adaptadas a elevadas concentraciones de metal (Cd-ADAP, Cu-ADAP y Pb-ADAP) y estas mismas cepas tras mantenerlas 1 mes sin la exposición a metal, y posteriormente volverlas a tratar durante 24h con las máximas concentraciones tolerables para cada metal (Cd²⁺ 115 µM, Cu²⁺ 4 mM y Pb²⁺ 5,5 mM).

Material y métodos

Las muestras se procesaron según el protocolo descrito en Asai and Forney (2000). Para ello, las células se fijaron durante 1h en oscuridad con una solución de glutaraldehído (Sigma) al 2,5% en tampón cacodilato sódico 200mM pH 7,2 (TAAB) (Tabla 10). Tras lavar varias veces las células se realizó una post-fijación de las mismas con una solución de tetróxido de osmio (TAAB) al 0,5% en tampón cacodilato sódico (45 minutos en hielo). Las células fijadas se contrastaron con una solución de acetato de uranilo al 1% (TAAB) y, tras deshidratarse en una serie de lavados con concentraciones crecientes de acetona (25%, 50%, 75% y 100%), se llevó a cabo su inclusión en resina Embed 812 (TAAB), preparada según las instrucciones del fabricante.

Las muestras fueron procesadas en el Centro Nacional de Microscopía Electrónica (CNME). La integridad celular, tras los procesos de fijación e inclusión en la resina, se comprobó mediante la observación directa al microscopio óptico (Olympus BX50) de cortes semifinos de las muestras teñidos con azul de toluidina al 1% (Fig. 14). Posteriormente, mediante un ultramicrotomo (*Ultracut*, Reichert-Jung) se obtuvieron cortes ultrafinos que se montaron en las rejillas para MET. Los cortes montados fueron contrastados con acetato de uranilo al 2% en agua bidestilada y con la solución de Reynolds de citrato de plomo. En el caso de las muestras de la cepa Pb-ADAP, el contraste final se llevó a cabo sólo con acetato de uranilo. Finalmente, las muestras fueron observadas en el microscopio electrónico de transmisión *JEM 1010* (JEOL) a 80 kV. Las imágenes fueron captadas con una cámara *Megaview II*.

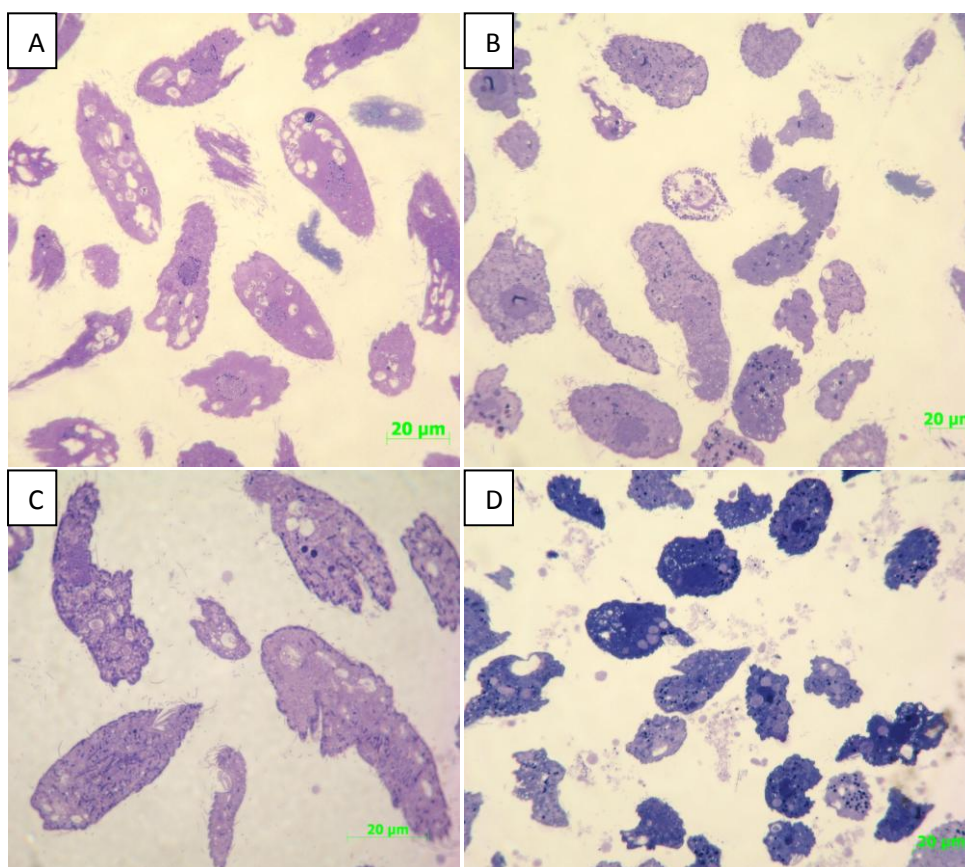


Fig 14. Micrografías obtenidas al microscopio óptico Olympus BX50 de cortes semifinos. (A): muestra control (cepa SB196) (600x). (B): muestra de la cepa Cd-ADAP (600x). (C): muestra de la cepa Cu-ADAP (1.000x). (D): muestra de la cepa Pb-ADAP (600x). Se indica la escala en micras.

13.3. Microanálisis al MET

La composición química metálica de los gránulos o agregados detectados en la cepa Pb-ADAP se analizó por microanálisis. Para ello, las células se fijaron con glutaraldehído al 2,5% de forma similar a como se ha explicado previamente. En este caso, las células no pueden fijarse con tetróxido de osmio ni contrastarse con acetato de uranilo sino que simplemente se lavan con tampón cacodilato y posteriormente se deshidratan e incluyen en la resina. Estas muestras también se procesaron en el Centro Nacional de Microscopía Electrónica (CNME) y se observaron utilizando el microscopio electrónico *JEM 2100HT* (JEOL) a 200 kV. Este microscopio presenta incorporado un sistema de microanálisis por XEDS (*X-Ray Energy Dispersive Spectroscopy*) (Oxford INCA) que nos permitió conocer la composición química metálica de los gránulos de interés.

14. ANÁLISIS POR CITOMETRÍA DE FLUJO

14.1. Cálculo de los valores CL₅₀

Los valores CL₅₀ indican la concentración de un tóxico a la que se produce la mortalidad del 50% de la población celular. Este parámetro se calculó por citometría de flujo para los tres metales (Cd²⁺, Cu²⁺ y Pb²⁺) en las diferentes cepas de *T. thermophila*: la cepa control CU428, las tres cepas adaptadas (Cd-ADAP, Cu-ADAP y Pb-ADAP) y las tres cepas *knockout* y/o *knockdown* (MTT1KO, MTT5KD y MTT1KO+MTT5KD).

Las muestras se prepararon a partir de cultivos de 100 ml en fase exponencial tardía (1-3 x 10⁵ células/ml). Las células se recogieron por centrifugación (2.000 rpm, 3 minutos) y se lavaron con tampón TrisHCl 0,01M pH 6,8, en el que quedaron resuspendidas. En estas condiciones, las células se mantuvieron en reposo durante al menos 15 minutos, permitiendo así que las células muertas precipitasen y que sólo quedasen en suspensión las células vivas, pudiendo separarlas fácilmente tomando la parte superior de la solución celular. La suspensión de células vivas se repartió en alícuotas de 1ml/tubo estéril. Se dejaron tres tubos sin tratar, correspondientes a los controles del citómetro, y los demás se trataron con el metal de interés en un rango de concentraciones crecientes. Todas las exposiciones a metal se realizaron a 30°C durante 24h en tampón TrisHCl 0,01M pH 6,8. Cada ensayo se repitió al menos 4 veces para corroborar los resultados y en todos ellos se introdujeron réplicas de cada tubo.

La mortalidad celular debida al tratamiento con el metal fue estimada añadiendo a la suspensión celular el fluorocromo yoduro de propidio (IP) (Sigma) a una concentración final de 5 µg/ml. Este fluorocromo se intercala en los ácidos nucleicos de doble cadena, incrementando sensiblemente su fluorescencia. La membrana de las células vivas no permite su paso al interior del citoplasma y, por tanto, el IP únicamente teñirá las células que tengan dañada su membrana (células muertas o muy alteradas) y los núcleos aislados de células lisadas (Haugland *et al.*, 2002). La fluorescencia del IP fue evaluada en el Centro de Citometría y Microscopía de Fluorescencia de la UCM mediante el citómetro de flujo FACScalibur (Becton and Dickinson) equipado con el software Cell Quest. La fluorescencia (roja) producida por el IP excitado con un láser de argón se recogió en el canal FL3 (670 nm LP). Además, se utilizaron

Material y métodos

tres tipos de muestras control: a-) Blanco: se trata de células no expuestas a metal y libres de IP que permiten calibrar el citómetro y definir la posible autofluorescencia de nuestras muestras; b-) Control positivo o control de vivas: son células no expuestas a metal pero conteniendo IP y, por tanto, nos permite evaluar la mortalidad basal de la muestra, no relacionada con el tratamiento con metal y c-) Control negativo o control de muertas: son células fijadas con formaldehído al 37% y conteniendo IP; este control nos permite comprobar que el citómetro está funcionando correctamente y detecta como muertas las células que sí lo están (Fig. 15).

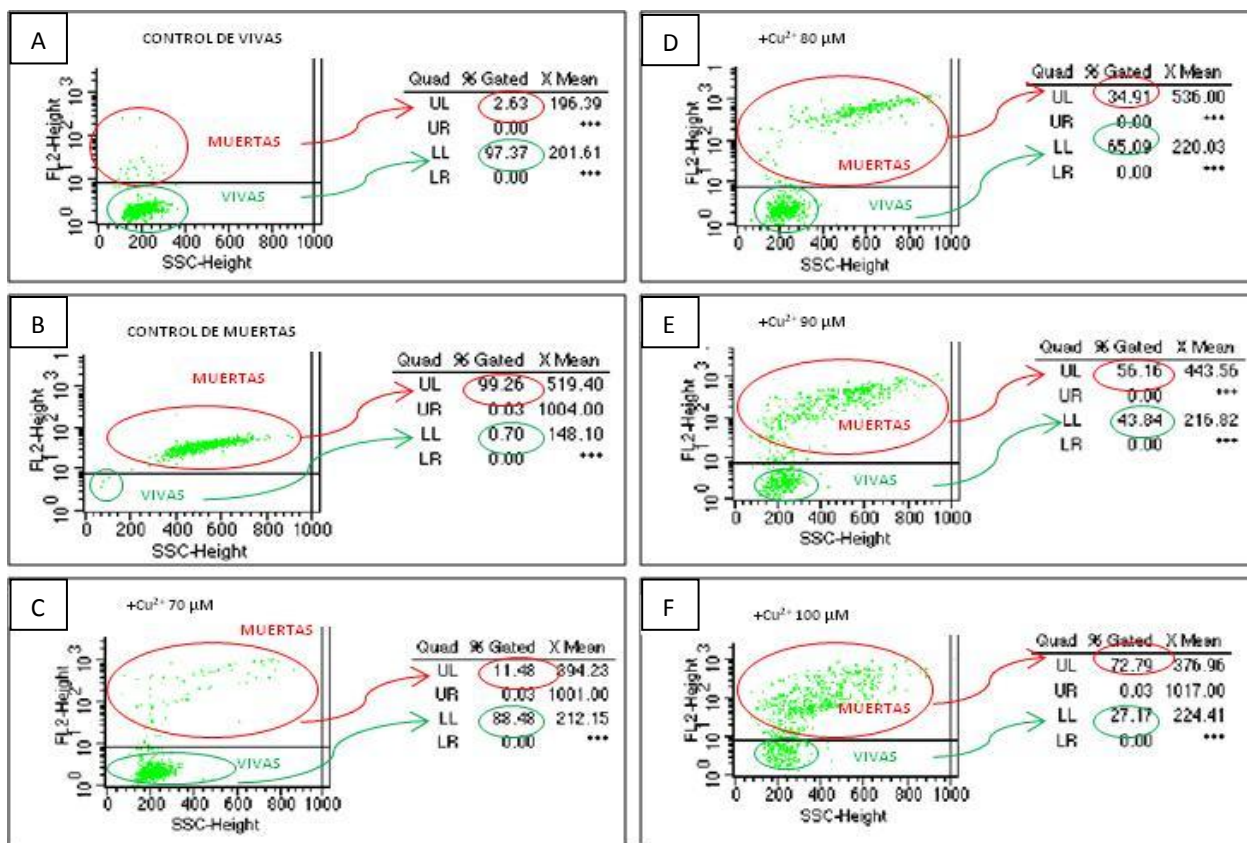


Fig. 15. Ejemplo de los resultados obtenidos por citometría de flujo. Se utilizó el fluorocromo yoduro de propidio (IP) para diferenciar las células vivas (IP negativo, señaladas con un círculo verde) de las células muertas (IP positivo, señaladas con un círculo rojo). (A): Control de vivas o control positivo: células no expuestas a metal. (B): control de muertas o control negativo: células fijadas con formaldehído al 37%. (C-F): células expuestas a concentraciones crecientes de Cu²⁺ (24h). Se observa el aumento progresivo de la mortalidad celular.

14.2. Aplicación de los valores CL₅₀ en los tratamientos con metales usados en los estudios de expresión

Los valores de CL₅₀ para diferentes metales se conocen en *T. thermophila* (Gallego *et al.*, 2007). Sin embargo, éstos no han sido calculados para otras especies utilizadas en el presente trabajo, tales como: *T. ellioti*, *T. americanis*, *T. malaccensis* y *T. borealis*. La citometría de flujo

también se utilizó para comprobar que los tratamientos con metales utilizados en los estudios de expresión de las nuevas MTs descritas en especies de *Tetrahymena* diferentes a *T. thermophila* eran realmente sub-letales y, por lo tanto, causaban bajos niveles de mortalidad celular. Las muestras se prepararon y analizaron de forma similar a como se ha explicado previamente (véase apartado 14.1), seleccionando un rango de concentraciones metálicas por debajo de la CL₅₀.

15. ENSAYOS SOBRE LA CAPACIDAD BIORREMIADORA DE LAS CEPAS ADAPTADAS

Como una primera aproximación sobre la posible capacidad biorremediadora de las cepas adaptadas a elevadas concentraciones de metal (Cd-ADAP, Cu-ADAP y Pb-ADAP), hemos realizado algunos experimentos de la retirada del metal contaminante del medio por la presencia de las cepas adaptadas.

15.1. Cálculo de la cantidad de metal retirado del medio por las cepas adaptadas

En este análisis se calculó la cantidad de metal que son capaces de retirar del medio las cepas adaptadas. Para ello, se utilizó la técnica de espectrometría de emisión óptica con plasma de acoplamiento inductivo (ICP-OES) (CAI de Técnicas Geológicas de la Universidad Complutense de Madrid), que permitió calcular la cantidad de metal (Cd²⁺, Cu²⁺ o Pb²⁺) presente en el medio y comparar las medidas obtenidas tanto antes como después de mantener las cepas adaptadas en presencia del metal durante 24 y 48h.

Se partió de cultivos en fase exponencial tardía ($1-3 \times 10^5$ células/ml) crecidos en el medio PP210 durante 24h en ausencia de metal. Posteriormente, las células se recogieron por centrifugación (2.000 rpm, 3 minutos) y se lavaron con agua bidestilada estéril. Las exposiciones a metal (6 μM Cd²⁺, 20 μM Cu²⁺ y 200 ó 500 μM Pb²⁺, respectivamente) se llevaron a cabo en agua bidestilada estéril para evitar que el medio pudiese quelar parte del metal biodisponible para las células. Antes de añadir nuestras células a la solución de metal, se tomó una alícuota de ésta (muestra a t_0) y se midió el contenido inicial de metal (control negativo). Posteriormente, tras mantener nuestras cepas en estas soluciones metálicas, se tomaron alícuotas del cultivo tanto a 24h (t_{24}) como a 48h (t_{48}). Dichas alícuotas se centrifugaron para eliminar las células presentes en las mismas y se midió el contenido de metal que permanecía en los sobrenadantes mediante ICP-OES. Se realizaron réplicas para todas las medidas realizadas.

15.2. Bioensayos sobre el nivel de toxicidad del metal no retirado por las cepas adaptadas

Las células adaptadas se crecieron en el medio PP210 durante 5 días en presencia de las máximas concentraciones toleradas (MCT) (115 μM Cd²⁺, 4 mM Cu²⁺ ó 5,5 mM Pb²⁺). Tras este periodo de exposición al metal, se tomaron los sobrenadantes de estos cultivos (tras eliminar

Material y métodos

todo el contenido celular) y se expusieron a células control SB1969 (no adaptadas) durante 24h. En el caso de la cepa Pb-ADAP, en cuyos tubos se observa la formación de un pellet denso tras estos 5 días de cultivo, también se extrajo dicho pellet e igualmente se expuso a las células control. Finalmente, tras 24h de exposición a estos sobrenadantes o pellet, se calculó el porcentaje de mortalidad celular mediante citometría de flujo (apartado 14) con el fin de conocer el grado de mortalidad o toxicidad de la muestra tras haberse retirado supuestamente parte del metal del medio por las cepas adaptadas. Como controles negativos, se expusieron las células no adaptadas o control (cepa SB1969) a los valores CL_{50} obtenidos para cada una de las cepas adaptadas.

Introducción

Objetivos

Material y Métodos

Resultados

Discusión

Conclusiones

Cuestiones por resolver en el futuro

Bibliografía

Anexos

RESULTADOS

A.- AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE NUEVAS ISOFORMAS DE METALOTIONEÍNAS EN DIFERENTES ESPECIES DE *TETRAHYMENA*

A.1. Aislamiento y caracterización de nuevos genes codificantes de CdMTs

La utilización de los cebadores degenerados MET1 y MET2 (Tabla 11) permitió la obtención de nuevos potenciales genes codificantes de CdMTs a partir de cuatro especies diferentes del género *Tetrahymena*. Estos nuevos genes han sido denominados como: *TpatMTT1* y *TpatMTT2* (aislados de la especie *T. patula*), *TelliMTT1* (aislado de *T. ellioti*), *TborMTT1* (aislado de *T. borealis*) y *TamerMTT1* y *TamerMTT2* (aislados de *T. americanis*). El resto de los genes CdMTs descritos en este trabajo se identificaron inicialmente mediante el análisis *in silico* de los genomas macronucleares actualmente secuenciados de tres especies de este ciliado: *T. ellioti* (*TelliMTT2*), *T. borealis* (*TborMTT2*) y *T. malaccensis* (*TmalaMTT1*, *TmalaMTT2*, *TmalaMTT3* y *TmalaMTT4*). Por lo tanto, se aportan en total 12 nuevos genes CdMTs que, sumados a los 14 previamente conocidos y aislados de diferentes especies de *Tetrahymena*, hacen un total de 26. Estos nuevos 12 genes constituyen el 46% del total de las CdMTs conocidas actualmente en ciliados.

En la Fig. 16 se muestra el alineamiento de las secuencias aminoacídicas de todas las CdMTs conocidas hasta la actualidad dentro del género *Tetrahymena*, incluyendo las nuevas secuencias obtenidas en este trabajo. Se observa que todas las nuevas CdMTs (cuyas secuencias están completas excepto para la CdMT *TamerMTT2*, de la que no se pudo obtener el extremo 5') se ajustan al patrón modular/submodular característico de la subfamilia 7a. Este patrón modular/submodular tan característico de las CdMTs de *Tetrahymena* viene definido por la existencia de dominios de cisteínas altamente conservados (Gutiérrez *et al.*, 2009; Gutiérrez *et al.*, 2011). Concretamente, *TpatMTT1*, *TborMTT1*, *TmalaMTT4* y *TamerMTT1* tienen una estructura bimodular (dos módulos), en la que se distingue en todas ellas un primer módulo formado por dos submódulos de tipo 1 (sm1) y un submódulo de tipo 2 (sm2). Estas cuatro secuencias se diferencian, sin embargo, en la estructura del segundo módulo, que puede ser igual a la del primero (*TpatMTT1*, *TborMTT1*) o con el submódulo tipo 2 incompleto (*TmalaMTT4* y *TamerMTT1*) (Fig. 16). Sin embargo, la mayoría de las nuevas CdMTs presentan una estructura trimodular: *TborMTT2*, *TelliMTT1*, *TelliMTT2*, *TmalaMTT1*, *TmalaMTT2*, *TpatMTT2* y *TamerMTT2*. Finalmente, la secuencia *TmalaMTT3* presenta una estructura compuesta por cuatro módulos (tetramodular) (Fig. 16). Considerando todas las CdMTs de *Tetrahymena* descritas hasta hoy, la longitud de los módulos oscila entre 32 y 63 aminoácidos y éstos se unen mediante regiones conectoras o *linkers* de 2-9 aminoácidos (Fig. 16).

Como se muestra en la Tabla 16, las nuevas CdMTs presentan los motivos de cisteínas (C) típicos de las CdMTs del género *Tetrahymena*, entre los que predominan las agrupaciones CCC (que engloban al $\approx 32\%$ de las cisteínas) y XCCX (que reúnen al $\approx 35\%$ de las cisteínas), siendo "X" cualquier otro aminoácido. Además de las agrupaciones mayoritarias (CCC y XCCX), las CdMTs de *Tetrahymena* presentan otras agrupaciones de cisteínas como CXCC, CXC, XXCXX o CXCXC.

Tabla 16. Distribución de las agrupaciones de cisteína entre las CdMTs del género *Tetrahymena*

CdMT	CCC	CXCC	CXCXC	XCCX	CXC	XXCXX	Nº total Cys por MT	% Cys en cada MT	Longitud total (aa) ⁽¹⁾
TpigMT-1	4	2	0	6	2	0	34	28,81	118
TpyrMT-1	4	2	0	5	1	1	31	28,97	107
TpyrMT-2	6	5	0	6	4	1	54	29,83	181
TtheMTT1	6	3	0	8	2	1	48	29,63	162
TtheMTT3	2	2	1	9	3	3	42	25,93	162
TtheMTT5	1	1	0	5	1	6	24	24,24	99
TrosMTT1	4	2	0	6	2	0	34	30,09	113
TtroMTT1	6	3	0	8	2	0	47	30,13	156
TmobMT1	6	3	0	9	3	0	51	29,65	172
TvorMT1	6	3	0	8	2	1	48	28,40	169
ThegMT1	4	2	0	6	2	0	34	27,87	122
ThegMT2	4	1	0	8	7	4	49	25,65	191
ThegMT3	6	3	0	9	3	0	51	28,65	178
ThegMT4	5	1	0	8	6	4	50	25,91	193
TborMTT1	4	2	0	6	2	0	34	30,09	113
TborMTT2	5	2	2	9	1	2	49	30,06	163
TelliMTT1	6	3	0	7	1	2	45	29,22	154
TelliMTT2	6	3	0	6	0	3	42	28,97	145
TmalaMTT1	6	3	0	8	2	1	48	29,63	162
TmalaMTT2	5	3	0	8	1	2	44	27,16	162
TmalaMTT3	2	2	0	12	2	6	46	25,70	179
TmalaMTT4	1	1	0	7	1	3	25	25,25	99
TpatMTT1	4	2	0	6	2	0	34	29,06	117
TpatMTT2	4	2	0	6	3	3	39	26,35	148
TamerMTT1	4	2	0	5	1	1	31	29,25	106
TamerMTT2	6	3	0	8	2	1	48	30,57	157
TOTAL Cys/ Valores medios ⁽²⁾	351	183	9	378	116	45	1082	28,27	147
% Cys ⁽³⁾	32,44	16,91	0,83	34,94	10,72	4,16	100		

Las 12 nuevas CdMTs descritas en este trabajo aparecen destacadas en naranja. Sombreadas en gris se indican las agrupaciones de cisteínas más abundantes. C: cisteína; X: cualquier otro aminoácido. ⁽¹⁾ Longitud total (aa) de las proteínas inferidas a partir de las secuencias nucleotídicas obtenidas. ⁽²⁾ Número total de residuos de cisteínas que forman parte de cada tipo de agrupación y valores medios de los porcentajes de Cys y longitudes totales. ⁽³⁾ Porcentaje de residuos de cisteína en cada tipo de agrupación.

Las longitudes de las CdMTs de *Tetrahymena* oscilan entre 99 y 193 aminoácidos, siendo 147 aminoácidos la longitud media de estas proteínas. El número total de cisteínas que presenta cada molécula se sitúa entre un mínimo de 24 (como es el caso de la CdMT TtheMTT5, que junto con la TmalaMTT4 son las CdMTs más pequeñas (99 aa) dentro de las conocidas en el género *Tetrahymena*) y un máximo de 54 [correspondiente a la CdMT TpyrMT-2, que es la única que presenta una estructura formada por cinco módulos (Fig. 16)]. Por consiguiente, las cisteínas suponen entre el 24,24% y el 30,57% de la longitud total de las CdMTs de *Tetrahymena* (Tabla 16).

A.2. Aislamiento y caracterización de nuevos genes codificantes de CuMTs

En este trabajo se describen 9 nuevas CuMTs dentro del género *Tetrahymena*. Algunas de ellas se obtuvieron mediante la amplificación por PCR utilizando los cebadores degenerados MTCU1 y MTCU2 (Tabla 11), como son: *TelliMTT6* (*T. ellioti*), *TborMTT3*, *TborMTT4*, *TborMTT6* (*T. borealis*) y *TamerMTT3* (*T. americanis*). El resto de nuevas CuMTs expuestas en este trabajo (*TelliMTT8*, *TborMTT7*, *TborMTT8*, *TmalaMTT5*) se han identificado tras el análisis *in silico* de los genomas macronucleares de *T. borealis*, *T. ellioti* y *T. malaccensis*, recientemente secuenciados. Hasta hoy se conocen un total de 17 CuMTs dentro del género *Tetrahymena*, aportándose en este trabajo casi el 53% de las secuencias descritas actualmente. Además, en este estudio se ha incorporado una CuMT del ciliado *Ichthyophthirius multifiliis*, identificada tras llevar a cabo el análisis *in silico* de su genoma macronuclear. Ésta última ha sido denominada *ImMTT2* y constituye la primera CuMT descrita en un ciliado diferente al género *Tetrahymena*.

En la Fig. 17 se muestra el alineamiento de las secuencias aminoacídicas de todas las CuMTs de ciliados conocidas hasta hoy, incluyendo las 9 nuevas. A pesar de que a diferencia de las CdMTs las CuMTs no parecen tener un patrón modular/submodular tan marcado, sí pueden distinguirse repeticiones sucesivas de agrupaciones de cisteínas características, principalmente del tipo CXC (Fig. 17), que incluyen aproximadamente el 92% de los residuos de Cys (Tabla 17). Además de esta agrupación mayoritaria (CXC) las CuMTs también contienen otros tipos de agrupaciones de Cys, como son: CXCC, XCCX o XXCXX, que se encuentran en un porcentaje muy inferior con respecto a la primera mencionada (Tabla 17). Al contrario de las CdMTs, no se ha detectado ninguna agrupación del tipo CCC o CXCXC entre las CuMTs de ciliados.

Las CuMTs de *Tetrahymena* presentan longitudes de entre 60 y 158 aminoácidos, conteniendo un número total de residuos de cisteína de entre un mínimo de 16 (como es el caso de la CuMT TborMTT4, que es la más corta (60 aa) dentro de las conocidas en el género *Tetrahymena*) y un máximo de 44 [correspondiente a las CuMTs TborMTT3 y TborMTT6, que son en contraposición las más largas (158 aa) del género *Tetrahymena* (Tabla 17)]. Por otro lado, la ImMTT2 constituye la CuMT más larga (167 aa) de todas las analizadas en ciliados hasta hoy y contiene hasta 54 residuos de Cys (Tabla 17). Finalmente, considerando todas las CuMTs de ciliados, podemos decir que las cisteínas suponen entre el 26,63% y el 32,34% de la longitud total de estas proteínas (Tabla 17).

CuMTs		Longitud
TpigMT-2	MDTQTQT KL T TAC KNPCKCQPLCKCGTTSA NC QPC E -----	38
TtheMTT2	MDTQTQT KVT V GC SNPCKCQPLCKCGTTAA NC QPC E -----	38
TtheMTT4	MDTQTQT KVT V GC SNPCKCQPLCKCGTTAA NC QPC E -----	38
TrosMTT2	MDTQTQT KL T TG CKNPKCQPLCKCGTTAA NC QPC E -----	38
TtropMT1	MDTQTQT KL T VAC KNPCKCQPLCKCGTTSA NC QPC E -----	38
TtropMT2	MDTQTQT KVT V GC SNPCKCQPLCKCGTTAA NC QPC E -----	38
TfarCuMT	MDTQTQT KL T VGC KNPCKCQPLCKCGTTSS NC QPC E -----	38
TborMTT3	MDTQIQ T KL TG CSNPCKCQPLCKATTSA NC QASE-----	38
TborMTT4	MPTSFASVVP-----LPAC NC QPC E -----	20
TborMTT6	MDTQIQ T KL TG CSNPCKCQPLCQCGTTSA NC QASE-----	38
TborMTT7	MDTQTQT KL T SG CTNPKCQPICKCGTTSA NC QASV-----	38
TborMTT8	MDTQIQ A KL T T G CKNPKCQPLCKCGTTAA NC QPC E -----	38
TamerMTT3	MDTQTQT KVT V GC SNPCKCQPLCKCGTTAA NC QPC E -----	38
TelliMTT6	MDTQTQT KL T VGC KNPCKCQPLCKCGTTSS NC QPC E -----	38
TelliMTT8	MDPQTQ N KL T V GC KNPCKCQPLCKCGTTSA NC QPC E -----	38
TmalaMTT5	MDTQTQT KVT V GC SNPCKCQPLCKCGTTAA NC QPC E -----	38
ImMTT2	MES S K---TAACKNPN C N C NPCKCGTTAK NC NNCQ NC PN C CKCGTTAA CK NP C GC NC PN C CKCGTTAA QC	64
TpigMT-2	NCDFPCSNPCKCGTSDACKNPNCKTDCKCAA-----	32
TtheMTT2	NCDFPCSNPCKCGATESCGNPNCKCAECKGSH TE K-----	36
TtheMTT4	NCDFPCSNPCKCGVTESCGNPNCKCAECKGSH TE K-----	36
TrosMTT2	NCDFPCSNPCKCGVSDGCKNPNCKCADCKCT-----	31
TtropMT1	NCDFPCSNPCKCGTSEACKNPNCKCAECKGSA TD K-----	36
TtropMT2	NCDFPCSNPCKCGVTESCGNPNCKCAECKGSH TE K-----	36
TfCuMT	NCDFPCSNPCKCGATESCQCNPNCKCAECKC TH AVK-----	36
TborMTT3	NSDACACNPNCKCGVSGTCKNPN C QV D CKGTASQ Q NV G CK C CDT C AC NP CR C GVSDACQ C NT C CK C GD	67
TborMTT4	NCDFPCSNPCKCGVSDGCKNPNCKCADCKCT-----	31
TborMTT6	NSDACTCNPNCKCGVSGTCKNPN C SCV D CKGTASQ Q SV G CK C CDT C AC NP CK C GVSDACQ C NT C CK C GD	67
TborMTT7	DNEACSNPNCKCGVTSSCQCNPNCKG D CKGAVSQ V TAG C KN P CSN P CK C GVSDAS C SC SS CQ C SD	67
TborMTT8	NCDFPCSNPCKCGVSDGCKNPNCKCADCKCT-----	31
TamerMTT3	NCDFPCSNPNCKCGATESCGNPNCKCAECKGSH TE K-----	36
TelliMTT6	NCDFPCSNPNCKCGATESCGNPNCKCAECKGSH TE V K TSACK C DP C SN P CK C GV T Q S CQ C NP C T C AE	67
TelliMTT8	NCDFPCSNPNCKCGATENCQCNPNCKCAECKGSH AA K-----	36
TmalaMTT5	NCDFPCSNPNCKCGATESCGNPNCKCAECKGSH AE K-----	36
ImMTT2	NC T N C Q C NP C RC G T T AQ C KN P GC NC PN C CK C GTTAQ-----CN C T N CQ C NP C RC G -----	49
TpigMT-2	-----SAGCKSPCNCTDCKCTGTES C - C -----QKQ	26
TtheMTT2	-----TSACKNPN C AC NP C NC G ST SN C KN P CK CA E CK C	34
TtheMTT4	-----TSACKNPN C AC NP CK CG ST SN CK NP CK CA E CK C	34
TrosMTT2	-----G T K S C- C -----QK K	9
TtropMT1	-----S T A C K NP C A C T E C N C G A T S N-----C- C -----QKQ	26
TtropMT2	-----TSACKNPN C AC NP CK CG ST SN CK T P C N CA E CK C	34
TfCuMT	-----TSACKDP C SN P CK CG V T Q S CQ C NP C T C A E CK C	34
TborMTT3	CK C GS V S Q Q T A G CK NP C T C NN CK G V S A S CK NP CK C A D CK C SG S ES C - C -----QKQ	53
TborMTT4	-----G T ES C - C -----QK N	9
TborMTT6	CK C GS V S Q Q T A G CK NP C T C NN CK G V S A S CK NP CK C V D CK C SG S ES C - C -----QKQ	53
TborMTT7	CK C GT V S Q A T V G CK NP C T C NP CK G V S A S CK NP CK C A N C N S	44
TborMTT8	-----G T ES C - C -----QK N	9
TamerMTT3	-----TSACKNPN C AC NP C NC G ST SN C KN P CK CA E CK C	33
TelliMTT6	CK C GT S A S T S A C KN P C T C NP CK CG V T SN C KN P CK GC SE CK C	43
TelliMTT8	-----TSACKNPN C GC SE CK C	16
TmalaMTT5	-----T S T C KN P C T C NP CK CG ST SN CK NP CK CA E CK C	34
ImMTT2	-----T T AQ C KN P GC NC PN C CK C GTTAQ NC T N CQ C NP C CK C GTT D N C CK G NG C Q C NP C CK C	54

Fig. 17. Alineamiento de las secuencias aminoacídicas de todas las CuMTs conocidas en ciliados (Tpig: *T. pigmentosa*, Tthe: *T. thermophila*, Tros: *T. rostrata*, Ttro: *T. tropicalis*, Tfar: *T. farahensis*, Tbor: *T. borealis*, Telli: *T. elliotti*, Tmala: *T. malaccensis*, Tamer: *T. americanis*, Im: *Ichthyopphthirius multifiliis*). Se indican las longitudes (aa) de cada sección. Las 10 nuevas secuencias obtenidas en este trabajo se destacan en naranja. Cys (C): sombreada en amarillo, Lys (K) en azul, Gln (Q): en gris e His (H) en rojo.

Tabla 17. Distribución de las agrupaciones de cisteína entre las CuMTs de ciliados

CuMT	CCC	CXCC	CXCXC	XCCX	CXC	XXCXX	Nº total Cys por MT	% Cys en cada MT	Longitud total (aa) ⁽¹⁾
TpigMT-2	0	0	0	1	12	2	28	29,17	96
TtheMTT2	0	0	0	0	15	2	32	29,63	108
TtheMTT4	0	0	0	0	15	2	32	29,63	108
TrosMTT2	0	0	0	1	9	2	22	28,21	78
TtroMT1	0	0	0	1	12	2	28	28,00	100
TtroMT2	0	0	0	0	15	2	32	26,63	108
TfarCuMT	0	1	0	0	14	1	32	26,63	108
TelliMTT6	0	0	0	0	21	2	44	29,73	148
TelliMTT8	0	0	0	0	12	2	26	28,89	90
TmalaMTT5	0	0	0	0	15	2	32	29,63	108
TborMTT3	0	0	0	1	21	0	44	27,85	158
TborMTT4	0	0	0	1	6	2	16	26,67	60
TborMTT6	0	0	0	1	21	0	44	27,85	158
TborMTT7	0	0	0	0	21	0	42	28,19	149
TborMTT8	0	0	0	1	9	2	22	28,21	78
TamerMTT3	0	0	0	0	14	3	31	28,97	107
ImMTT2	0	0	0	0	27	0	54	32,34	167
TOTAL Cys/ Valores medios⁽²⁾	0	3	0	14	518	26	561	28,60	113
%Cys⁽³⁾	0	0,53	0	2,50	92,34	4,63	100		

Las 10 nuevas CuMTs descritas en este trabajo (9 del género *Tetrahymena* y una del ciliado *I. multifiliis*, ImMTT2) aparecen destacadas en naranja. Sombreada en gris se destaca la agrupación de cisteínas que reúne el mayor porcentaje de este aminoácido. C: cisteína; X: cualquier otro aminoácido. ⁽¹⁾ Longitud total (aa) de las proteínas inferidas a partir de las secuencias nucleotídicas obtenidas. ⁽²⁾ Número total de residuos de cisteínas que forman parte de cada tipo de agrupación y valores medios de los porcentajes de Cys y de las longitudes totales considerando todas las CuMTs conocidas en ciliados. ⁽³⁾ Porcentaje de residuos de cisteína en cada agrupación.

A.3. Secuencias completas de Cd- y CuMTs obtenidas como ADNc

Mediante las técnicas 5'/3' RACE se han conseguido obtener los ADNc completos (ORF y regiones 5' y 3' UTRs) de las 21 nuevas MTs del género *Tetrahymena* descritas en este trabajo (consultar el Anexo II). En el caso de la CdMT *TamerMTT2*, cuyo genoma aún no ha sido secuenciado, no se ha podido completar su ADNc en su extremo 5', careciendo de información sobre su región 5'UTR. Las secuencias de los 21 ADNc han sido incorporadas en el GenBank y sus números de acceso aparecen recopilados en la Tabla A2 del Anexo I.

El análisis comparativo de las secuencias obtenidas inicialmente como ADN genómico con los correspondientes ADNc, nos permite afirmar que en ninguna de las MTs de *Tetrahymena* descritas hasta la actualidad se ha detectado la presencia de intrones en la región codificante. Además, el estudio de las regiones 5' y 3' UTRs nos ha revelado la presencia de ciertos motivos conservados con potencial capacidad reguladora (Tabla 18 y 19).

Tabla 18. Motivos conservados detectados en las regiones 5' y 3' UTRs de algunas CdMTs de *Tetrahymena*

CdMT	5' UTR		3' UTR		
	Caja TATA (5'TAATAA3')	Motivo MTCM1 (orientación 5' - 3')	Señales de poliadenilación		Señal de degradación (5'ATTTA3')
			5'ATTTAA3'	5'AATAAA3'	
<i>TelliMTT1</i>	6	GTT TGA TT CA AT CA AT TATT CA G TC A TG GGGT CTG TGA CT CA T G AAT TTG TGA CTCT TGA TT	2	1	1
<i>TelliMTT2</i>	3	TGTT TGA AT CA GGCAA AT CA AACT CA T G AAT TTG TGA CTCTTGGTT	2	1	2
<i>TmalaMTT1</i>	6	CTG TGA TT CA T G AAT TCAT TGA AT CA TTATT GATT TGA CT CA T G AAT AAG TGA AT CA T G AAT	2	1	0
<i>TmalaMTT2</i>	10	AACTAACT CA T G AAT GCAAGACT CA T G AATG	1	0	1
<i>TmalaMTT3</i>	0	?	2	3	1
<i>TmalaMTT4</i>	0	?	2	1	3
<i>TpatMTT1</i>	2	?	0	0	2
<i>TpatMTT2</i>	2	?	0	1	4
<i>TborMTT1</i>	3	ATCT TGA TTAAT TGA TT CAG TGA TT CA TAAAGC AAG TGA TT CA T G AAG AGGT TGA T CA T G AAC	0	0	1
<i>TborMTT2</i>	2	TATT TGA TT CA TTCTA TATT TGA AT CA TACTT TTTT TGA AT CA ACATAA GATT TGA CT CA TT CA AA TAG TGA TT CA TTAATT AAAT CA AT CA AT CA AA	0	2	1
<i>TamerMTT1</i>	2	?	2	1	1
<i>TamerMTT2</i>	?	?	2	0	1
<i>TtheMTT1</i>	2	ATG TGA AT CA TTAAT TTG TGA TTCT TGA AAT GATT TGA CT CA T G AAT (2)* ATG TGA TTCT TGA AAT ACG TGA TT CA CGATT	2	1	1
<i>TtheMTT3</i>	2	ATG TGA TTCT TGA AAT GACTAAAT CA AGAGT	0	0	1
<i>TtheMTT5</i>	1	GTG TGA TTCT TGA AAT ATG TGA TT CA T G AGT (2)* ATG TGA AT CA T G AGT GTG TGA AT CA T G AGT (4)* GAG TGA AT CA T G AGT (2)* GTG TGA AT CA T G AGG (2)* TAG CA CT CA T G AAT	0	2	4
<i>TpyrMT-1</i>	4	ATG TGA TTCT TG AGC AAG TGA TTCT TG AGC TAG TGA TTCT TG AAT AAG TGA TTCT TG AGT AAG TGA TTCTTGGAT	1	1	4

* Los números entre paréntesis indican el número de copias de cada uno de los motivos MTCM1. Los tripletes TCA y TGA aparecen sombreados en azul y amarillo respectivamente para facilitar la comparación entre las secuencias de los diferentes motivos MTCM1 y la identificación de los posibles sitios de unión de los factores AP-1. ?: dato no conocido. En color naranja se indican las nuevas secuencias de CdMTs.

Resultados

En las regiones 5' UTRs de la mayoría de las MTs de *Tetrahymena* se detectan, además de cajas TATA (5'TAATAA3'), unos motivos conservados previamente denominados como Motivo 1 Conservado en Metalotioneínas (MTCM1) (Díaz *et al.*, 2007). El motivo MTCM1 presenta la siguiente secuencia consenso: 5'GTGTGAATCATGAGT3', deducida tras la comparación de distintas MTs de *T. thermophila* y *T. pyriformis* (Díaz *et al.*, 2007), cuyos motivos MTCM1 también aparecen recogidos en las Tablas 18 y 19. Los tripletes TGA y TCA que presentan los motivos MTCM1 parecen claves para la unión de factores de transcripción del tipo AP-1, que podrían estar relacionados con la regulación a nivel transcripcional de la expresión de estos genes en respuesta a condiciones de estrés.

Tabla 19. Motivos conservados detectados en las regiones 5' y 3' UTRs de algunas CuMTs de *Tetrahymena*

CuMT	5' UTR		3' UTR		Señal de degradación (5'ATTTA3')
	Caja TATA (5'TAATAA3')	Motivo MTCM1 (orientación 5' - 3')	Señales de poliadenilación		
			5'ATTA3'	5'AATAA3'	
<i>TelliMTT6</i>	6	GAG TGA TTCT TG AGG	0	2	2
<i>TelliMTT8</i>	8	AACGAACT TCATGA AT AGAAA ACTCATG AGT	1	2	1
<i>TmalaMTT5</i>	4	GTCT TCAATCATT CATT ATAT TGA ATTTAT TC ATT	0	1	2
<i>TborMTT3</i>	2	TATATTAT TCATGA CC G TGA TCT CAATCA AA	3	2	2
<i>TborMTT4</i>	2	CAAAA ACTCATGA GC AGAT TCAATCA TTAAC GTT TGA TT CA GATAC AAT TCAATCA TTACA	2	2	2
<i>TborMTT6</i>	6	ATTTGCAT TCATGA TC AAT TCAT CACT CA CTTT CAATCA GCATA TATATTAT TCATGA CC G TGA TCT CAATCA	1	3	0
<i>TborMTT7</i>	1	TTAT TGA TTTAT TGA TA CTAAGACT TCATGA CT	4	1	1
<i>TborMTT8</i>	1	AAT TCAATCA TTACA CTAT TGAGTGA TATTC GAG TGA ATCT TG AGG AAAT GATTCA AGATAA TGAGGCTCATG AT	2	2	2
<i>TamerMTT3</i>	0	?	0	2	2
<i>TtheMTT2</i>	1	AAT TCAT TATAT TGA TA GAG TGA TTCT TG AGG	?	?	?
<i>TtheMTT4</i>	3	ATTT TGA TAAT TGA AT CTAT TGATTCA AGAGT	?	?	?

Los tripletes TCA y TGA aparecen sombreados en azul y amarillo respectivamente para facilitar la comparación entre las secuencias de los diferentes motivos MTCM1 y la identificación de los posibles sitios de unión de los factores AP-1. ?: dato no conocido. En color naranja se indican las nuevas secuencias de CdMTs.

Por otro lado, en las regiones 3' UTRs de casi todas las MTs de *Tetrahymena* se han identificado potenciales señales canónicas de poliadenilación (5'AATAAA3' y 5'ATTTAA3') y posibles señales de degradación del ARNm (5'ATTTA3') (Tablas 18 y 19).

A.4. Estudio de la expresión de algunos de los nuevos genes MTs tras el tratamiento con diferentes agentes estresantes

En el presente trabajo se han analizado mediante RT-PCR cuantitativa 6 de los 21 nuevos genes codificantes de MTs descritos en diferentes especies del género *Tetrahymena*: *TborMTT1*, *TborMTT2*, *TborMTT7* (*T. borealis*), *TelliMTT6* (*T. elliotti*), *TamerMTT3* (*T. americanis*) y *TmalaMTT5* (*T. malaccensis*). El resto de los genes no se pudieron analizar por esta técnica debido a que dentro de la misma especie existen varias isoformas de MTs con una elevada homología entre sus secuencias nucleotídicas (Tabla 20) y, por tanto, no es posible el diseño de cebadores específicos que puedan diferenciar cada una de ellas.

En *T. borealis*, los genes *TborMTT3* (477 pb) y *TborMTT6* (477 pb) presentan una homología del 96% en toda su longitud. En el caso de *TborMTT4* (183 pb) y *TborMTT8* (237 pb), la homología es de hasta el 99%. En *T. elliotti*, las CdMTs *MTT1* (465 pb) y *MTT2* (438 pb) presentan una homología del 85% en toda su longitud (Tabla 20). Sin embargo, en el caso de las CuMTs *MTT6* (447 pb) y *MTT8* (273 pb), como presentan longitudes muy diferentes, aunque la *MTT8* se asemeja mucho (90% de homología) a la *MTT6* en su extremo 5', se pudieron diseñar cebadores específicos para la *MTT6* en su extremo 3', con el que ya no se encuentra homología con la *MTT8*, que es mucho más corta. En *T. americanis*, existe una homología del 99% entre *TamerMTT1* (321 pb) y *TamerMTT2* (474 pb) (Tabla 20). En *T. malaccensis*, *TmalaMTT1* (489 pb) y *TmalaMTT2* (489 pb) se asemejan en un 84% y *TmalaMTT3* (540 pb) y *TmalaMTT4* (300 pb) en un 92-94%. Finalmente, tampoco se pudieron analizar *TpatMTT1* (354 pb) y *TpatMTT2* (457 pb), que presentan un 91% de homología entre sí (Tabla 20).

Las concentraciones de metales/metaloideos normalmente utilizadas en experimentos de expresión (Tabla 9) son muy inferiores a los valores de CL₅₀ previamente calculados en *T. thermophila* (Díaz *et al.*, 2007) y, por tanto, provocan bajas tasas de mortalidad celular. En nuestro caso, para llevar a cabo el análisis de expresión de los nuevos genes seleccionados de diferentes especies de *Tetrahymena*, primeramente se quiso confirmar que las concentraciones seleccionadas para *T. thermophila* también eran subletales para las nuevas especies. Para ello, se realizaron ensayos previos de toxicidad (mortalidad) celular con diferentes concentraciones metálicas utilizando citometría de flujo (Tabla 21). En todos los casos se comprobó que estas concentraciones eran igualmente subletales para las cuatro especies analizadas (Tabla 21). Solamente existe una excepción en la especie *T. borealis*, en la que la concentración de Cd²⁺ normalmente utilizada (45 μM) producía una mortalidad del 65,6%, por lo que se utilizó una concentración de 10 μM (Tabla 21).

Tabla 20. Análisis de homología entre las secuencias codificantes de las 21 nuevas MTs de diferentes especies de *Tetrahymena*

<i>T. borealis</i>							
	MTT1	MTT2	MTT3	MTT4	MTT6	MTT7	MTT8
MTT1	ID						
MTT2	ND	ID					
MTT3	ND	ND	ID				
MTT4	ND	ND	ND	ID			
MTT6	ND	ND	96%	ND	ID		
MTT7	ND	ND	ND	ND	ND	ID	
MTT8	ND	ND	ND	99%	ND	ND	ID
<i>T. ellioti</i>							
	MTT1	MTT2	MTT6	MTT8			
MTT1	ID						
MTT2	85%	ID					
MTT6	ND	ND	ID				
MTT8	ND	ND	90%	ID			
<i>T. americanis</i>							
	MTT1	MTT2	MTT3				
MTT1	ID						
MTT2	99%	ID					
MTT3	ND	ND	ID				
<i>T. malaccensis</i>							
	MTT1	MTT2	MTT3	MTT4	MTT5		
MTT1	ID						
MTT2	84%	ID					
MTT3	ND	ND	ID				
MTT4	ND	ND	92-94%	ID			
MTT5	ND	ND	ND	ND	ID		
<i>T. patula</i>							
	MTT1	MTT2					
MTT1	ID						
MTT2	91%	ID					

Dentro de una misma especie, las secuencias fueron comparadas dos a dos con la herramienta BLAST del NCBI. Sombreadas en naranja se indican las CdMTs y en verde las CuMTs. ID: la comparación de una secuencia consigo misma da el 100% de homología (identidad). ND: el programa no detecta ninguna similitud entre las dos secuencias comparadas.

Tabla 21. Análisis mediante citometría de flujo de la toxicidad producida por cinco metales pesados sobre cuatro especies de *Tetrahymena*

Metal pesado	Concentración (μM)	Mortalidad celular (%)			
		<i>T. borealis</i>	<i>T. ellioti</i>	<i>T. americanis</i>	<i>T. malaccensis</i>
Cd^{2+}	15	4,94	5,15	1,36	0,06
	25	19,5	5,16	0,66	0,05
	45	65,64*	4,97	0,83	0,05
	60	71,29	5,29	2,42	0,06
	100	78,85	4,04	3,42	1,58
Cu^{2+}	300	0,44	2,37	2,83	0,12
	500	1,75	1,14	1,81	0,13
	1000	0,72	1,27	1,32	0,22
	2000	1,09	1,57	1,73	0,6
	4000	4,85	3,87	2,85	2,26
Pb^{2+}	500	1,44	2,21	1,31	0,05
	1000	1,70	3,95	1,37	0,04
	3000	2,57	1,21	3,61	0,14
	5000	3,35	0,53	14,46	0,36
	6000	4,08	0,81	36,23	1,53
As^{5+}	100	0,51	0,72	1,24	0,26
	500	0,75	0,43	1,51	0,88
	1000	0,91	0,35	1,21	1,46
	3000	3,31	0,56	2,73	1,07
	5000	ND	2,87	13,38	4,77
Zn^{2+}	1000	1,22	0,75	1,64	0,06
	2000	13,47	3,42	6,22	0,94
	2500	31,12	12,72	10,8	1,85
	3000	26,91	26,68	15,69	2,53
	5000	97,75	75,31	71,56	5,98

En rojo se indican las concentraciones que normalmente se utilizan en los estudios de expresión de los genes del género *Tetrahymena* para cada uno de estos cinco metales. En todos los casos se observa que estas concentraciones son subletales, produciéndose tasas de mortalidad celular muy bajas. *El tratamiento de *T. borealis* con Cd^{2+} 45 μM causa una elevada mortalidad (65,6%) y, por tanto, se redujo la concentración de Cd^{2+} a 10 μM para garantizar la subletalidad del tratamiento. ND: no determinado.

En la Fig. 18 se muestran los niveles de inducción relativa obtenidos para cada uno de los 6 genes analizados por RT-PCR cuantitativa tras el tratamiento con diferentes metales/metaloides. En general, a excepción del gen *TborMTT2*, los valores de inducción obtenidos tras 1h de tratamiento (respuesta temprana) son mayores a los observados tras 24h de estrés (respuesta tardía). Las dos CdMTs analizadas, *TborMTT1* y *TborMTT2*, se inducen por Cd^{2+} entre otros metales; sin embargo, ambas isoformas presentan muy diferentes patrones de expresión: *TborMTT1* responde principalmente frente a Cd^{2+} , As^{5+} y Pb^{2+} de forma mucho más rápida e intensa que *TborMTT2*. Esta última isoforma génica presenta un perfil de expresión más homogéneo, sin detectarse tantas diferencias entre los cinco metales ensayados y predominando, en la mayoría de los casos, una mayor respuesta tardía (24h). Los otros cuatro genes analizados por RT-PCR cuantitativa (*TborMTT7*, *TelliMTT6*, *TamerMTT3* y *TmalaMTT5*) se corresponden con CuMTs y se inducen principalmente por Cu^{2+} .

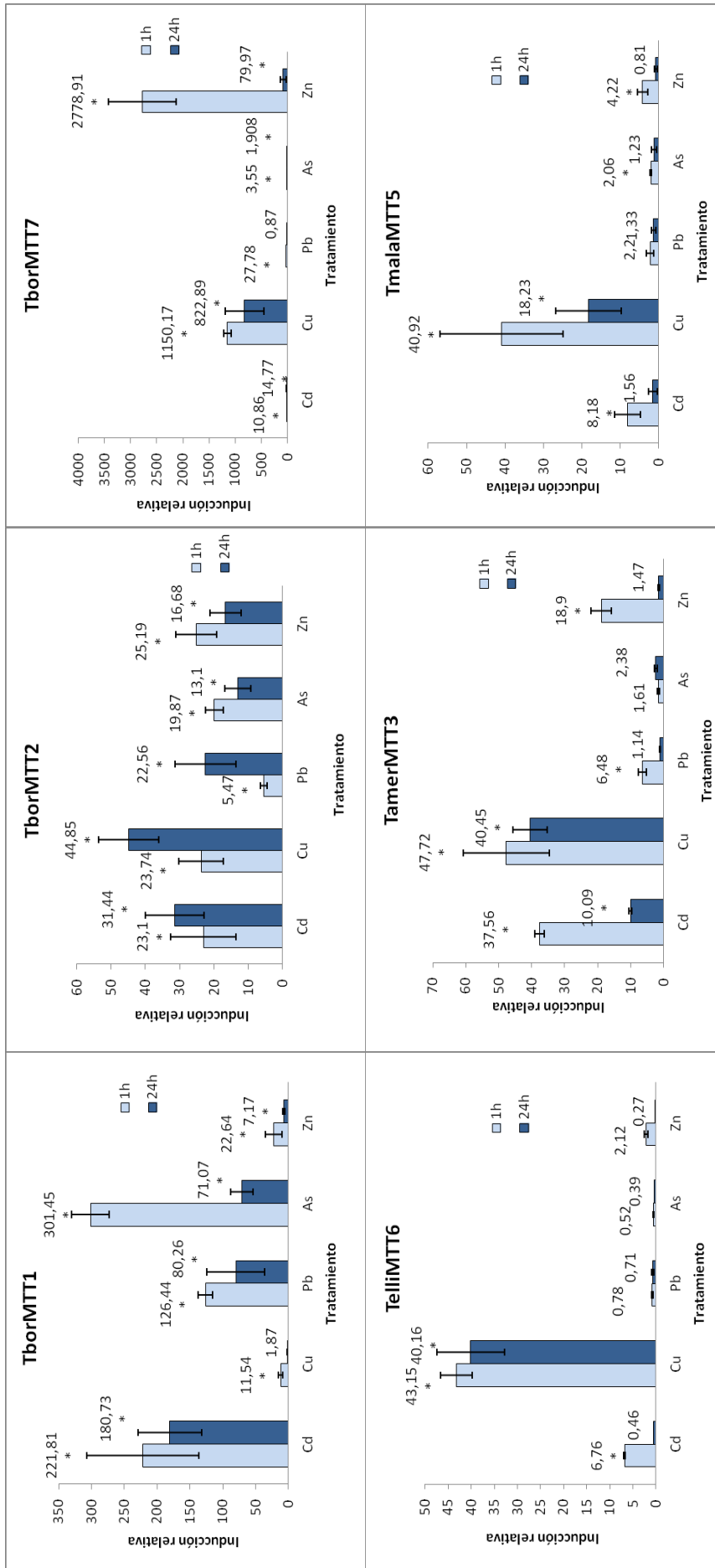


Fig. 18. Análisis de expresión mediante RT-PCR cuantitativa de seis de los nuevos genes descritos en diferentes especies del género *Tetrahymena* tras el tratamiento con distintos metales/metales (1 ó 24h). Las barras representan los niveles de expresión relativa respecto al cultivo control no tratado (valor 1) y normalizados respecto a la expresión de los genes constitutivos utilizados como controles endógenos (β -actina y tubulina). Cada barra corresponde al valor medio de inducción relativa para cada tratamiento \pm la desviación estándar calculada a partir de los resultados obtenidos de dos o tres experimentos independientes. Los asteriscos indican la existencia de diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) respecto a la muestra control (sin tratamiento). Las concentraciones de metales empleadas se indican en la Tabla 9 y en el texto.

En general, los niveles de inducción de los genes CuMTs suelen ser inferiores a los de los genes CdMTs. Sin embargo, una excepción la encontramos en el gen *TborMTT7*, que se induce con Cu^{2+} (1 y 24h) y Zn^{2+} (1h) alcanzándose los valores más elevados (Fig. 18). Los patrones de inducción de los genes CuMT *TelliMTT6* y *TmalaMTT5* son bastante similares, ya que responden preferentemente al Cu^{2+} y algo al Cd^{2+} , mientras que la respuesta frente al resto de los metales/metaloideos es bastante baja (Fig. 18).

Los niveles de expresión de los 6 nuevos genes MTs aislados de diferentes especies de *Tetrahymena* tras el tratamiento con agentes oxidantes como el paraquat (PQ) o la menadiona (MD) y con un inductor de apoptosis (camptotecina, CAM) se muestran en la Fig. 19. En la mayoría de los casos, los niveles de inducción observados tras el tratamiento con PQ y CAM no son estadísticamente significativos e, incluso, casi ninguno de los valores supera el nivel de dos, a partir del cual la expresión de un gen se considera positiva. Una excepción es el caso del gen *TborMTT7*, que se induce significativamente tras el tratamiento de 1h con PQ ($\approx 3,17$ veces) y con CAM ($\approx 4,59$ veces). Por otro lado, tras el tratamiento de 1h con MD, los niveles de inducción de *TborMTT1* ($\approx 4,34$ veces), *TborMTT2* ($\approx 5,27$ veces), *TborMTT7* ($\approx 12,93$ veces) y *TmalaMTT5* ($\approx 2,13$ veces) son estadísticamente significativos y, por tanto, aunque sus valores no son muy elevados, parece existir una respuesta de estos cuatro genes ante el estrés causado por este agente oxidante (Fig. 19). Los tratamientos con MD sólo se realizaron durante 1h de tratamiento, ya que, como se ha comprobado en *T. thermophila*, el tratamiento durante 24h causa una mortalidad del 100% (tesis doctoral de R. Ortega, datos no publicados).

Igualmente, también se analizó la expresión genética de los seis genes MTs seleccionados frente a otros agentes de estrés abiótico (Fig. 20), como son: el pH del medio (ácido o básico), la temperatura (4° ó 42°C) y la inanición (Tabla 8). Los cambios en el pH del medio (tanto ácido como básico, durante 3 ó 24h) causan una respuesta muy variada entre los genes MTs analizados. Los niveles de inducción alcanzados no son, en general, muy elevados, observándose valores estadísticamente significativos comprendidos dentro de un rango de entre 2,15 y 17,71 (Fig. 20). Entre los genes CdMTs analizados se distingue el gen *TborMTT2*, que presenta una respuesta temprana (3h) a pH básico bastante significativa ($\approx 17,71$ veces) y una cierta respuesta tardía (24h) frente a pH ácido ($\approx 4,4$ veces). Entre las CuMTs destaca la isoforma génica *TamerMTT3*, que es la que más se induce después de 3h de tratamiento tanto a pH ácido ($\approx 8,53$ veces) como a pH básico ($\approx 7,95$ veces) (Fig. 20).

El estrés causado por condiciones de baja temperatura (4°C durante 24h) sólo desencadena la expresión génica de las dos CdMTs analizadas (*TborMTT1* y *TborMTT2*). En este caso los valores de inducción obtenidos superan ligeramente el límite de 2 fijado a nivel internacional y son estadísticamente significativos. Sin embargo, las condiciones de alta temperatura (42°C durante 24h) sí inducen la expresión de la mayoría de las isoformas génicas codificantes de MTs de *Tetrahymena* analizadas, destacándose los tres genes MTs estudiados en *T. borealis* (*TborMTT1*, *TborMTT2* y *TborMTT7*), que alcanzan valores de inducción de 12, 13 ó 16,2 veces (Fig. 20). Finalmente, en cuanto al estrés causado por condiciones de inanición, destacan los valores de inducción del gen *TborMTT1*, que responde tanto tras 48h ($\approx 4,72$ veces) como tras 4 días ($\approx 8,59$ veces) de inanición. Para el resto de los genes analizados los valores de inducción bajo estas condiciones no son estadísticamente significativos o son muy bajos (Fig. 20).

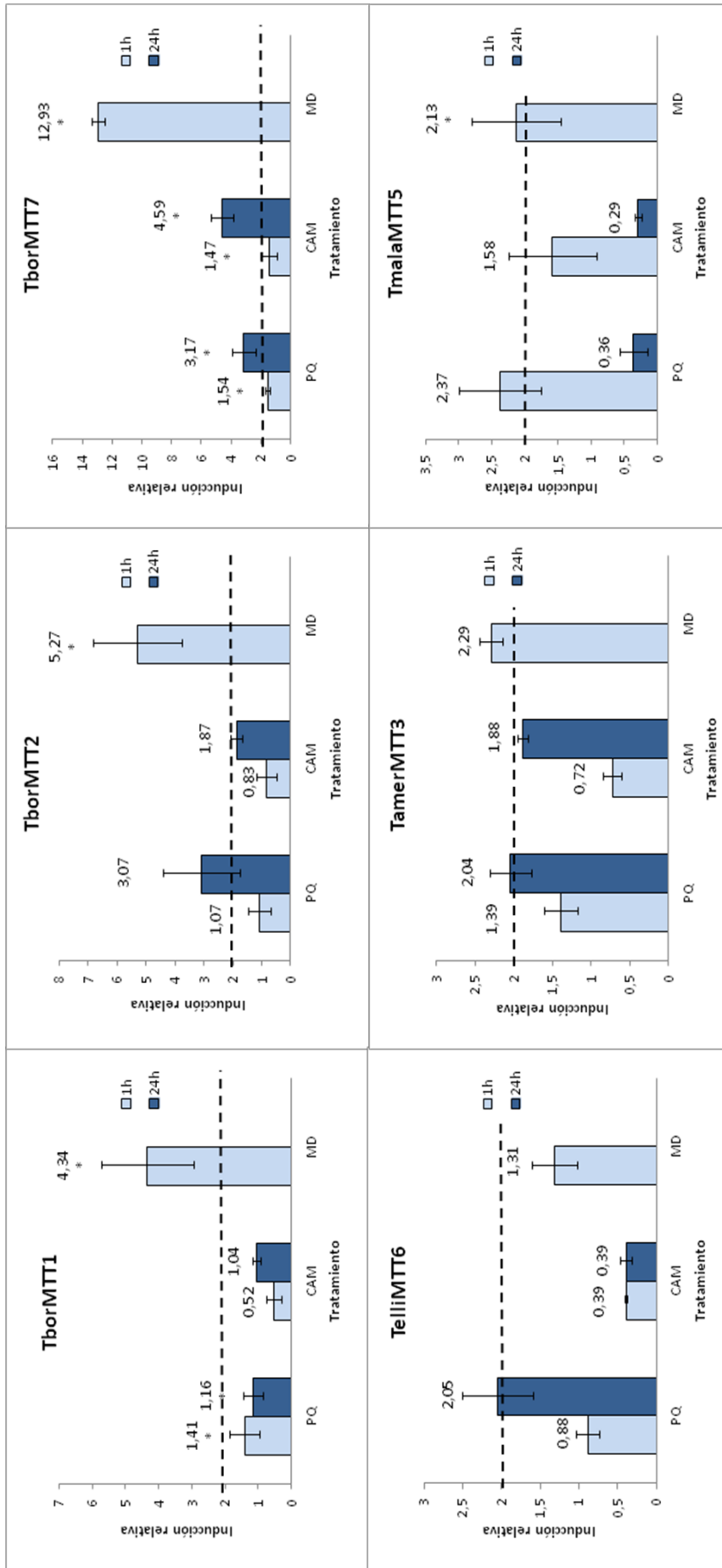


Fig. 19. Análisis de expresión mediante RT-PCR cuantitativa de seis de los nuevos genes descritos en diferentes especies del género *Tetrahymena* tras el tratamiento con dos agentes oxidantes: paraquat (PQ) y menadiona (MD) o con un inductor de apoptosis, la camptotecina (CAM). Las barras representan los niveles de expresión relativa respecto al cultivo control no tratado (valor 1) y normalizados respecto a la expresión de los genes constitutivos utilizados como controles endógenos (β -actina y tubulina). Cada barra corresponde al valor medio de inducción relativa para cada tratamiento \pm la desviación estándar calculada a partir de los resultados obtenidos de dos o tres experimentos independientes. Los asteriscos indican la existencia de diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) respecto a la muestra control (sin tratamiento). La expresión de un gen se considera positiva si el nivel de inducción del mismo es superior a dos (señalado con una línea discontinua). Las concentraciones empleadas para cada agente estresante se indican en la Tabla 8.

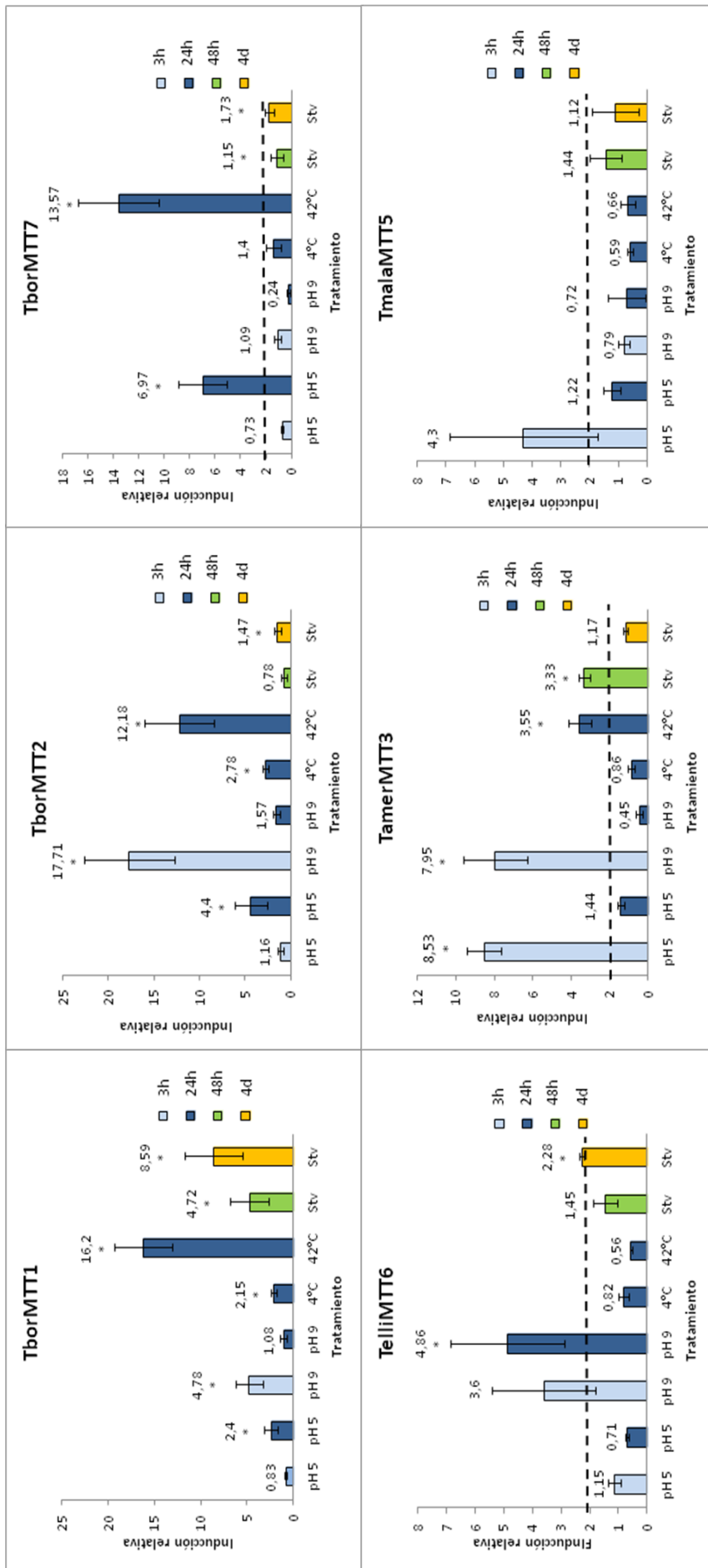


Fig. 20. Análisis de expresión mediante RT-PCR cuantitativa de seis de los nuevos genes descritos en diferentes especies del género *Tetrahymena* tras el estrés ocasionado por varios factores abióticos: pH del medio (ácido o básico), temperatura (4° ó 42°C) e inanición (Stv: condiciones de inanición al mantener las células en tampón TrisHCl 0,01 M pH 6,8). Las barras representan los niveles de expresión relativa respecto al cultivo control no tratado (valor 1) y normalizados respecto a la expresión de los genes constitutivos utilizados como controles endógenos (β -actina y tubulina). Cada barra corresponde al valor medio de inducción relativa para cada tratamiento \pm la desviación estándar calculada a partir de los resultados obtenidos de dos o tres experimentos independientes. Los asteriscos indican la existencia de diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) respecto a la muestra control (sin tratamiento). La expresión de un gen se considera positiva si el nivel de inducción del mismo es superior a dos (señalado con una línea discontinua). Las condiciones empleadas para cada agente abiótico se indican en la Tabla 8.

A.5. Análisis *in silico* de la estructura tridimensional inferida de las secuencias de MTs descritas en las diferentes especies de *Tetrahymena*

Se ha llevado a cabo el análisis *in silico* de las estructuras tridimensionales (3D) inferidas de las secuencias aminoácidas de las 26 CdMTs y las 16 CuMTs conocidas hasta la actualidad dentro del género *Tetrahymena*, incluyéndose las nuevas MTs descritas en el presente trabajo. Igualmente, también se ha analizado la estructura 3D de la CuMT *ImMTT2* descrita en el ciliado *I. multifiliis*. Para estos análisis se ha utilizado el programa bioinformático *Phyre2* en su modo intensivo y todos los resultados obtenidos se recogen en las Figs. 21-23 y en las Tablas A6 y A7 (Anexo I).

En las Tablas A6 y A7 (véase el Anexo I) se recogen los resultados obtenidos del análisis de similitud estructural llevado a cabo con el programa informático *Phyre2*. Para cada una de las secuencias analizadas se indican el número/porcentaje de aminoácidos que el programa modela con una elevada confianza (superior al 90%) y aquellas proteínas de otros organismos (cuya estructura 3D ha sido previamente obtenida de manera experimental) con las que presentan, en mayor o menor medida, una cierta similitud estructural. Como se aprecia en dichas tablas, existen algunas MTs que no modelan ninguno de sus aminoácidos con una elevada confianza (como es el caso de las CdMTs: *TpigMT-1*, *TpyrMT-1*, *TtheMTT5*, *TrosMTT1*, *ThegMT1*, *TborMTT1*, *TamerMTT1*, *TmalaMTT4* y *TpatMTT1* y de las CuMTs: *TpigMT-2*, *TrosMTT2*, *TborMTT4*, *TborMTT8* y *TelliMTT8*), mientras que otras MTs son modeladas por el programa con una elevada confianza en el 100% de sus aminoácidos (como se observa en las CuMTs *TamerMTT3*, *TborMTT3*, *TborMTT6* y *ImMTT2*).

Algunas de las MTs de *Tetrahymena* encuentran una mayor similitud estructural con proteínas de naturaleza y funciones muy diferentes, tales como proteínas de señalización (*jagged*, *hedgehog*, factor de inhibición de *Wnt*), proteínas de adhesión celular (*integrinas*, *laminina*, *trombospondina*), proteínas estructurales (*fibrilina*), proteínas de unión (*netrina*), factores de coagulación, hidrolasas/inhibidores de hidrolasas, etc. Por otro lado, algunas de las MTs de *Tetrahymena* presentan una mayor similitud con MTs de otros seres vivos pertenecientes a muy diversos grupos taxonómicos (Figs. 21 y 22, Tablas A6 y A7). Finalmente, en el caso de las CdMTs *TpigMT-1* y *ThegMT1*, el programa *Phyre2* no encontró ninguna proteína con la que presentasen cierta similitud estructural (Tabla A6).

Entre las CdMTs, destacamos el caso de *TpyrMT-1*, *TtheMTT5*, *TrosMTT1*, *TborMTT1*, *TamerMTT1* y *TmalaMTT4*, que tienen una mayor similitud estructural con la MT-A del equinoideo *Strongylocentrotus purpuratus* (el erizo de mar púrpura), la MT-1 de *Homarus americanus* (la langosta americana) y la MT-I de *Callinectes sapidus* (el cangrejo azul) (Tabla A6, Fig. 21). Por otro lado, en el caso de las CuMTs, sólo muestran similitud estructural con MTs de otros seres vivos las siguientes: *TpigMT-2*, *TrosMTT2*, *TborMTT4*, *TborMTT8* y *TelliMTT8* (Tabla A7, Fig. 22). Estas CuMTs, además de presentar cierta similitud estructural con las tres MTs indicadas previamente para las CdMTs, también tienen cierta similitud con la MT-1 de *Triticum aestivum* (el trigo) y con distintas MTs de vertebrados: la MT-A de *Notothenia coriiceps* (el bacalao antártico), la MT-2 de *Rattus rattus* (la rata negra), la MT-1 de *Mus musculus* (el ratón casero), la MT-2A de *Oryctolagus cuniculus* (el conejo común) y la MT-2 de *Homo sapiens* (el ser humano) (Tabla A7, Fig. 22).

En las Figs. 21 y 22 se muestran las estructuras 3D para las mencionadas Cd- y CuMTs de *Tetrahymena* que presentan cierta similitud estructural con las MTs de otros organismos. Todas ellas parecen presentar, en su fase de apometalotioneínas (apoMTs) (proteína sin la interacción con el metal), una estructura globular más o menos compacta formada por un único dominio, disponiéndose generalmente los residuos de Lys (en magenta) hacia el exterior de la proteína y las Cys (en amarillo) más hacia el interior de la molécula. El reparto de ambos residuos a lo largo de la molécula es bastante homogéneo, distribuyéndose de manera más o menos uniforme.

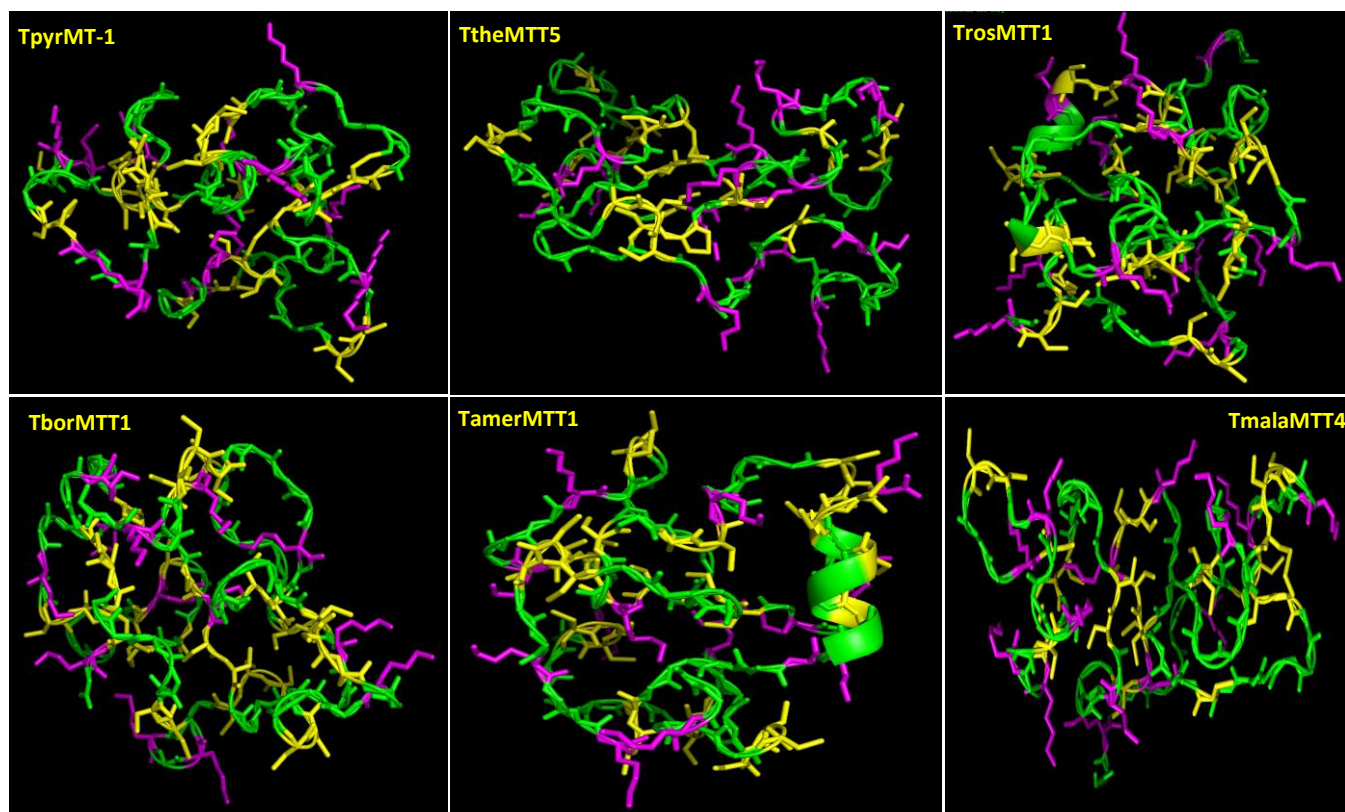


Fig. 21. Estructuras 3D de las CdMTs: TpyrMT-1, TtheMTT5, TrosMTT1, TborMTT1, TamerMTT1 y TmalaMTT4. Todas ellas presentan cierta similitud estructural con MTs de otros organismos. Cys (C): en amarillo; Lys (K): en magenta. El resto de aminoácidos se representan en verde.

En el resto de MTs de *Tetrahymena* analizadas en este trabajo (para las que no se encuentra similitud estructural con MTs de otros organismos) se observan, además de estructuras globulares formadas por un único dominio (como es el caso de las CdMTs: ThegMT2 y TpatMTT1 y las CuMTs TtheMTT2 y TtropMT2), también otros tipos de estructuras. Así, por ejemplo, en algunas de las MTs se aprecian estructuras similares a la clásica estructura en "yo-yo" típica de las MTs de vertebrados. Estas estructuras están formadas por dos dominios más o menos globulares que aparecen conectados entre sí por una región más lineal, tal y como observamos en las CdMTs: TelliMTT1, ThegMT3, TmalaMTT2, TpyrMT-2, TvorMT1 y TborMTT2 y en las CuMTs: TborMTT3, TmalaMTT5, TtheMTT4 y TtropMT1 (Fig. 23).

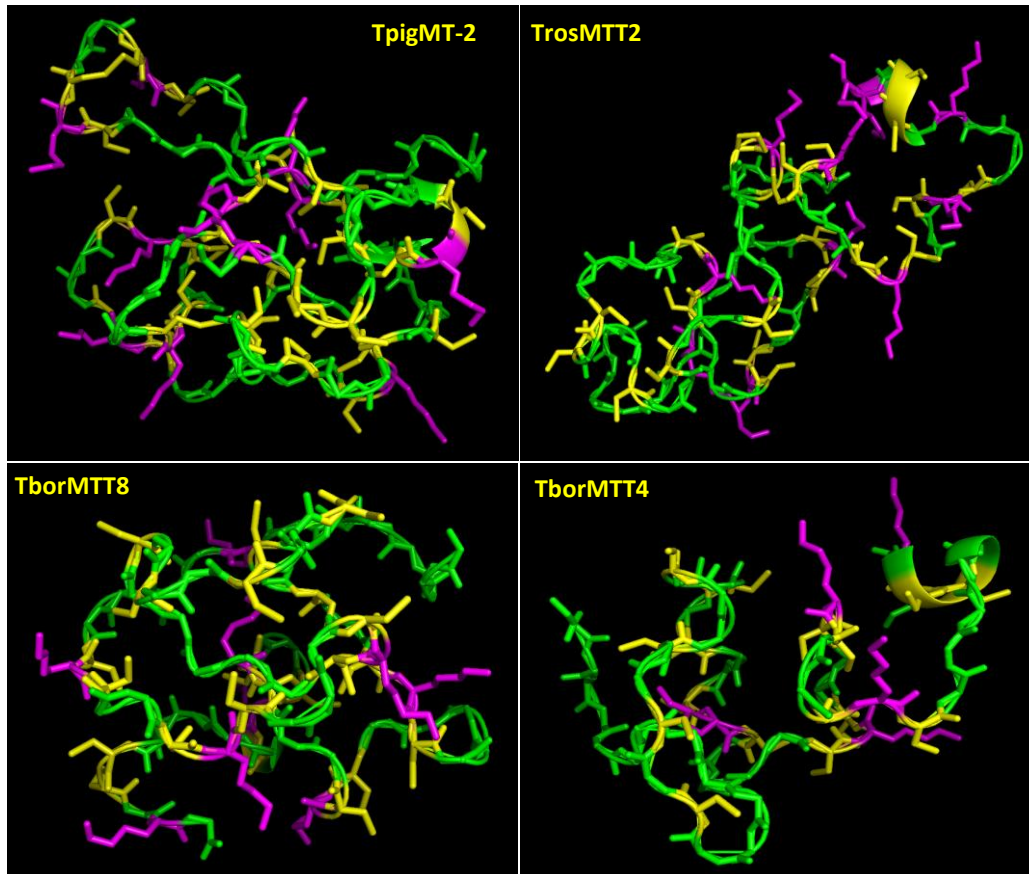


Fig. 22. Estructuras 3D de las CuMTs: TpigMT-2, TrosMTT2, TborMTT4 y TborMTT8. Todas ellas presentan cierta similitud estructural con MTs de otros organismos. TelliMTT8, que también presenta cierta similitud estructural con MTs de otros organismos, no pudo ser modelada por el programa *Phyre2* y, por esta razón, no se muestra en este trabajo. Cys (C): en amarillo; Lys (K): en magenta. El resto de aminoácidos se representan en verde.

Por otro lado, algunas de las MTs presentan estructuras más lineales, algunas incluso muy alargadas, tal y como se aprecia en el caso de las apoMTs TmalaMTT3, TpatMTT2, TtheMTT3, TtroMTT1, ImMTT2, TamerMTT3 y TborMTT7. Finalmente, en otras apoMTs, aunque también presentan una estructura bastante alargada, podemos distinguir dos dominios diferenciados (como es el caso de las apoMTs TamerMTT2, TelliMTT2, ThegMT4, TmalaMTT1, TtheMTT1, TborMTT6, TelliMTT6 y TfarCuMT) o, incluso, hasta tres dominios diferenciados (como observamos en el caso de la CdMT TmobMT1). Algunos ejemplos de los diferentes tipos de estructuras que se infieren de las secuencias aminoacídicas de las apoMTs de *Tetrahymena* se muestran en la Fig. 23.

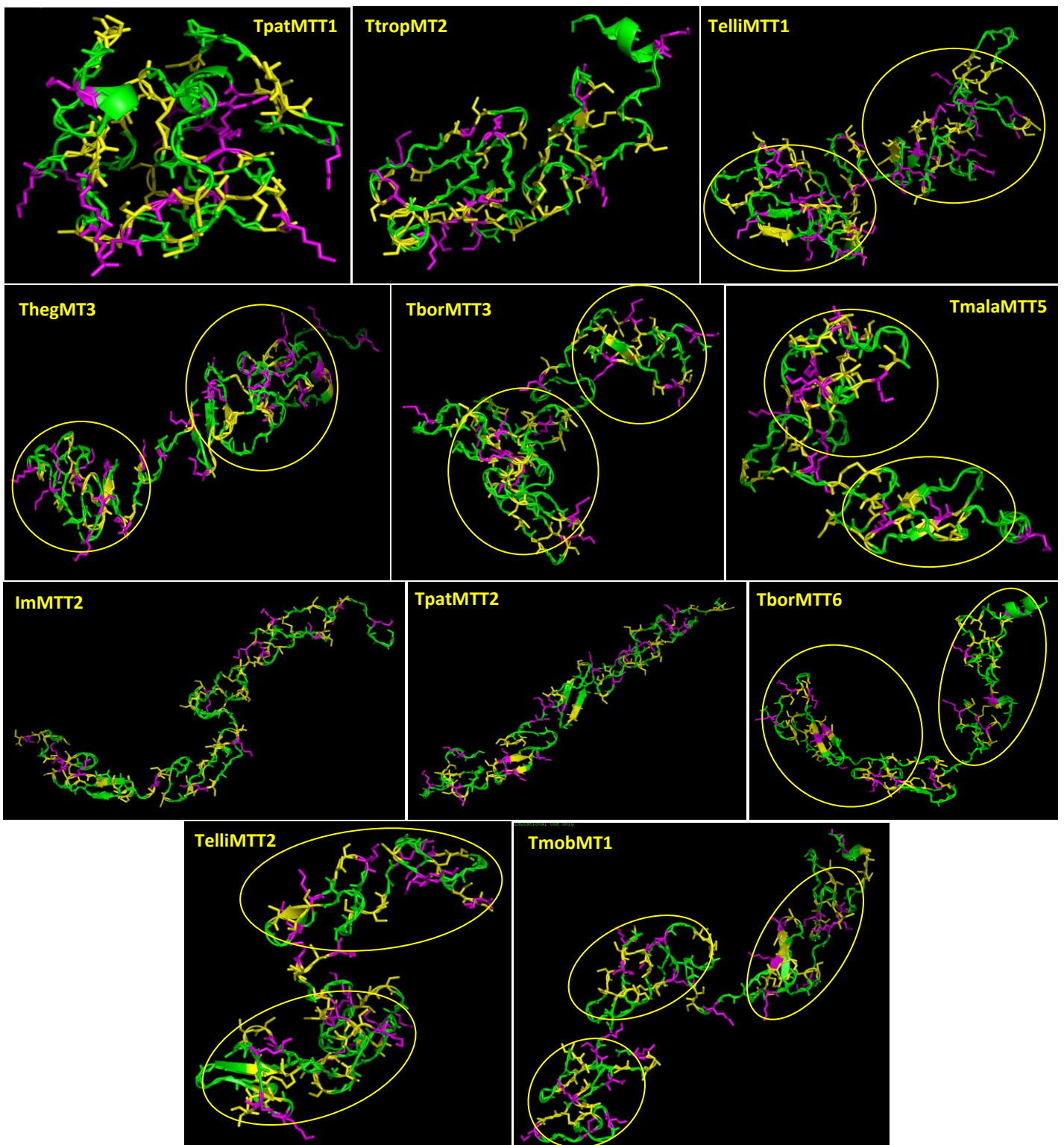


Fig. 23. Ejemplos de estructuras 3D de algunas de las MTs de *Tetrahymena* analizadas en este trabajo. Se distinguen diferentes tipos de estructuras: 1) con un único dominio globular (TpatMTT1, TtropMT2), 2) similares a la estructura clásica de "yo-yo" típica de las MTs de vertebrados (TelliMTT1, ThegMT3, TborMTT3 y TmalaMTT5), 3) estructuras más lineales (ImMTT2, TpatMTT2) y 4) estructuras alargadas o lineales en las que se distinguen dos (TborMTT6, TelliMTT2) o tres dominios (TmobMT1). Los dominios se señalan con círculos amarillos. Cys (C): en amarillo; Lys (K): en magenta. El resto de aminoácidos se representan en verde.

B.- CARACTERIZACIÓN DE LAS CEPAS ADAPTADAS A ELEVADAS CONCENTRACIONES DE METAL Y CEPAS *KNOCKOUT* Y/O *KNOCKDOWN* EN GENES MT

B.1. Parámetros ecotoxicológicos, cinéticas de crecimiento y caracterización morfológica de las cepas adaptadas a metales

Las tres cepas adaptadas a elevadas concentraciones de metal (Cd^{2+} , Cu^{2+} o Pb^{2+}), denominadas como Cd-ADAP, Cu-ADAP y Pb-ADAP respectivamente, se obtuvieron tras un proceso de adaptación que duró más de dos años, tal y como se detalla en el apartado 2 de Material y métodos. Las máximas concentraciones toleradas (MCT) que alcanzaron estas cepas creciendo en el medio PP210 son: 115 μM Cd^{2+} (\approx 2,5 veces la CL_{50} de la cepa control SB1969 en el medio PP210), 4mM Cu^{2+} (\approx 12,7 veces la CL_{50} de la cepa control SB1969 en el medio PP210) y 5,5 mM Pb^{2+} (\approx 5,7 veces la CL_{50} de la cepa control SB1969 en el medio PP210) (Tabla 22).

Mediante el análisis por citometría de flujo también se calcularon los valores de CL_{50} de estas cepas adaptadas a metales mantenidas en el tampón TrisHCl 0,01M pH 6,8 (Tabla 22). En estas condiciones, los valores de CL_{50} de las cepas Cd-ADAP y Pb-ADAP son muy superiores a los de la cepa control SB1969, aproximadamente el doble en el caso de la cepa Cd-ADAP y hasta unas 8 veces superior en el caso de la cepa Pb-ADAP. Sin embargo, en el caso de la cepa Cu-ADAP ocurre algo muy peculiar: su CL_{50} es unas 3,5 veces menor que la CL_{50} de la cepa control (Tabla 22). Al realizar el experimento se observó que, al eliminar o reducir el metal del medio, aumentaba enormemente la mortalidad celular de las células Cu-ADAP, cuyo metabolismo parece estar ya muy condicionado a la presencia constante de elevadas concentraciones de Cu^{2+} .

Tabla 22. Comparación de los valores de CL_{50} y máximas concentraciones toleradas para Cd^{2+} , Cu^{2+} o Pb^{2+} en el medio PP210 y en el tampón TrisHCl 0,01M (pH 6,8) entre la cepa control SB1969 y las cepas adaptadas a estos metales

Metal	CL_{50} de la cepa control SB1969 en el medio PP210 (μM)	Máxima concentración tolerada por las cepas adaptadas en el medio PP210 (μM)
Cd^{2+}	44,5	115
Cu^{2+}	315	4.000
Pb^{2+}	965	5.500
Metal	CL_{50} de la cepa control SB1969 en el tampón TrisHCl 0,01M pH 6,8 (μM)	CL_{50} de las cepas adaptadas en el tampón TrisHCl 0,01M pH 6,8 (μM)
Cd^{2+}	\approx 4,6	\approx 9,7
Cu^{2+}	\approx 100	\approx 28,5
Pb^{2+}	\approx 110	\approx 800

B.1.1. Análisis de las cinéticas de crecimiento de las cepas adaptadas a metales

Los parámetros de crecimiento y las curvas obtenidas se recogen en la Tabla 23 y en las Figs. 24, 25 y 26. Inicialmente se compararon las cinéticas de crecimiento de la cepa control SB1969 (en ausencia de metal) con las cinéticas de las tres cepas adaptadas a metales en presencia de 115 μM de Cd^{2+} para la cepa Cd-ADAP, 4 mM de Cu^{2+} para la cepa Cu-ADAP y 5,5 mM de Pb^{2+} para la cepa Pb-ADAP (Tabla 23, Fig. 24). Se observa que las cepas Cd-ADAP y Cu-ADAP presentan una tasa específica de crecimiento (μ) un 44% menor que la de la cepa control y, por tanto, su tiempo de generación (Tg) es muy superior, más del doble que el de la cepa control SB1969 (Tabla 23). De esta forma, parece que la adaptación a elevadas concentraciones de Cd^{2+} o Cu^{2+} implica un crecimiento celular más lento. Por el contrario, la cepa Pb-ADAP presenta una μ y un Tg similares al control (Tabla 23), lo que se infiere en que la adaptación a Pb^{2+} no implica un retardo significativo en el crecimiento celular.

Tabla 23. Parámetros obtenidos tras el estudio de las cinéticas de crecimiento de la cepa control SB1969 y de las tres cepas adaptadas a elevadas concentraciones de metal

1- PARAMETROS DE CRECIMIENTO EN CONDICIONES NORMALES			
Cepa (tratamiento)	μ (h^{-1})	Tg (h)	R^2
Cepa control SB1969*	0,0916	7,57	0,9338
Cd-ADAP (115 μM Cd^{2+})	0,0404	17,16	0,9334
Cu-ADAP (4 mM Cu^{2+})	0,0421	16,46	0,9485
Pb-ADAP (5,5 mM Pb^{2+})	0,0793	8,74	0,9649
2- ESTUDIO DE RESISTENCIAS CRUZADAS A METALES			
Cepa (tratamiento)	μ (h^{-1})	Tg (h)	R^2
Cd-ADAP (4mM Cu^{2+})	0,0348	19,92	0,9502
Cd-ADAP (5,5 mM Pb^{2+})	0,0283	24,49	0,9094
Cu-ADAP (5,5 mM Pb^{2+})	0,0231	30,01	0,9042
Cu-ADAP (115 μM Cd^{2+})	0,0169	41,01	0,9254
Pb-ADAP (115 μM Cd^{2+})	NC	NC	NC
Pb-ADAP (4 mM Cu^{2+})	0,0904	7,67	0,8954
3- ESTUDIO DE MEZCLAS METÁLICAS			
Cepa (tratamiento)	μ (h^{-1})	Tg (h)	R^2
Cd-ADAP (115 μM Cd^{2+} + 2 mM Cu^{2+})	0,0333	20,82	0,9494
Cd-ADAP (115 μM Cd^{2+} + 2,75 mM Pb^{2+})	0,0312	22,22	0,8847
Cu-ADAP (4mM Cu^{2+} + 57,5 μM Cd^{2+})	NC	NC	NC
Cu-ADAP (4mM Cu^{2+} + 2,75 mM Pb^{2+})	0,0374	18,53	0,9041
Pb-ADAP (5,5 mM Pb^{2+} + 57,5 μM Cd^{2+})	0,0294	23,58	0,856
Pb-ADAP (5,5 mM Pb^{2+} + 2 mM Cu^{2+})	NC	NC	NC

Se realizaron tres ensayos diferentes: 1- Comparación de los parámetros de crecimiento de la cepa control SB1969 en ausencia de metal (*) con los de las tres cepas adaptadas a metales, creciendo en presencia de las máximas concentraciones toleradas (MCT) de cada metal; 2- Análisis de resistencias cruzadas en las cepas adaptadas, crecidas en presencia de las MCT de los otros dos metales diferente al que fueron adaptadas; 3- Análisis de mezclas metálicas en las cepas adaptadas. μ : tasa específica o neperiana de crecimiento; Tg: tiempo de generación; R^2 : coeficiente de correlación. NC: no crecimiento: bajo determinados tratamientos, algunas de las cepas adaptadas no fueron capaces de crecer.

Resultados

En segundo lugar se llevó a cabo un ensayo de resistencias cruzadas entre los tres metales, en el que se expuso a cada una de las cepas adaptadas a las MCT de los otros dos metales a los que no fueron previamente adaptadas (Fig. 25). Los resultados muestran que las cepas Cd-ADAP (Fig. 25A) y Cu-ADAP (Fig. 25B) son capaces de crecer al exponerlas a otro metal diferente al que están adaptadas, aunque lo hacen de manera más lenta que la cepa control y que las mismas cepas adaptadas en presencia del metal al que se encuentran adaptadas. Por ejemplo, la cepa Cd-ADAP al exponerla a Cu^{2+} ó Pb^{2+} presenta una μ inferior a la que tiene cuando está en presencia de Cd^{2+} (metal al que fue adaptada) y muy inferior respecto a la μ de la cepa control. Los tiempos de generación de la cepa Cd-ADAP en presencia de Cu^{2+} o Pb^{2+} son muy superiores comparados con el Tg de la cepa control, del orden de $\approx 2,6$ veces y $\approx 3,2$ veces superiores, respectivamente (Tabla 23, Fig. 25A). Algo similar ocurre en el caso de la cepa Cu-ADAP, que al exponerla a Cd^{2+} ó Pb^{2+} presenta una μ inferior a aquella que tiene en presencia de Cu^{2+} (metal al que fue adaptada). Los Tg también son muy superiores respecto a los de la cepa control, del orden de $\approx 4-5$ veces superiores (Tabla 23, Fig. 25B). Finalmente, la cepa Pb-ADAP no es capaz de resistir la máxima concentración tolerable de cadmio a la que se expone habitualmente la cepa Cd-ADAP pero, tras la exposición a Cu^{2+} , la cepa Pb-ADAP presenta una μ y un Tg similares a los de la cepa control y a los de esta misma cepa en presencia de Pb^{2+} (Tabla 23, Fig. 25C).

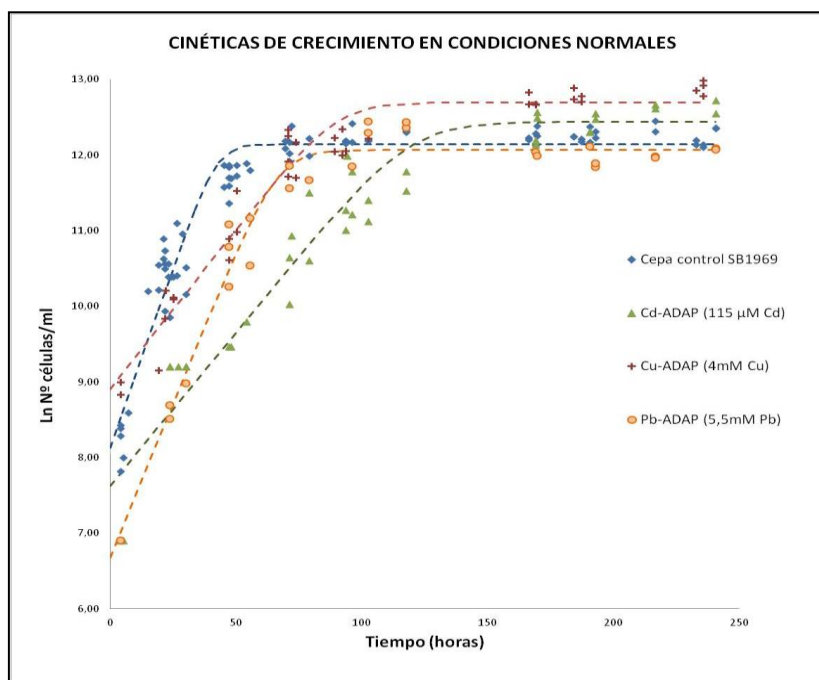


Fig 24. Comparación de las curvas de crecimiento de la cepa control SB1969 (en ausencia de metal) y de las tres cepas adaptadas creciendo en presencia de las máximas concentraciones toleradas de Cd^{2+} , Cu^{2+} y Pb^{2+} respectivamente.

En el último ensayo de crecimiento realizado con las cepas adaptadas a metales, éstas se expusieron a la mezcla de dos metales (doble exposición): aquel al que se encuentran adaptadas (a la concentración máxima) y a un segundo metal (a la mitad de la concentración

máxima). La cepa Cd-ADAP es la que mejor resiste la presencia de una mezcla de metales aunque los valores de las μ son ligeramente inferiores a los obtenidos en presencia sólo de Cd^{2+} . Los tiempos de generación son muy superiores (≈ 3 veces) a los de la cepa control SB1969 (Tabla 23, Fig. 26A). La cepa Cu-ADAP no es capaz de crecer en presencia de la mezcla $\text{Cu}^{2+} + \text{Cd}^{2+}$ pero sí al exponerla a la mezcla $\text{Cu}^{2+} + \text{Pb}^{2+}$. En esta última situación su velocidad de crecimiento es menor que en presencia de Cu^{2+} exclusivamente y su Tg es bastante superior al de la cepa control ($\approx 2,5$ veces) (Tabla 23, Fig. 26B). Por último, en el caso de la cepa Pb-ADAP, ésta no resiste el doble tratamiento $\text{Pb}^{2+} + \text{Cu}^{2+}$. Sin embargo, al exponerla a la mezcla $\text{Pb}^{2+} + \text{Cd}^{2+}$, sí que es capaz de crecer aunque su Tg es ≈ 3 veces mayor que el de la cepa control (Tabla 23, Fig. 26C).

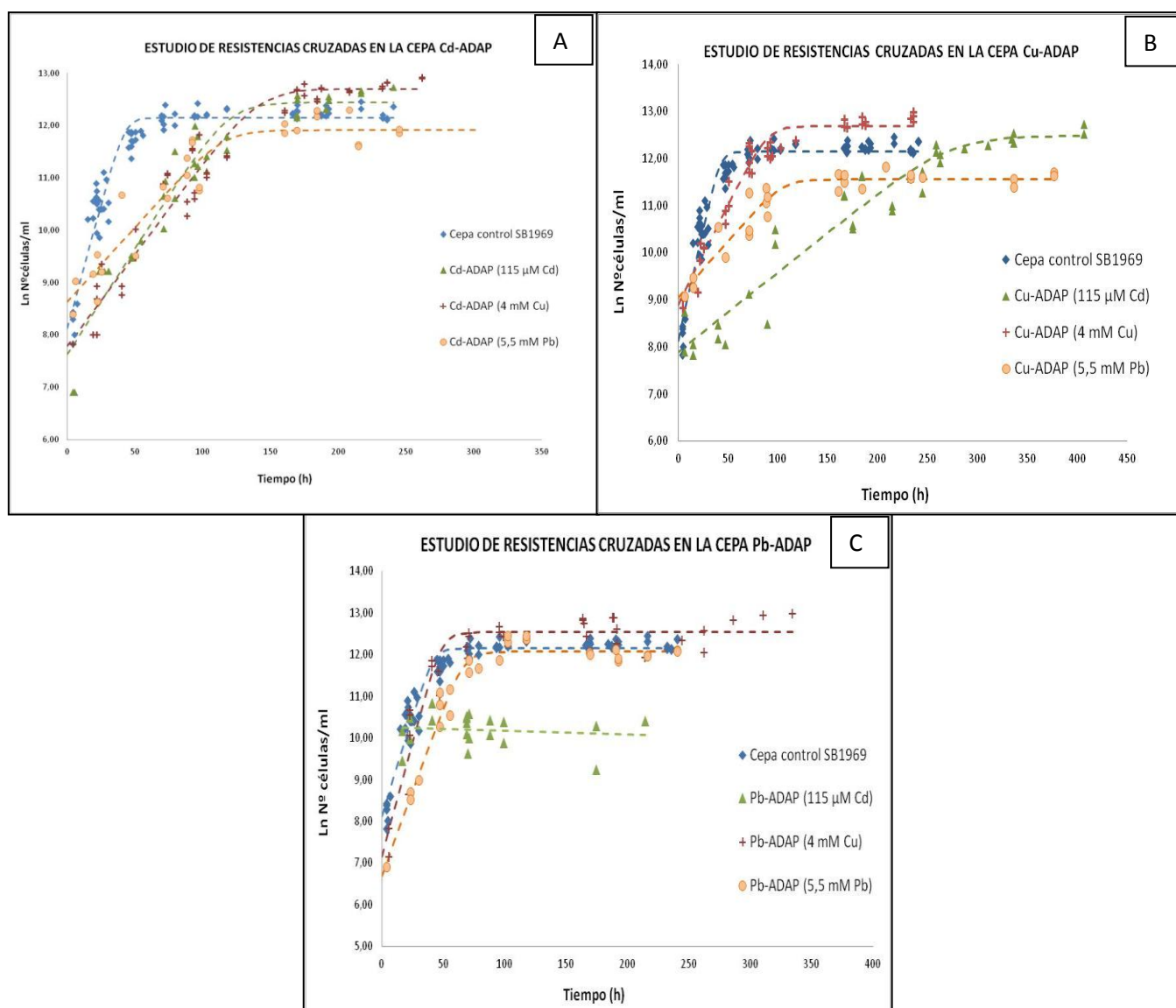


Fig 25. Comparación de las curvas de crecimiento de la cepa control y las cepas adaptadas a un determinado metal tras exponerlas tanto al metal al que fueron adaptadas como a otro metal al que no están adaptadas (en todo caso a las correspondientes concentraciones máximas toleradas). Se trata de un estudio de resistencias cruzadas realizado en las cepas Cd-ADAP (A), Cu-ADAP (B) y Pb-ADAP (C).

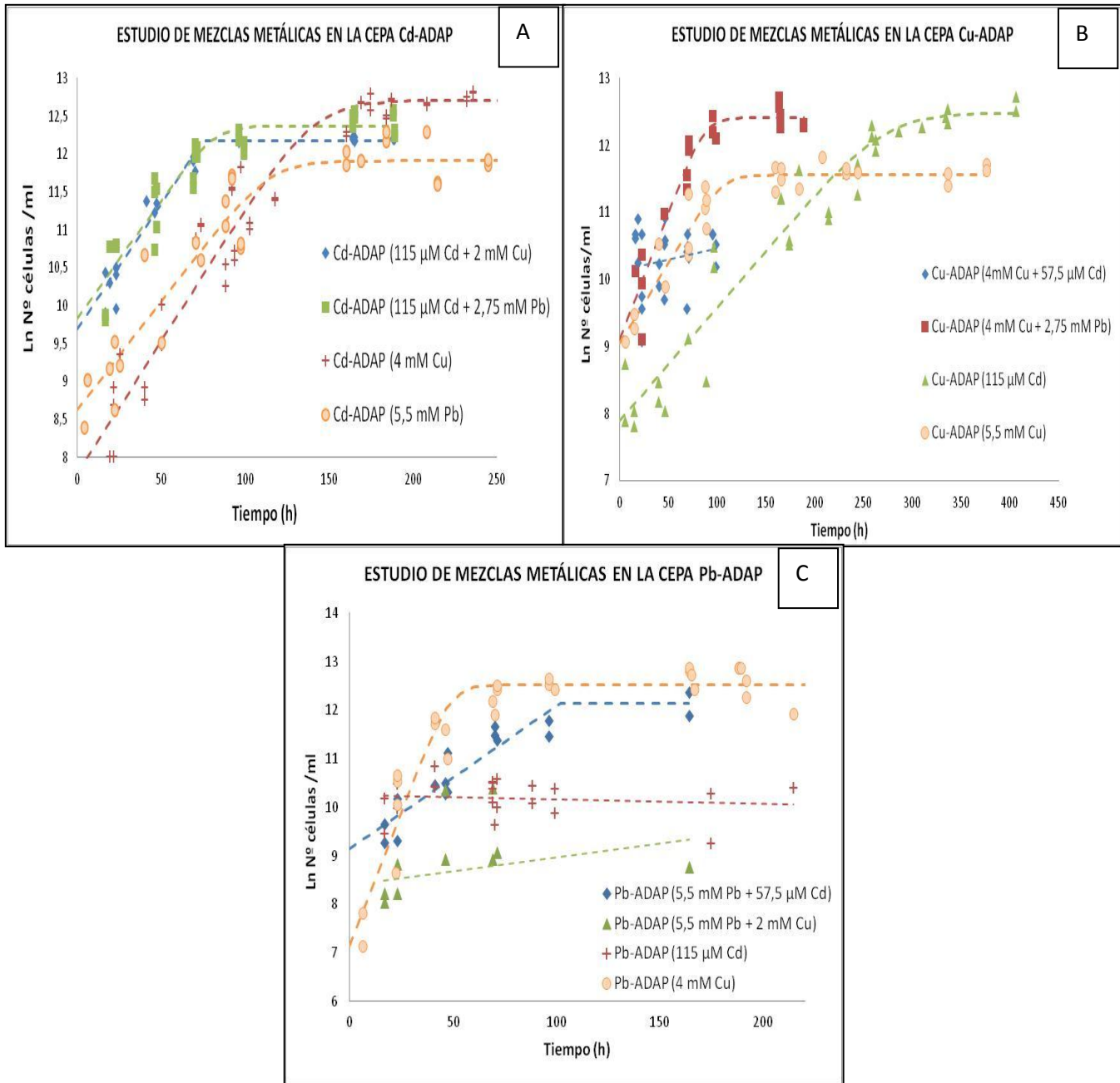


Fig 26. Comparación de las curvas de crecimiento de las cepas adaptadas a un determinado metal tras exponerlas tanto a una mezcla de dos metales (estudio de mezclas metálicas) como a los tratamientos cruzados (estudio de resistencias cruzadas). Resultados obtenidos para las cepas Cd-ADAP (A), Cu-ADAP (B) y Pb-ADAP (C).

B.1.2. Análisis morfológico-estructural de las cepas adaptadas a metales

La caracterización morfológica se llevó a cabo mediante diferentes análisis realizados por microscopía óptica, microscopía electrónica de transmisión (MET) (Figs. 27-38) y microscopía de fluorescencia confocal (Figs. 39-41) empleando diferentes fluorocromos (DAPI y Leadmium Green). En estos ensayos se compararon las cepas adaptadas a metales con la cepa control

SB1969. También se llevó a cabo un ensayo por MET en el que las cepas adaptadas se mantuvieron durante un mes en ausencia de metal (adap -1 mes) y posteriormente se volvieron a exponer a las MCTs para cada metal durante 24h (adap -1 mes + MCT 24h).

✓ Análisis mediante microscopía electrónica de transmisión (MET)

La observación tanto de los cortes semifinos (mediante microscopía óptica) como de los cortes ultrafinos (por MET) nos permitió diferenciar algunas características estructurales en las cepas adaptadas a metales con respecto a la cepa control SB1969.

En la Fig. 27 se muestran algunas imágenes obtenidas de una población de células control (cepa SB1969). Como se aprecia en las Figs. 27A y B, las células presentan su típico aspecto piriforme, con un sistema nuclear compuesto por el macronúcleo (Ma) y el micronúcleo (Mi). El Ma está formado por una cromatina constituida por numerosos y pequeños cuerpos cromatínicos y se observan numerosos nucleolos dispuestos en la periferia, próximos a la membrana nuclear (Figs. 27C y D). El citoplasma es rico en ribosomas y las mitocondrias, que son muy numerosas, se localizan principalmente en la periferia celular, bajo la película del ciliado (Figs. 27E, F y G). Se pueden distinguir crestas mitocondriales tanto tubulares como laminares (Figs. 27E y F). Adosados en la película existen los cuerpos de extrusión denominados mucocistos (Fig. 27E). En la parte posterior celular suelen aparecer numerosas vacuolas alimenticias que muestran un contenido membranoso y granuloso (Figs. 27B y G). El retículo endoplasmático rugoso (REr) se localiza tanto en el citoplasma (Fig. 27H) como rodeando a las mitocondrias (Figs. 27E y F).

Las células Cd-ADAP presentan una forma similar a la de la cepa control SB1969 (Fig. 28aA). Igualmente, su sistema nuclear está compuesto por un micronúcleo parecido al de la cepa control pero el macronúcleo está formado por una cromatina menos condensada y se distinguen menos regiones nucleolares (Figs. 28aB). Sus mitocondrias también aparecen rodeadas de REr (Fig. 28aC) tal y como observábamos en la cepa control. Particularmente, en las células Cd-ADAP aparecen numerosas vesículas electro-lúcidas con un contenido ligeramente electro-denso y cuyo aspecto nos recuerda a un "huevo frito". Estas vesículas se distribuyen homogéneamente en el citoplasma (Figs. 28aD y E). En las células Cd-ADAP también se detecta una intensa actividad autofágica y abundan los autofagolisosomas (Fig. 28aE y H). En la imagen I de la Fig. 28b se muestran dos tipos de orgánulos que representan al menos dos fases del proceso autofágico (los autofagolisosomas y los autofagosomas) y que aparecen junto con los lisosomas (orgánulos pequeños muy electro-densos) en el mismo recinto citoplasmático. En el interior de las vacuolas se detectan depósitos irregulares de material electro-denso (Figs. 28aF y G). Otra característica de esta cepa Cd-ADAP es la presencia de un gran número de mucocistos en comparación con la cepa control, en donde son menos numerosos. Además, el contenido de estos mucocistos es, en muchos de ellos, muy electro-denso (Figs. 28bJ, K y M) en comparación con el de los mucocistos observados en la cepa control (Fig. 27E).

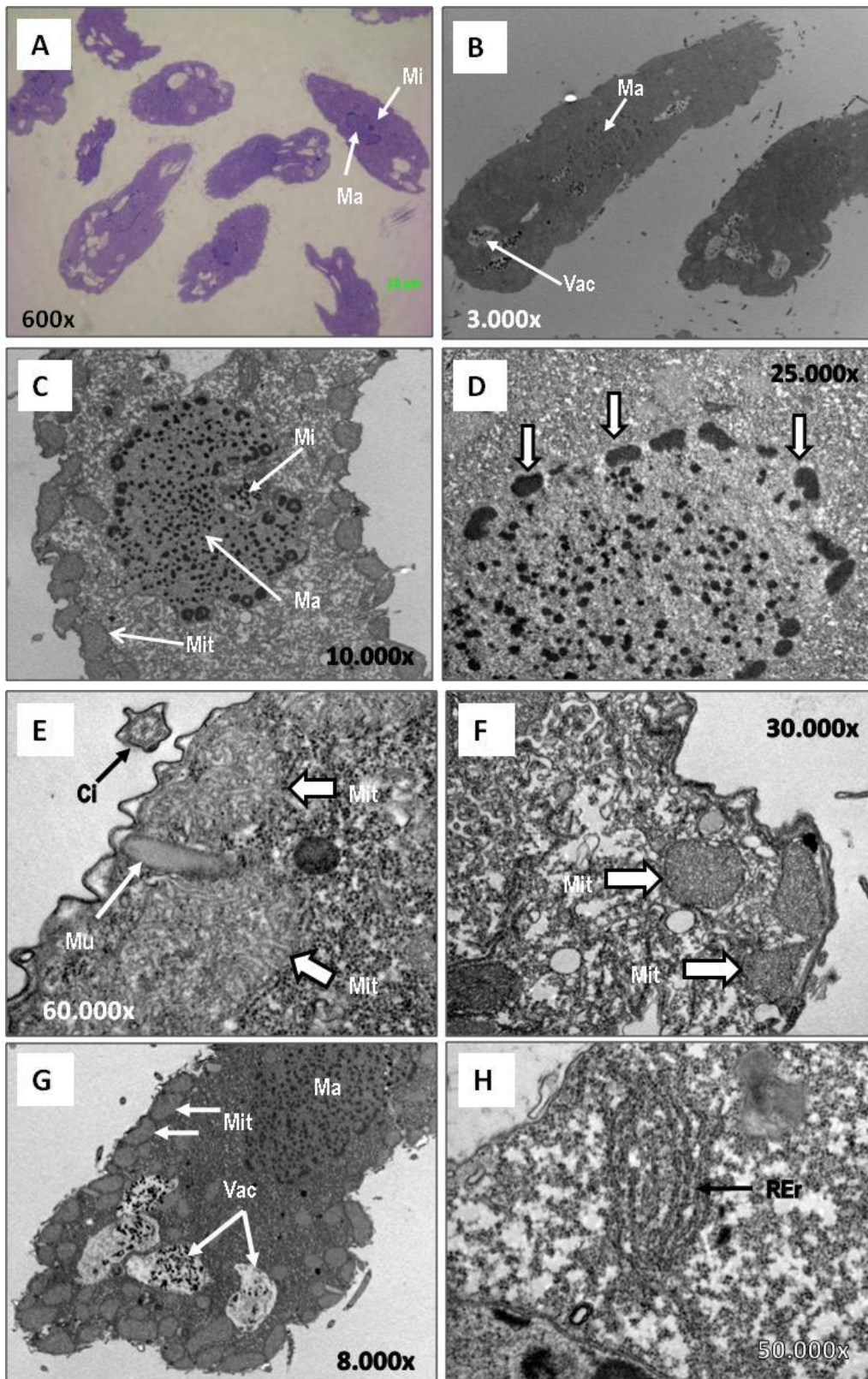


Fig. 27. Micrografías obtenidas por microscopía óptica (cortes semifinos) y microscopía electrónica de transmisión (MET) de la cepa control SB1969 de *T. thermophila*. (A): Corte semifino de la muestra celular (Ma: macronúcleo, Mi: micronúcleo). (B): Corte longitudinal de células completas (Vac: vacuola). (C): Aspecto de la cromatina macronuclear y nucleolos (Mit: mitocondria). (D): Macronúcleo (las flechas indican los nucleolos). (E): Aspecto del citoplasma (Mu: mucocisto, Ci: cilio, Mit: mitocondria rodeada de retículo endoplasmático rugoso). (F): Mitocondrias. (G): Parte posterior de la célula con vacuolas digestivas. (H): Retículo endoplasmático rugoso (REr).

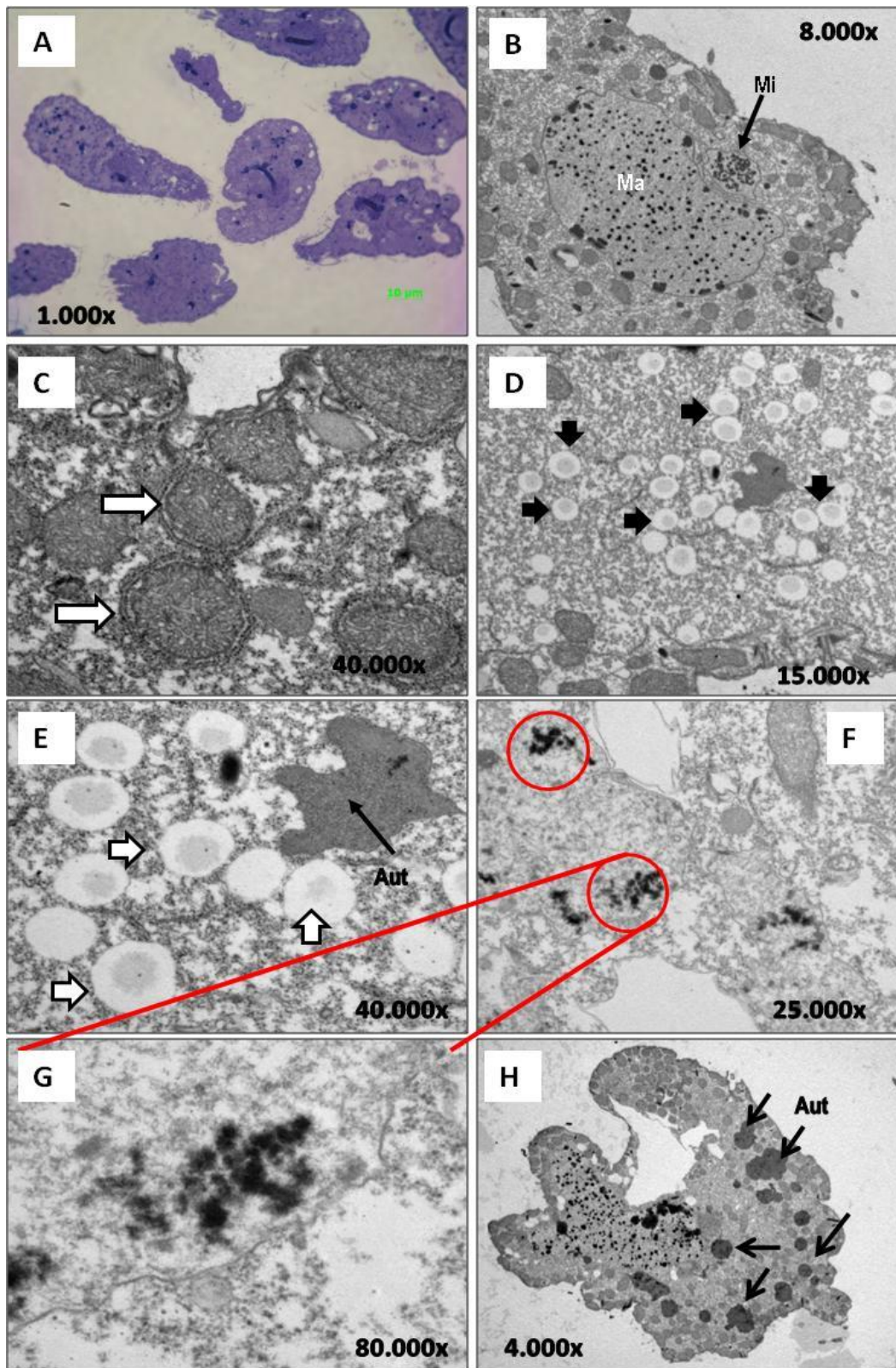


Fig. 28a. Micrografías de la cepa adaptada al cadmio (Cd-ADAP). (A): Imagen al microscopio óptico de un corte semifino. (B): Sistema nuclear (Ma: macronúcleo, Mi: micronúcleo). (C): Mitocondrias (indicadas por las flechas) rodeadas de REr. (D): Numerosas vesículas electro-lúcidas (señaladas con flechas). (E): Sección aumentada de la imagen D en la que se muestran las vesículas electro-lúcidas (flechas) y un autofagolisosoma (Aut). (F): Depósitos electro-densos en el interior de una vacuola. (G): Región aumentada de la imagen F. (H): Corte transversal de una célula con numerosos autofagolisosomas (flechas).

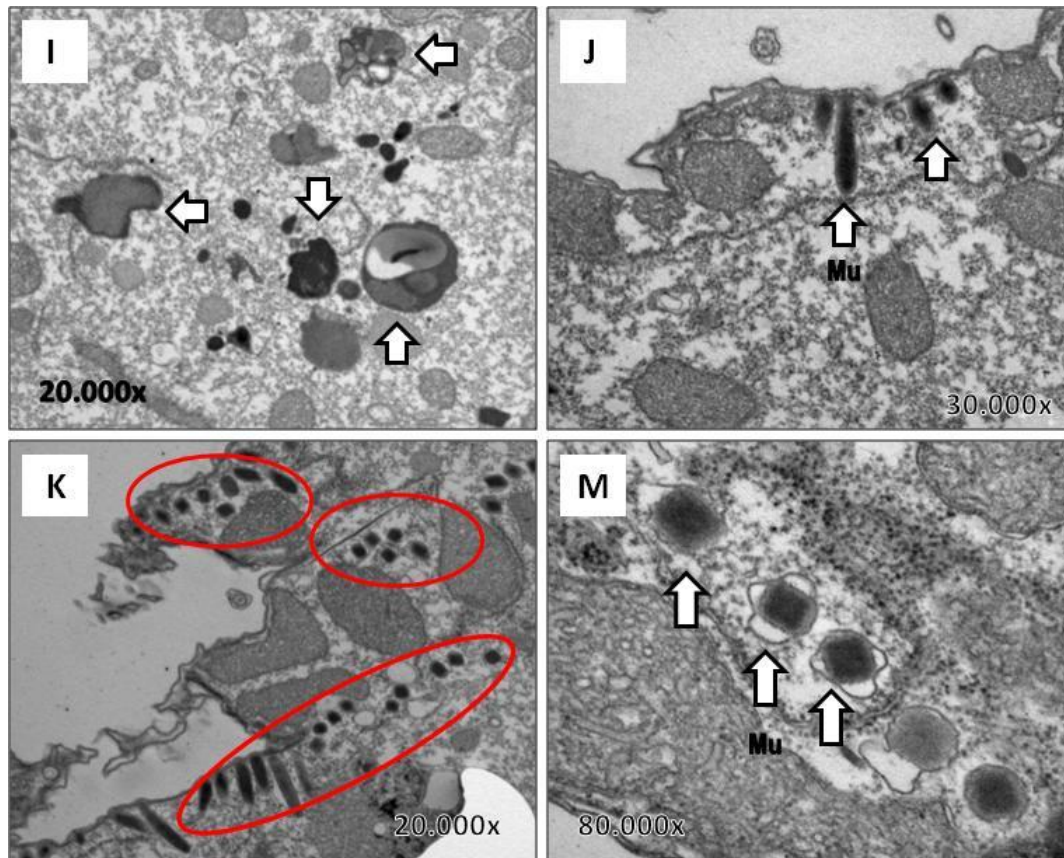


Fig. 28b. Micrografías de la cepa Cd-ADAP. **(I):** Autofagosoma, lisosomas y autofagolisosomas (señalados con flechas). **(J):** Mucocistos electro-densos (Mu) (señalados con flechas). **(K):** Numerosos mucocistos (indicados dentro de los óvalos rojos) en corte longitudinal y transversal. **(M):** Corte transversal de una hilera de mucocistos (Mu); se distingue la membrana mucocística en muchos de ellos (señalada con flechas).

Las células Cu-ADAP se caracterizan por presentar la típica morfología piriforme de *Tetrahymena thermophila* pero su contorno celular aparece más irregular o festoneado (Figs. 29A y B). Su macronúcleo y micronúcleo presentan un aspecto similar al de la cepa control (Fig. 29D). En su citoplasma se distinguen numerosas vacuolas con un contenido irregular (Fig. 29E). A nivel ultraestructural, lo más destacado en esta cepa Cu-ADAP es el cambio en la morfología mitocondrial. Las mitocondrias son más alargadas y aparecen más condensadas en la periferia celular (Figs. 29C, E y F). Sin embargo, su estructura interna es similar a la de las mitocondrias de la cepa control (Figs. 29G y H). El aspecto de los mucocistos es también similar al de la cepa control (Fig. 29H).

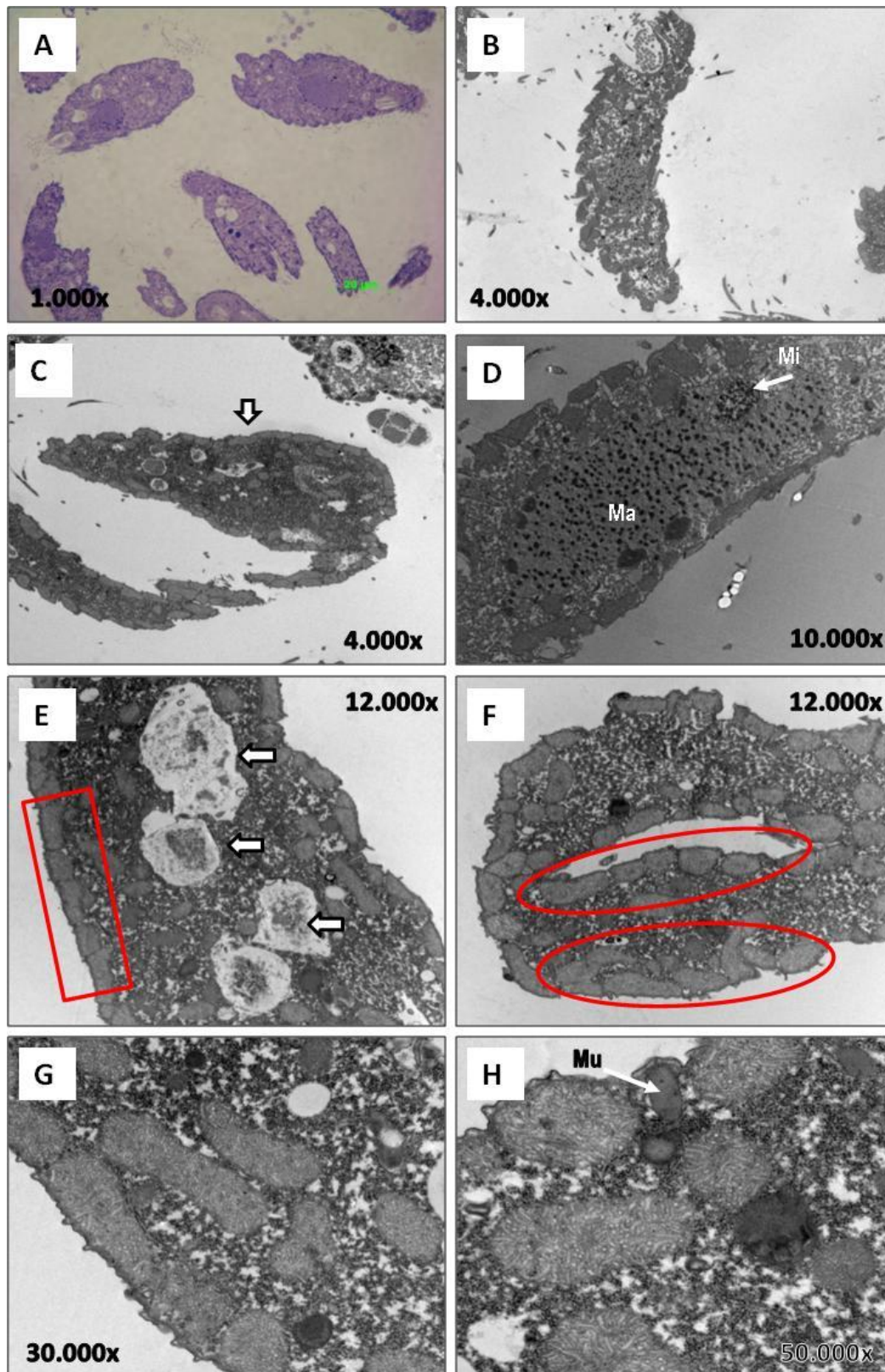


Fig. 29. Micrografías de la cepa Cu-ADAP. (A): Imagen de varias células obtenida de un corte semifino. (B): Corte longitudinal de una célula completa. (C): Corte longitudinal de una célula completa en el que se distinguen numerosas mitocondrias condensadas en la periferia (indicado con una flecha). (D): Sistema nuclear (Ma: macronúcleo, Mi: micronúcleo). (E): Numerosas vacuolas (indicadas con flechas) y mitocondrias condensadas en la periferia celular (señaladas con un rectángulo rojo). (F): Mitocondrias condensadas en la periferia celular (indicadas con óvalos rojos). (G): Mitocondrias. (H): Mitocondrias y mucocisto (Mu) (señalado con una flecha).

Resultados

Las células Pb-ADAP tienen un sistema nuclear muy similar al que presenta la cepa control (Fig. 30aD). Sin embargo, su morfología celular es algo diferente pues observamos células más redondeadas o hinchadas que han perdido en muchos casos la típica forma piriforme (Fig. 30aA). Igualmente, ya en los cortes semifinos se distingue la presencia de grandes y numerosos acúmulos electro-densos presentes tanto dentro como fuera de las células (Fig. 30aA). A nivel ultraestructural, estos acúmulos se distinguen perfectamente como inclusiones ovaladas de contenido granuloso muy electro-denso (Figs. 30aB, C y D). Su número a veces es muy abundante, llegando a cuantificarse hasta más de 10 acúmulos por célula (Fig. 30aD). Estos acúmulos o inclusiones electro-densas parecen formarse dentro de vacuolas (Fig. 30bi), en las que se va concentrando el contenido granuloso hasta llenarse. En algunas imágenes (Figs. 30bE y J) se observa un halo claro alrededor del acúmulo, pudiendo apreciarse una fina membrana que lo envuelve o rodea. Estos acúmulos son expulsados o excretados al exterior celular y por esta razón aparecen igualmente fuera del citoplasma (Figs. 30aD, 30bF y H). A veces la expulsión puede tener lugar a través de la zona oral del ciliado (Fig. 30bG). A mayores aumentos (Fig. 30bJ) se aprecia que el contenido electro-denso de los acúmulos tiene un aspecto granuloso formado por un conglomerado irregular de partículas.

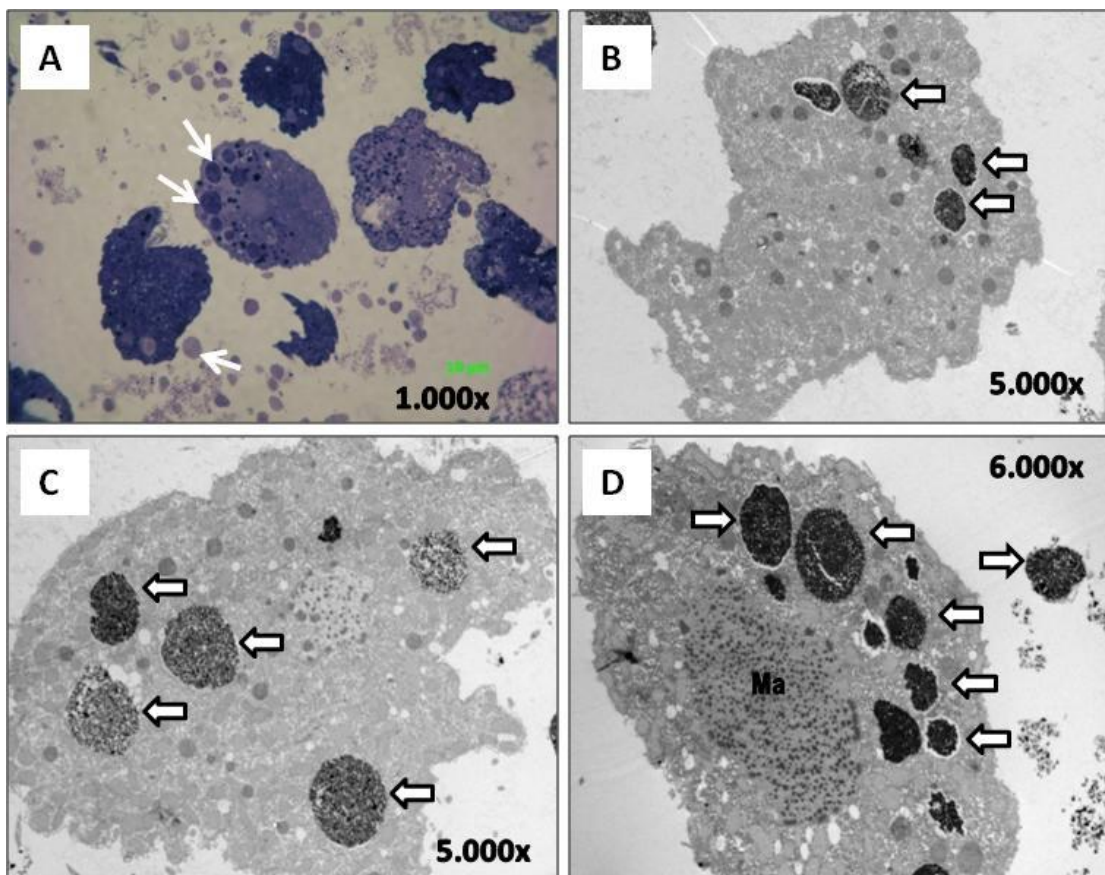


Fig. 30a. Micrografías de la cepa Pb-ADAP. (A): Imagen de varias células obtenida de un corte semifino. Se distinguen acúmulos electro-densos ovalados tanto dentro como fuera de las células (algunos aparecen señalados con flechas). (B): Corte transversal de una célula con inclusiones ovaladas granulosas electro-densas (flechas). (C): Inclusiones granulosas electro-densas (flechas). (D): Inclusiones electro-densas dentro de vacuolas y fuera del citoplasma (flechas).

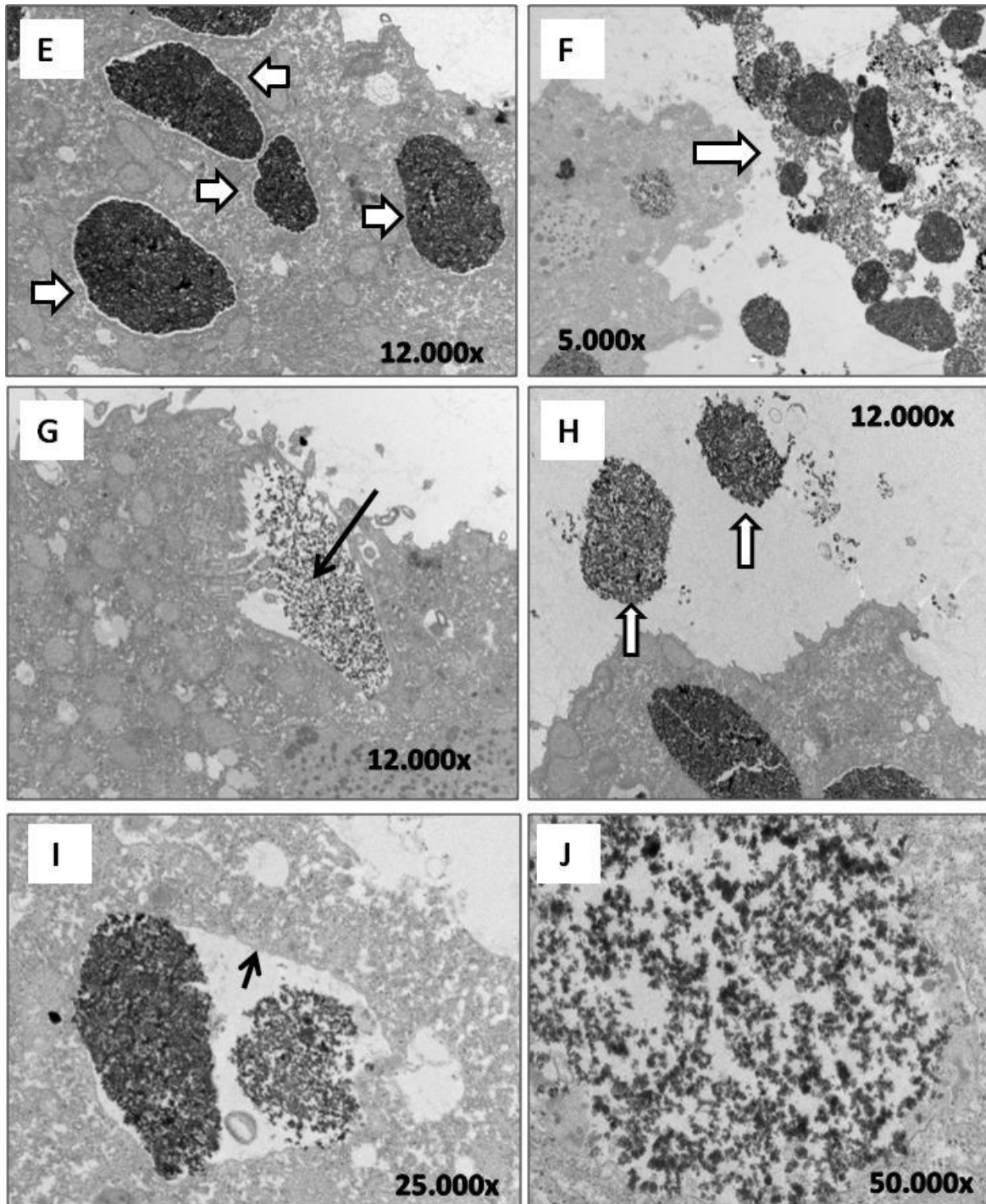


Fig.30b. Micrografías de la cepa Pb-ADAP. (E): Imagen aumentada de las inclusiones electro-densas. (F): Contenido electrodenso granuloso fuera de la célula (flecha). (G): Contenido granuloso electro-denso dentro de la cavidad bucal celular (flecha). (H): Inclusiones electro-densas dentro y fuera de la célula (flechas). (I): Material electro-denso granuloso dentro de una vacuola (flecha). (J): Detalle ampliado del material granuloso-particulado electro-denso.

Con la finalidad de conocer si estas alteraciones estructurales eran reversibles, las cepas adaptadas a metales (mantenidas siempre en constante exposición al mismo) se mantuvieron durante un mes (- 1 mes) sin la presencia del metal correspondiente y, posteriormente, se

Resultados

analizaron por microscopía electrónica. Igualmente, tras este mes sin el metal, estas poblaciones celulares se volvieron a exponer a la MCT de su correspondiente metal durante 24h (+metal MCT 24h) y también se analizaron por microscopía electrónica.

La cepa Cd-ADAP (- 1 mes) ya no mostraba un elevado número de mucocistos electro-densos ni las vesículas con aspecto de "huevo frito" que se detectaban en la cepa Cd-ADAP bajo constante exposición al metal (Fig. 31). La cromatina macronuclear también presentaba un aspecto similar al de la cepa control aunque a nivel nucleolar se aprecia un cambio en su estructura habitual (Fig. 31B). Estos nucleolos muestran una estructura más filamentosa o alargada (Fig. 30B) en lugar de la típica arriñonada u ovoide que presentan tanto la cepa control (Fig. 27D) como la Cd-ADAP (Fig. 28aB). Otro cambio estructural a destacar es la abundancia de vesículas con un bajo nivel de electro-densidad que se excretan al exterior celular y cuyo contenido es más uniforme (Figs. 31C y D).

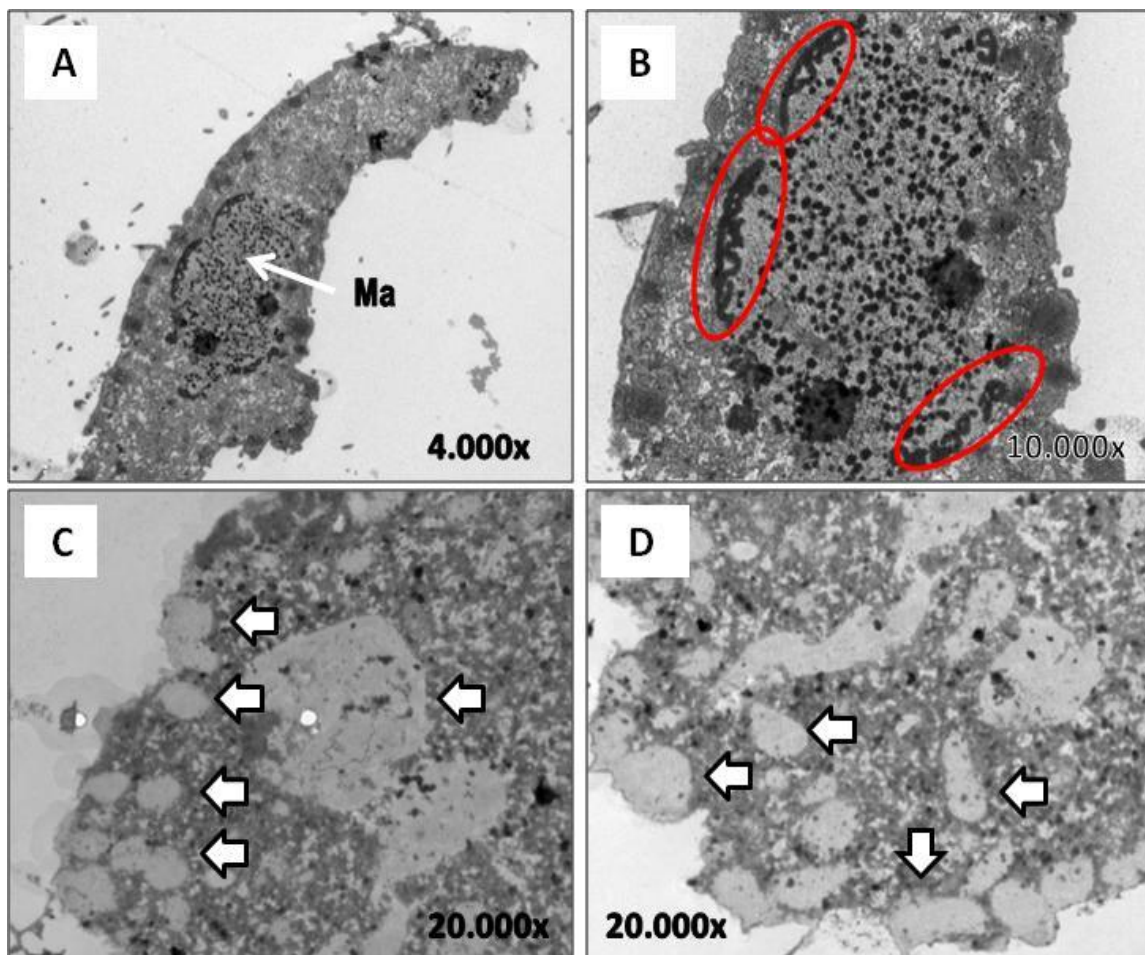


Fig. 31. Micrografías de la cepa Cd-ADAP mantenida durante un mes en ausencia del metal (Cd^{2+}). (A): Corte longitudinal de una célula (Ma: macronúcleo). (B): Imagen amplificada de la región nuclear. Se aprecian fenómenos de fusión nucleolar (señalados dentro de los óvalos rojos). (C): Vesículas excretadas (indicadas con flechas). (D): Vesículas excretadas (señaladas con flechas).

En la Fig. 32, se muestran imágenes de la cepa Cd-ADAP (-1 mes) + Cd MCT 24h. Como se aprecia en las Figs. 32B y C aparecen numerosas vesículas electro-lúcidas en los citoplasmas celulares que nos recuerdan a las vesículas con aspecto de "huevo frito" típicas de las células Cd-ADAP, aunque carecen del contenido más electro-denso en su interior.

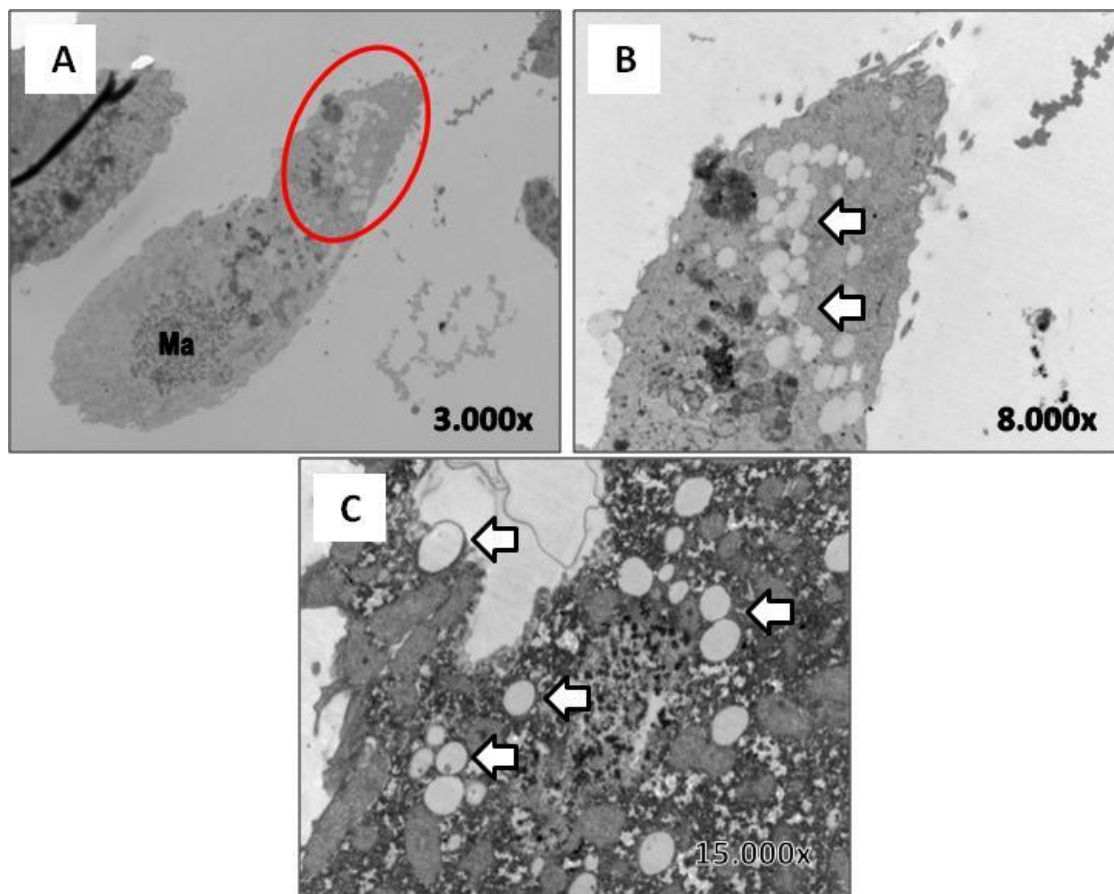


Fig. 32. Micrografías de la cepa Cd-ADAP (-1 mes) + CdMCT24h. **(A):** Corte longitudinal celular, con numerosas vesículas (indicadas dentro del óvalo rojo). **(B):** Imagen ampliada de la región anterior celular; se distinguen numerosas vesículas (señaladas con flechas). **(C):** Vesículas (indicadas con flechas).

En la cepa Cu-ADAP (-1 mes) ya no aparecen los conglomerados mitocondriales periféricos previamente observados (Figs. 29C, E y F) sino que las mitocondrias, al igual que en la cepa control, se distribuyen más separadas unas de otras, tienen una morfología menos alargada y, aunque son más abundantes en la periferia celular, también se encuentran en el interior citoplasmático (Figs. 33B, C y D). También se observan vacuolas con un contenido granuloso electro-denso (Figs. 33B, C y D) junto con algunas vesículas (Fig. 33D) que nos recuerdan a las observadas en la cepa Cd-ADAP (-1 mes) + CdMCT24h (Fig. 32C). Cuando se somete de nuevo a esta cepa a la MCT del cobre durante 24h vuelven a aparecer los conglomerados mitocondriales periféricos y las mitocondrias alargadas (Fig. 34A, B y C) características de la adaptación al cobre.

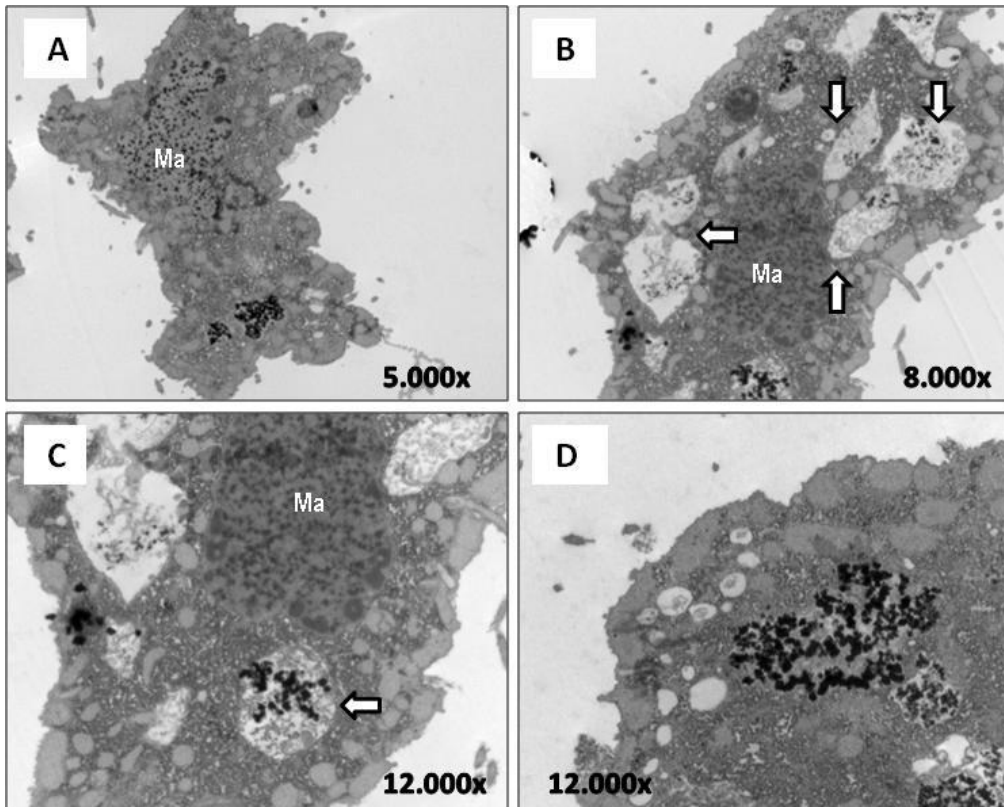


Fig. 33. Micrografías de la cepa Cu-ADAP (-1 mes). (A): Corte transversal de una célula (Ma: macronúcleo). (B): Vacuolas (señaladas con flechas). (C): Imagen ampliada de las vacuolas con contenido granular electro-denso (indicada con una flecha) (Ma: macronúcleo). (D): Vacuola con contenido granular electro-denso.

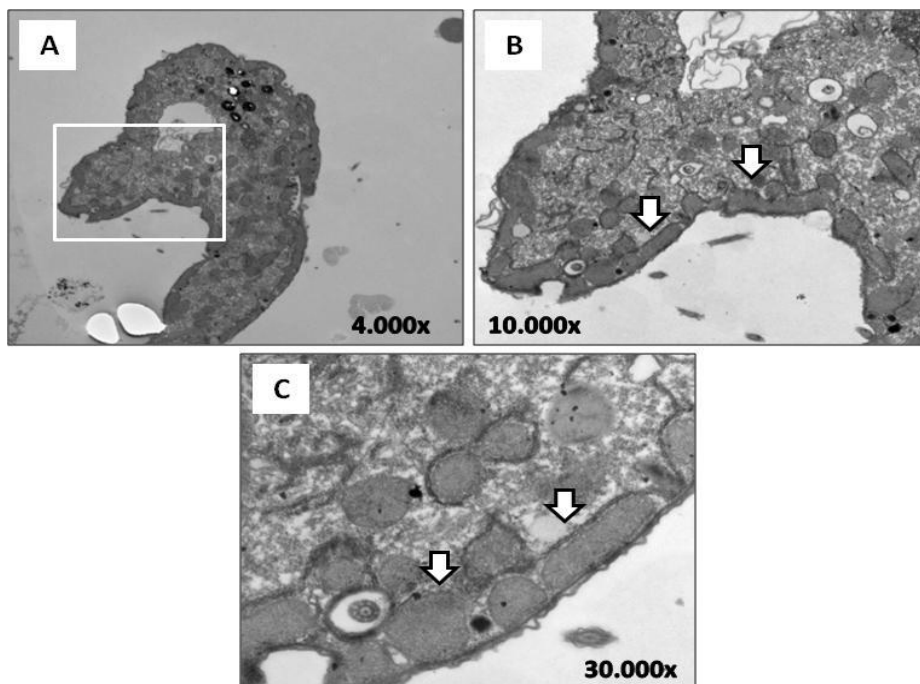


Fig. 34. Micrografías de la cepa Cu-ADAP (- 1 mes) + Cu MCT 24h. (A): Corte transversal de una célula. (B): Región aumentada de la imagen (A) (indicada con un rectángulo blanco). Mitochondrias (señaladas con flechas). (C): Mitochondrias (flechas).

Cuando se mantiene durante un mes a la cepa Pb-ADAP sin la presencia de plomo en el medio [cepa Pb-ADAP (-1 mes)], se aprecia una disminución en el número de acúmulos electro-densos así como un menor contenido en gránulos electro-densos (Fig. 35). Además, como se observa en la Fig. 35B, en esta cepa los gránulos están más dispersos dentro de la vacuola. Tampoco se observan estos acúmulos en el exterior celular, algo común en las células expuestas constantemente al metal. Finalmente, al exponer de nuevo a estas células al metal (MCT de Pb^{2+}) durante 24h, se observa que se vuelven a formar los acúmulos electro-densos típicos de las células Pb-ADAP, cuyo contenido se expulsa al exterior celular (Figs. 36A, B y C). Tanto en la cepa Pb-ADAP (-1 mes) como en la Pb-ADAP (-1 mes) + Pb MCT 24h se observan vesículas electro-lúcidas excretando su contenido (Fig. 36C). Éstas presentan un aspecto muy similares a las descritas en las cepas Cd-ADAP (-1 mes) + Cd MCT 24h (Figs. 32B y C) y Cu-ADAP (-1 mes) (Fig. 33D).

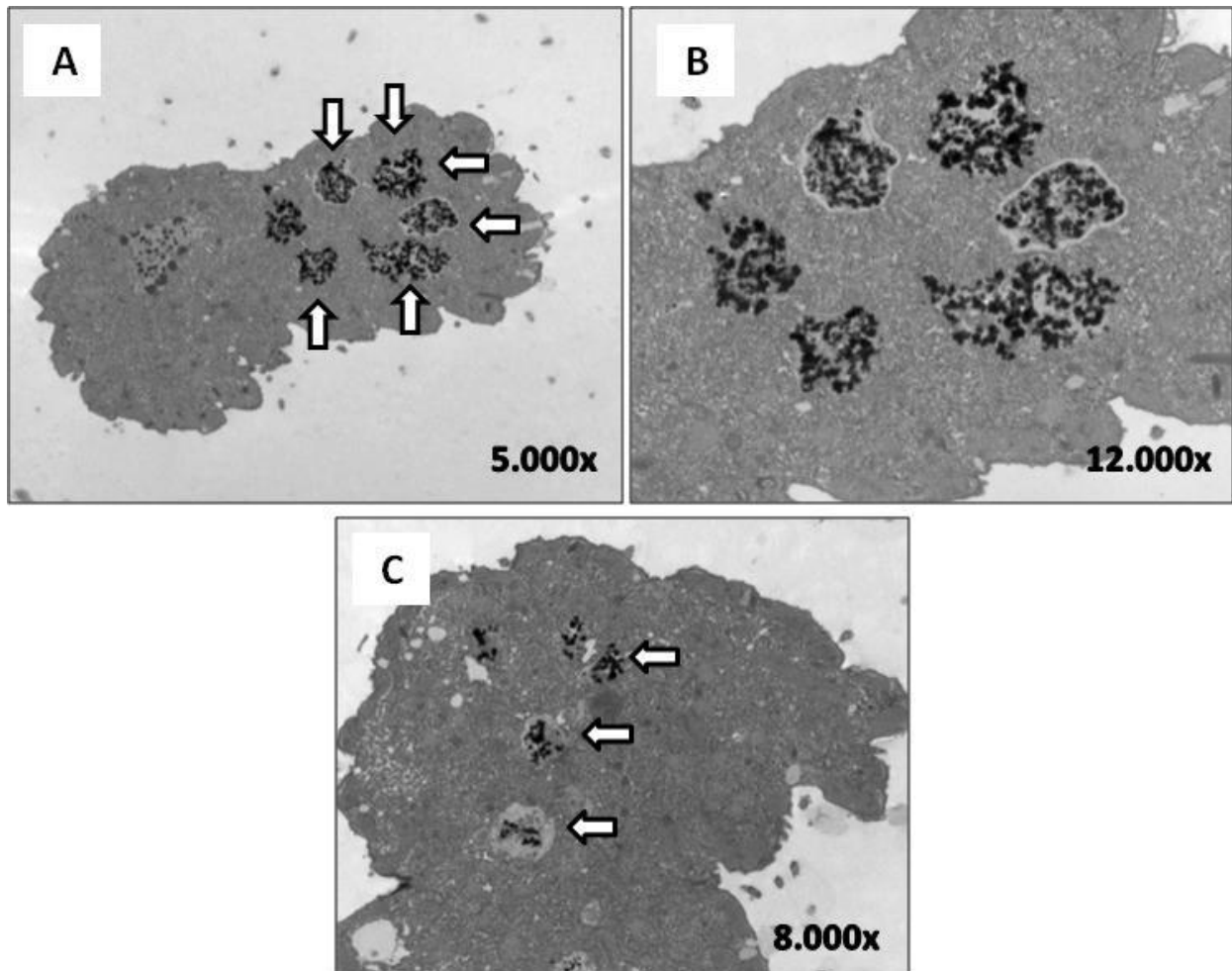


Fig. 35. Micrografías de la cepa Pb-ADAP (-1 mes). **(A):** Corte transversal de una célula. Vacuolas con acúmulos electro-densos (señalados con flechas). **(B):** Ampliación de una parte de la imagen **(A)**. **(C):** Vacuolas con algunos acúmulos electro-densos (señalados con flechas).

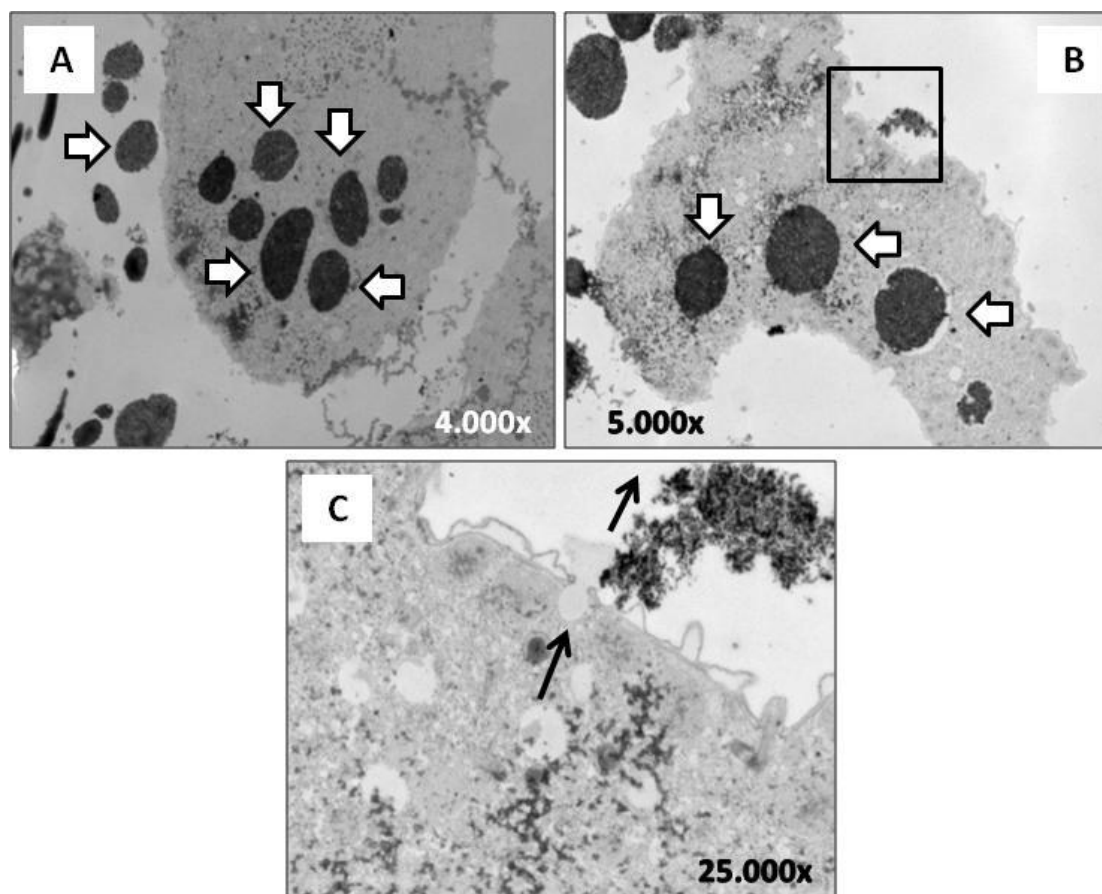


Fig. 36. Micrografías de la cepa Pb-ADAP (-1 mes) + Pb MCT 24h. **(A):** Numerosos acúmulos electro-densos dentro y fuera de la célula (indicados con flechas). **(B):** Acúmulos electro-densos (flechas). **(C):** Ampliación de una región de la imagen **(B)** (indicada dentro del cuadrado). Extrusión de una vesícula electro-lúcida y de material granular electro-denso (flechas).

✓ **Microanálisis de los gránulos electro-densos detectados en la cepa Pb-ADAP**

La composición química de los gránulos electro-densos detectados en la cepa Pb-ADAP se dilucidó mediante microanálisis acoplado al microscopio electrónico (TEM-EDXMA). Algunos de los espectros obtenidos se muestran en la Fig. 37A junto con micrografías electrónicas de los gránulos de la muestra medida (Figs. 37B y Fig. 38). En los espectros se observa que, además del elevado contenido en carbono, oxígeno, fósforo o cloro (típicos de toda muestra biológica y que se corresponden con los picos localizados principalmente a la izquierda del espectro) y cobre (detectado debido a la naturaleza metálica de la propia rejilla sobre la que se montan los cortes ultrafinos), se muestran en cada espectro entre 6 y 8 picos que se identifican con el plomo (Fig. 37A). Además, en todos los espectros obtenidos se observa un patrón muy similar para estos picos de plomo: destaca un pico bastante elevado y predominante con valor de 2,5 keV y otros picos menores con valores de 9, 10.5, 13 y 15 keV (Fig. 37A). Los agregados electro-densos presentan un diámetro de entre 100 y 200 nm y, a su vez, se componen de pequeños granos de tamaño muy inferior (\approx 10-15 nanómetros) (Fig. 38).

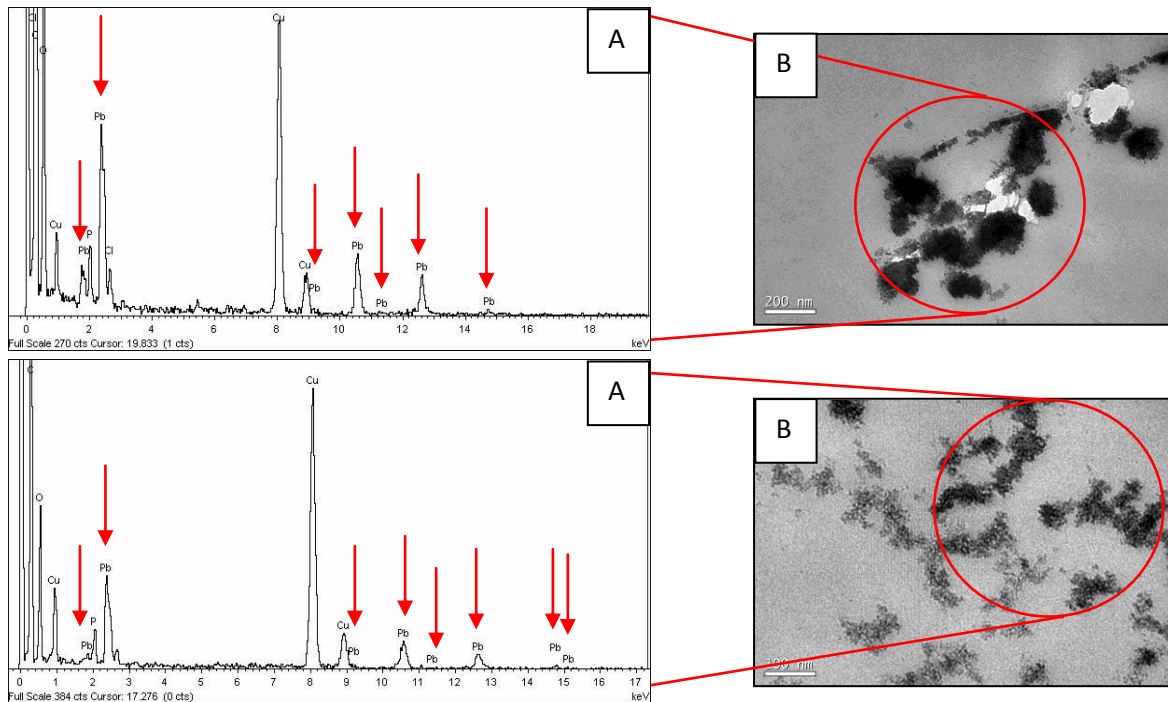


Fig. 37. Resultados del microanálisis de los gránulos electro-densos característicos de la cepa Pb-ADAP. (A): Se muestran los espectros de dos pruebas diferentes del microanálisis (las flechas indican los picos del Pb). (B): Micrografías obtenidas con el microscopio electrónico de las regiones (gránulos electro-densos dentro de los círculos rojos) utilizadas en el microanálisis. La barra equivale a 100 ó 200 nm.

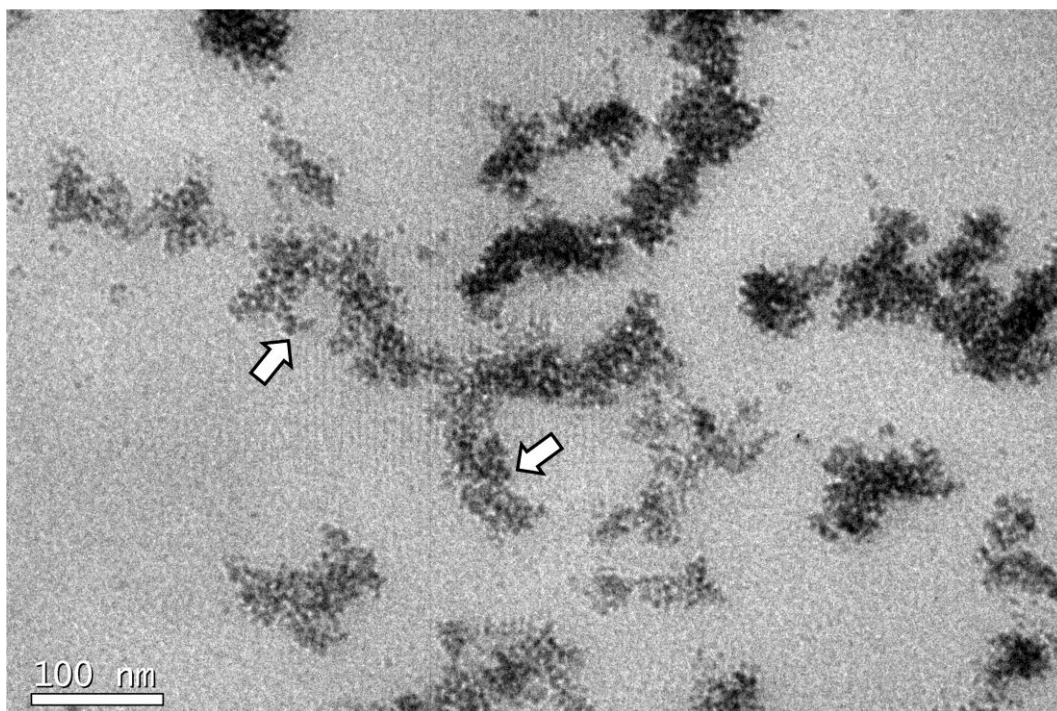


Fig. 38. Micrografía ampliada de una muestra de los gránulos electro-densos utilizados en el microanálisis. Las flechas indican las nano-partículas de las que se componen estos agregados. Barra: 100 nm.

✓ **Análisis mediante microscopía de fluorescencia confocal**

Se han utilizado dos fluorocromos: DAPI y Leadmium Green, que nos han permitido analizar el sistema nuclear y los posibles depósitos o acúmulos de Pb^{2+} o Cd^{2+} presentes en las células adaptadas a metal.

En general, la tinción con DAPI nos revela que las cepas adaptadas a metales parecen presentar un macronúcleo de mayor tamaño. En estas cepas se observan macronúcleos con una cromatina menos compactada o más difusa (Figs. 39B, C y D) si los comparamos con el de la cepa control (Fig. 39A).

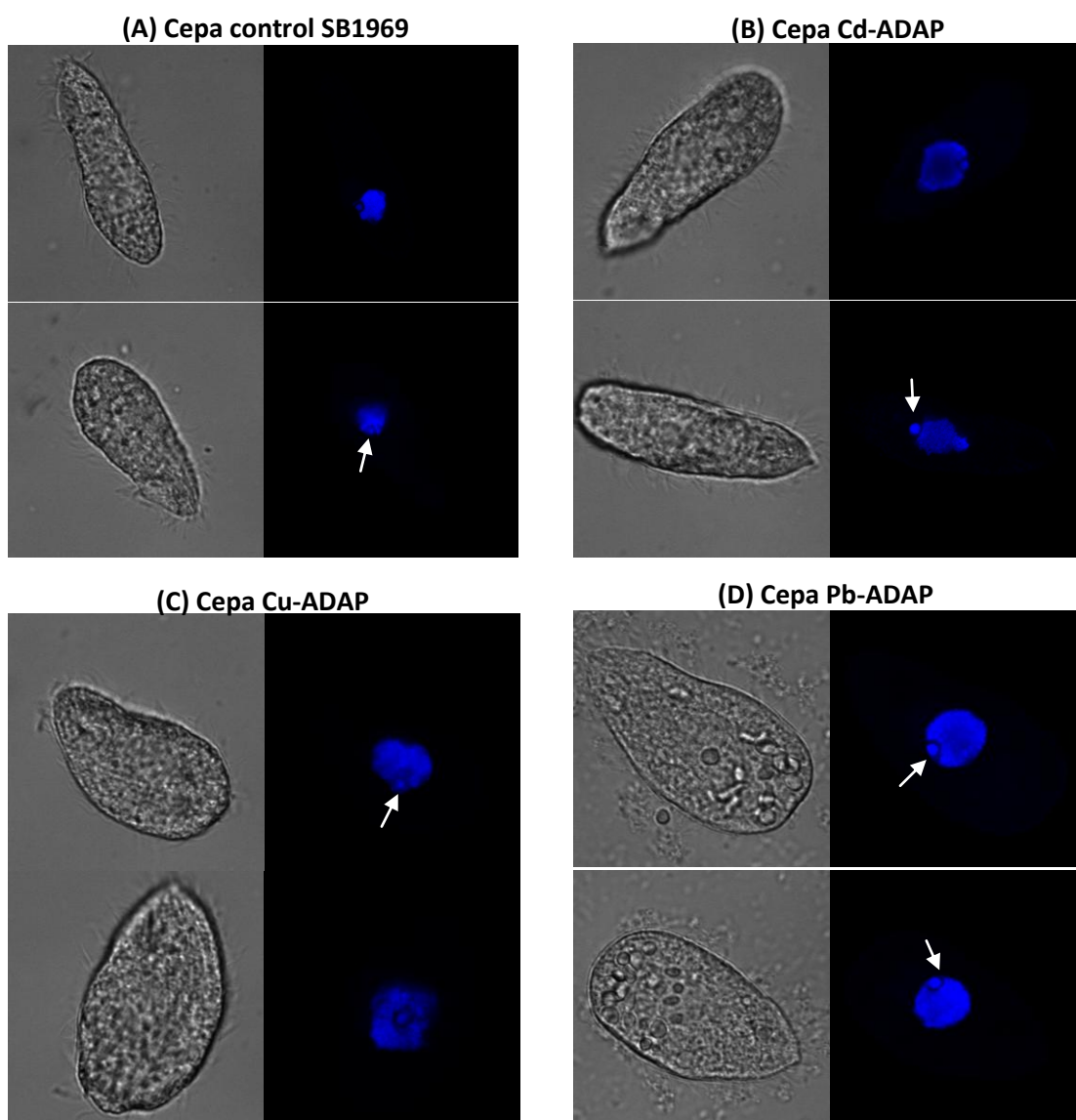


Fig. 39. Micrografías obtenidas mediante microscopía confocal de fluorescencia tras la tinción con el fluorocromo DAPI en las distintas cepas de *T. thermophila*: **(A)**: cepa control SB1969, **(B)**: cepa Cd-ADAP, **(C)**: cepa Cu-ADAP y **(D)**: cepa Pb-ADAP. Para cada cepa se muestra la misma imagen en campo claro y fluorescencia. Todas las imágenes tienen un aumento de 600x. Las flechas blancas indican la posición del micronúcleo.

Los resultados obtenidos con el fluorocromo Leadmium Green, que pone de manifiesto los depósitos de Pb^{2+} o Cd^{2+} , se muestran en las Figs. 40 y 41, respectivamente. En la cepa Pb-ADAP, tanto en campo claro (Figs. 40A y D) como por fluorescencia (Figs. 40B, C, E y F) se observan unos cuerpos ovoides refringentes (campo claro) o con fluorescencia verde muy definidos y localizados predominantemente en la región posterior celular, aunque también se detectan en otras regiones del citoplasma (Fig. 40). Igualmente, en la cepa Cd-ADAP (Fig. 41) también se observan unas inclusiones con fluorescencia verde (Figs. 41B y E) mucho más difusas e irregulares (algunas esféricas), localizadas principalmente en la región posterior celular. A diferencia de la cepa Pb-ADAP, en la cepa Cd-ADAP también se detecta cierta fluorescencia verde en la periferia de la célula (película del ciliado) (Fig. 41C).

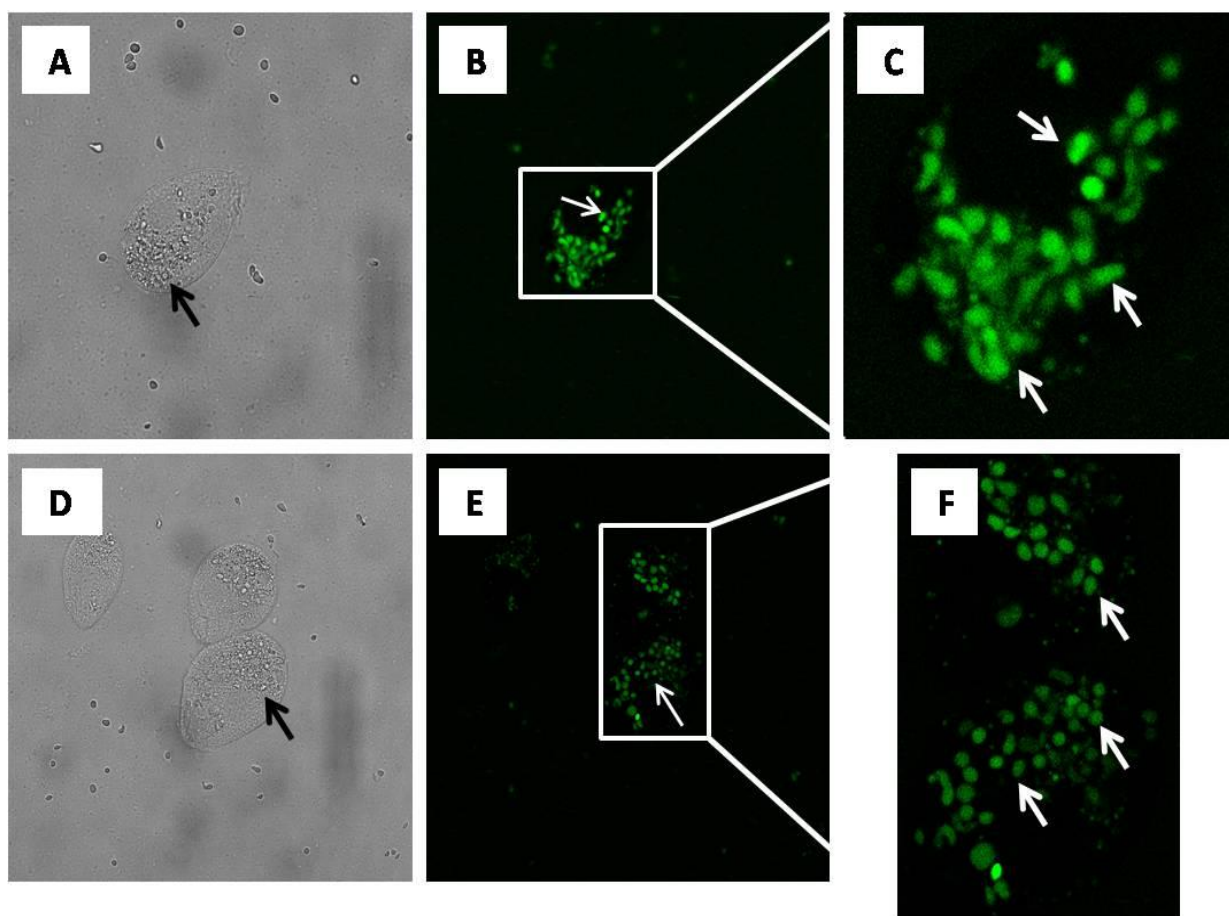


Fig. 40. Micrografías obtenidas mediante microscopía confocal de fluorescencia de células Pb-ADAP tras la tinción con el fluorocromo Leadmium Green. Las flechas indican los depósitos de plomo marcados con el fluorocromo y por tanto con fluorescencia verde. (A y D): Imágenes en campo claro (600x). (B y E): Imágenes con fluorescencia (600x). (C y F): Regiones ampliadas de las imágenes B y E, respectivamente.

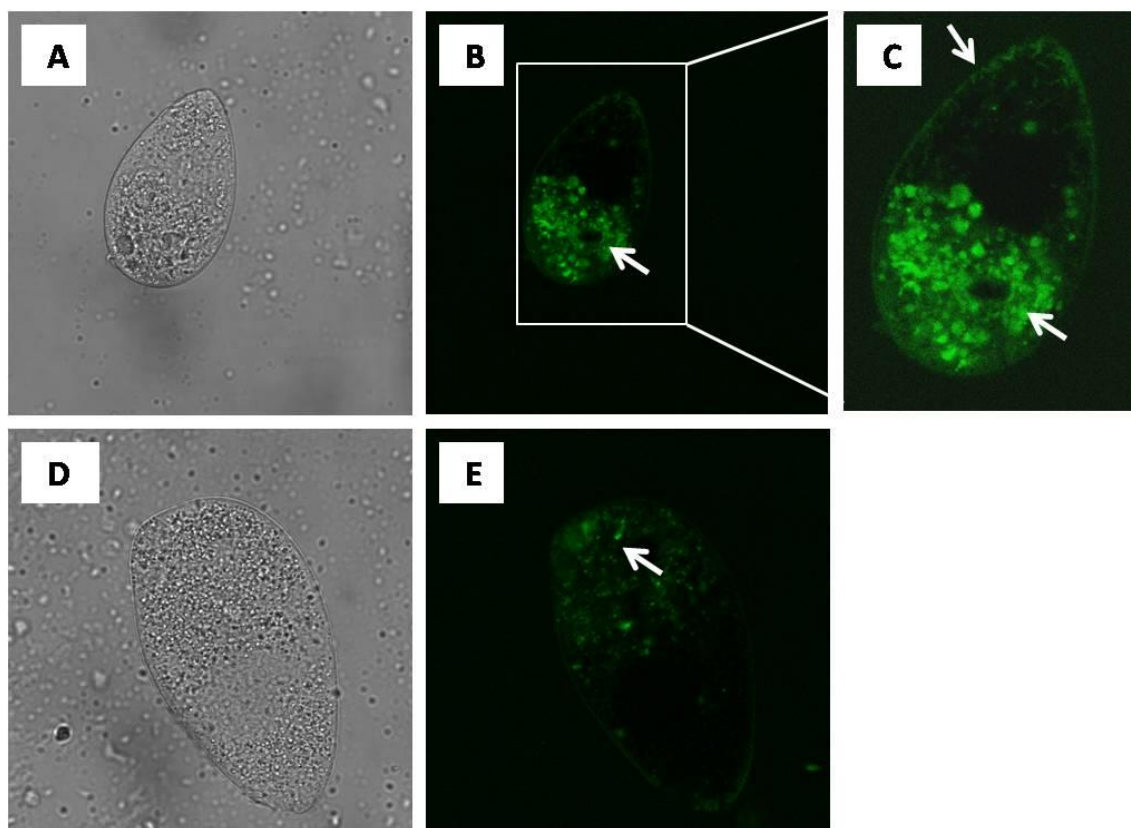


Fig. 41. Micrografías obtenidas mediante microscopía confocal de fluorescencia de células Cd-ADAP tras la tinción con el fluorocromo Leadmium Green. (A y D): Imágenes en campo claro (1.000x). (B y E): Potenciales depósitos de cadmio (señalados con flechas) con fluorescencia verde (1.000x). (C): Ampliación de la imagen B; la flecha superior indica cierto nivel de fluorescencia en la periferia celular (1.000x).

B.2. Parámetros ecotoxicológicos y cinéticas de crecimiento de las cepas *knockout* (KO) y/o *knockdown* (KD) para los genes *MTT1* y/o *MTT5*

Mediante citometría de flujo se calcularon los valores de CL_{50} de las cepas KO y/o KD para los metales Cd^{2+} , Cu^{2+} o Pb^{2+} en el tampón TrisHCl 0,01M pH 6,8 (Tabla 24). La Fig. 42 muestra las cinéticas de mortalidad bajo concentraciones crecientes del correspondiente metal para las diferentes cepas analizadas. En el tratamiento con Cd^{2+} (Fig. 42A), las tres cepas KO y/o KD muestran unos valores de CL_{50} muy inferiores a los obtenidos para la cepa control (Tabla 24), mostrando así una mayor sensibilidad a la presencia de este metal. Principalmente, destaca la cepa MTT1KO con un valor de CL_{50} igual a la mitad que el obtenido en la cepa control (Tabla 24). Tras el tratamiento con Cu^{2+} , las cepas MTT5KD y MTT1KO+MTT5KD muestran valores de CL_{50} semejantes a los calculados en la cepa control (Tabla 24), mientras que la cepa MTT1KO tiene un valor de CL_{50} igual a la mitad del valor calculado en la cepa control, como también ocurría para el Cd^{2+} . La cepa Cu-ADAP, a pesar de su aparente adaptación a este metal, presenta una CL_{50} muy inferior a los valores obtenidos en las cepas control, MTT1KO, MTT5KD y MTT1KO+MTT5KD (Tabla 24). Finalmente, en el caso del plomo, las cepas KO y/o KD muestran valores de CL_{50} muy similares a los calculados para la cepa control, a excepción de la cepa MTT1KO+MTT5KD que tiene un valor CL_{50} ligeramente inferior (Tabla 24).

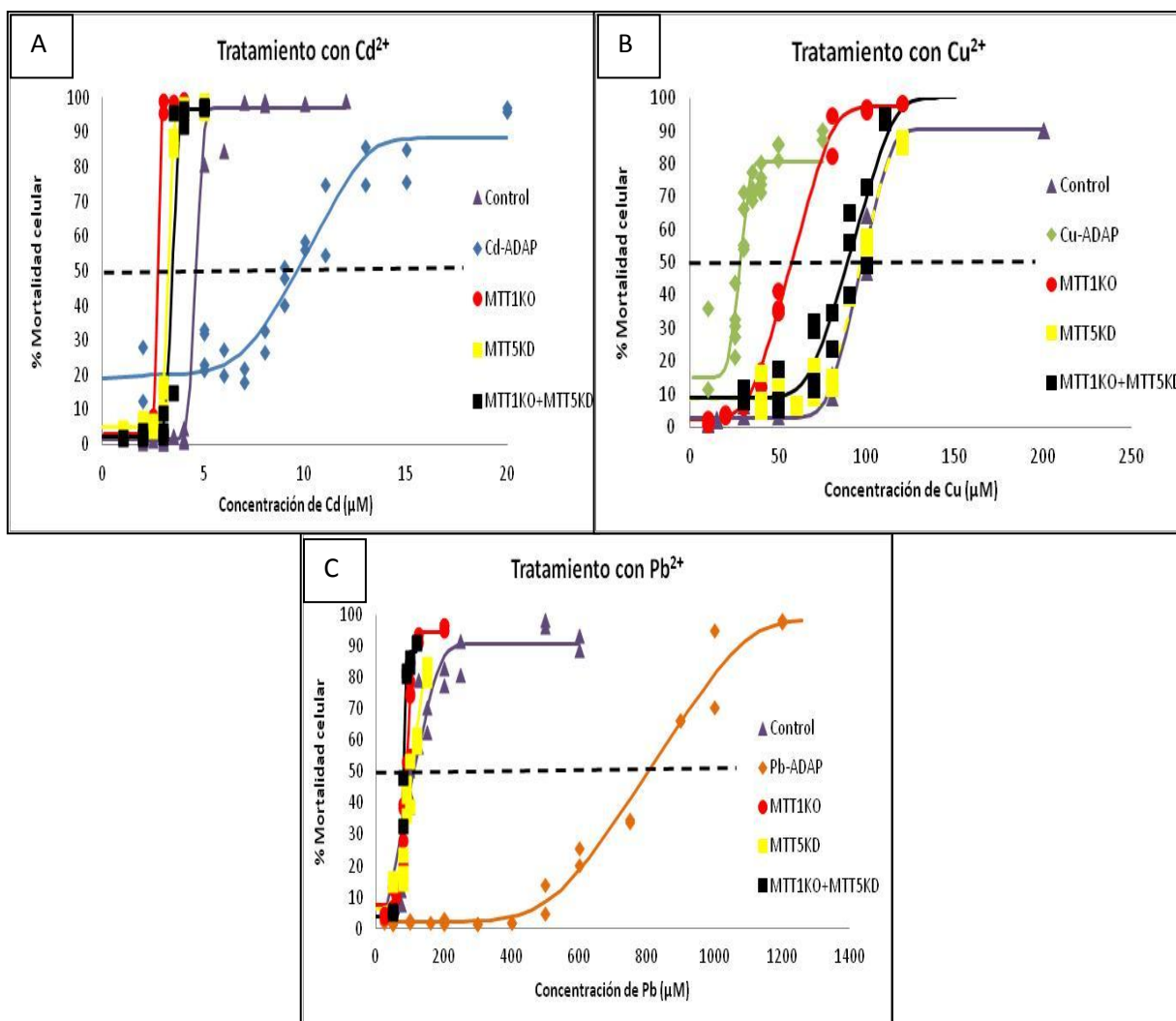


Fig. 42. Cinéticas de mortalidad celular obtenidas en diferentes cepas de *T. thermophila* tras el tratamiento de 24h con concentraciones crecientes de (A): Cd²⁺, (B): Cu²⁺ o (C): Pb²⁺.

Tabla 24. Comparación de los valores de CL₅₀ para Cd²⁺, Cu²⁺ o Pb²⁺ entre la cepa control CU428, las cepas adaptadas y las cepas *knockout* y/o *knockdown*.

Cepa	CL ₅₀ (Cd ²⁺)	CL ₅₀ (Cu ²⁺)	CL ₅₀ (Pb ²⁺)
CU428	≈ 4,6 µM	≈ 100 µM	≈ 110 µM
MTT1KO	≈ 2,7 µM	≈ 57 µM	≈ 90 µM
MTT5KD	≈ 3,25 µM	≈ 100 µM	≈ 110 µM
MTT1KO+MTT5KD	≈ 3,5 µM	≈ 90 µM	≈ 85 µM
Cd-ADAP	≈ 9,7 µM	-	-
Cu-ADAP	-	≈ 28,5 µM	-
Pb-ADAP	-	-	≈ 800 µM

Todos los tratamientos se realizaron en el medio TrisHCl 0,01M pH 6,8. (-): valores no calculados.

B.2.1. Análisis de las cinéticas de crecimiento de las cepas *knockout* y/o *knockdown*

Las cinéticas de crecimiento de las cepas control CU428, MTT1KO, MTT5KD y MTT1KO+MTT5KD, tanto en ausencia como en presencia de cada uno de los tres metales, se muestran en la Fig. 43. Los parámetros de crecimiento inferidos de ellas se recogen en la Tabla 25.

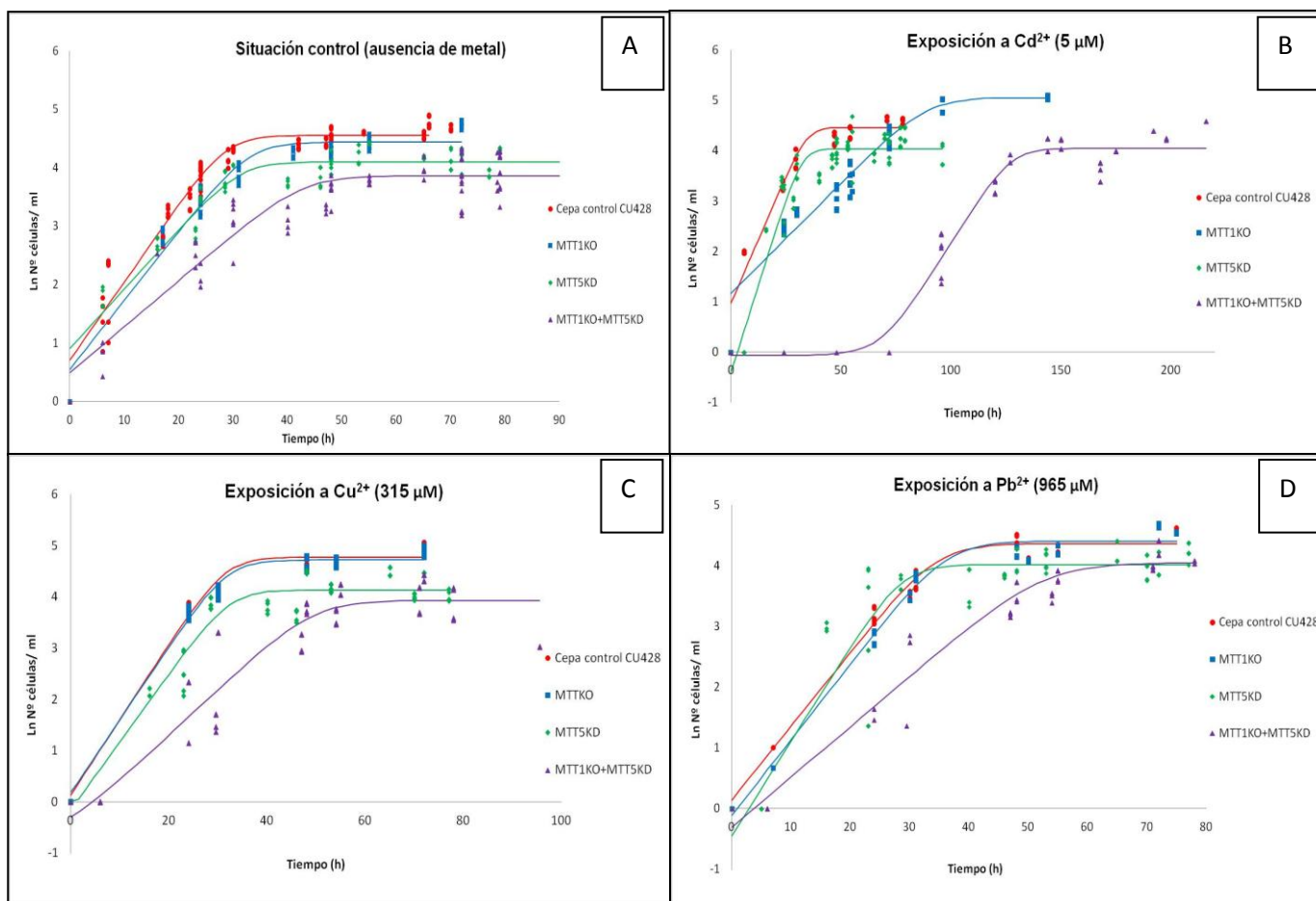


Fig. 43. Curvas de crecimiento de la cepa control CU428 y de las cepas *knockout* y/o *knockdown*. (A): en ausencia de metal (situación control), (B): en presencia de Cd^{2+} ($5 \mu\text{M}$), (C): en presencia de Cu^{2+} ($315 \mu\text{M}$) y (D): en presencia de Pb^{2+} ($965 \mu\text{M}$).

En general, las cepas KO, KD y KO+KD crecen a una velocidad menor que la cepa control CU428, incluso en ausencia de metal (Fig. 43A). En esta situación control se observa que las cepas MTT1KO y MTT5KD presentan tasas específicas de crecimiento (μ) bastante similares entre sí, aunque el rendimiento celular (una vez alcanzada la fase estacionaria) de la cepa MTT5KD es menor que el de las cepas control o MTT1KO (Fig. 43A). El doble mutante MTT1KO+MTT5KD es el que crece más lentamente de todas las cepas analizadas y el rendimiento del cultivo (más allá de las 60h) es bastante inferior al conseguido por el resto de las cepas (Fig. 43A).

El tratamiento con Cd^{2+} ($5 \mu\text{M}$) supone un retraso de la velocidad de crecimiento en las cuatro cepas, destacándose considerablemente el caso de la cepa MTT1KO, cuyo tiempo de generación se multiplica por $\approx 2,7\text{h}$ con respecto al calculado en su situación del control (Tabla 25). La cepa MTT5KD parece tener, en presencia de este metal, una tasa de crecimiento mayor pero requiere de un período de latencia para que las células se adapten a la situación de estrés y empiecen a crecer. Este período de latencia es muy prolongado en el caso del doble mutante (unas 50h) y, tras él, las células crecen a una velocidad inferior a la calculada para esta misma cepa en ausencia de metal (Fig. 43B, Tabla 25). El rendimiento final obtenido (determinado en la fase estacionaria) en las cepas MTT5KD y MTT1KO+MTT5KD es similar entre ellas e inferior al conseguido por la cepa control o la cepa MTT1KO (Fig. 43B).

Tanto el tratamiento con cobre ($315 \mu\text{M}$) como la exposición a plomo ($965 \mu\text{M}$) parecen no afectar a las cinéticas de crecimiento de ninguna de las cuatro cepas, manteniendo todas ellas unas tasas específicas de crecimiento similares a las calculadas en la situación control (Tabla 25). Las curvas de crecimiento de las cepas MTT5KD y MTT1KO+MTT5KD en presencia de cualquiera de estos dos metales muestran una pequeña fase de latencia, probablemente necesaria para que las células se adapten a la presencia del metal y comiencen a crecer. Los rendimientos celulares de las cepas control y MTT1KO son similares y superiores a los obtenidos por las cepas MTT5KD y MTT1KO+MTT5KD (Figs. 43C y D).

Tabla 25. Parámetros obtenidos de las cinéticas de crecimiento de la cepa control CU428 y las tres cepas *knockout* y/o *knockdown*

Cepa	Tratamiento	μ (h^{-1})	Tg (h)	R^2
CU428	Control	0,1291	5,37	0,940
	Cd^{2+}	0,0981	7,07	0,933
	Cu^{2+}	0,1438	4,82	0,959
	Pb^{2+}	0,1203	5,76	0,973
MTT1KO	Control	0,1152	6,02	0,917
	Cd^{2+}	0,0426	16,27	0,919
	Cu^{2+}	0,1381	5,02	0,956
	Pb^{2+}	0,1228	5,64	0,971
MTT5KD	Control	0,100	6,93	0,884
	Cd^{2+}	0,1372	5,05 (LAT)	0,880
	Cu^{2+}	0,1295	5,35 (LAT)	0,845
	Pb^{2+}	0,1533	4,52 (LAT)	0,852
MTT1KO+MTT5KD	Control	0,079	8,77	0,822
	Cd^{2+}	0,0631	10,98 (LAT)	0,94
	Cu^{2+}	0,0848	8,17 (LAT)	0,892
	Pb^{2+}	0,0828	8,37 (LAT)	0,964

Parámetros de crecimiento definidos para las cuatro cepas tanto en ausencia de metal (situación control) como en presencia de Cd^{2+} ($5 \mu\text{M}$), Cu^{2+} ($315 \mu\text{M}$) o Pb^{2+} ($965 \mu\text{M}$). μ : tasa específica de crecimiento. Tg: tiempo de generación. R^2 : coeficiente de correlación. LAT: detección de una fase de latencia.

B.3. Análisis comparativo de los perfiles proteicos entre diferentes cepas de *T. thermophila*

Con la finalidad de encontrar más diferencias entre las cepas adaptadas a metales y las cepas KO y/o KD en genes MT, se llevó a cabo un análisis comparativo de los perfiles de proteínas citosólicas totales (Fig. 44A) y de proteínas ricas en residuos tiol [(marcadas específicamente con el compuesto fluorogénico monobromobimano (mBrB)) (Fig. 45) entre las diferentes cepas de *T. thermophila* usadas en este estudio. Concretamente, en este estudio se analizaron las siguientes cepas: la cepa control SB1969, las cepas GFPMTT1 y GFPMTT5 tanto en ausencia de metal como tras exponerlas a Cd^{2+} (44,5 μM) durante 24h, las tres cepas adaptadas a elevadas concentraciones de metal (Cd-ADAP, Cu-ADAP y Pb-ADAP) y las cepas *knockout* y/o *knockdown* (MTT1KO, MTT5KD y MTT1KO+MTT5KD). Además se observó que, tras mantener las células Pb-ADAP una semana en presencia de la MCT de plomo (5,5 mM), se formaba un precipitado denso en el fondo del tubo como consecuencia de la excreción de un material electro-denso (Figs. 30bH y 36C). Por esta razón, a partir de siete tubos de estos cultivos, se extrajeron los precipitados usando una micropipeta estéril y la suma de ellos se lavó varias veces con el tampón TrisHCl 0,01M (pH 6,8) con el fin de retirar el exceso de metal. A partir de esta suma de precipitados se extrajeron las posibles proteínas presentes en el mismo, aplicando el protocolo de extracción de proteínas descrito en el apartado 6 de Material y métodos. De la extracción de proteínas (tras centrifugar la muestra) se obtuvieron dos fracciones: una soluble (sobrenadante) y otra insoluble (pellet) y ambas se analizaron electroforéticamente (Fig. 44B).

En general, los perfiles analizados de proteínas citosólicas totales de las diferentes cepas de *T. thermophila* son muy similares entre sí. Sin embargo, podemos apreciar algunas pequeñas diferencias entre los diferentes patrones de bandas (Fig. 44A). Por ejemplo, en el caso de las cepas Pb-ADAP, MTT5KD y MTT1KO+MTT5KD no se detecta una banda de ≈ 29 kDa que sí se aprecia perfectamente en las demás cepas. Algo similar ocurre en el caso de la cepa Pb-ADAP (carril 8 de la Fig. 44A), en la que no se detecta una banda de ≈ 33 kDa que sí existe en las demás cepas. Finalmente, en el caso de la cepa GFPMTT5 expuesta a cadmio durante 24h (carril 5 de la Fig. 44A), se identifica una banda de ≈ 36 kDa que no se detecta en las demás cepas.

El análisis electroforético de las muestras de proteínas de las fracciones soluble e insoluble derivadas de los precipitados formados por la cepa Pb-ADAP se muestra en la Fig. 44B, carriles 3 y 4, respectivamente. Se observa que la fracción soluble apenas contiene proteínas o éstas se encuentran en muy baja concentración para ser detectadas mediante la tinción con azul de Coomassie. Sin embargo, en la fracción insoluble (carril 4, Fig. 44B) se distinguen más de 20 bandas entre las que predominan cuatro con masas moleculares aproximadas de 34, 40, 50 y 60 kDa (señaladas con flechas rojas en la Fig. 44B). Las dos bandas de mayor masa molecular se corresponden con algunas de las bandas mayoritarias de las dos cepas utilizadas como control (SB1969 y Pb-ADAP) en este ensayo (carriles 1 y 2, Fig. 44B). Con respecto a las otras dos bandas de menor tamaño (≈ 34 y 40 kDa), es difícil hacerlas corresponder con otras bandas existentes en las muestras de proteínas citosólicas de las cepas SB1969 y Pb-ADAP. No obstante, la banda de ≈ 40 kDa podría corresponder con una banda del mismo tamaño presente en ambas cepas pero en menor cantidad (Fig. 44B). La banda proteica más abundante

en la muestra de la fracción insoluble tiene un tamaño estimado de 34 KDa y podría corresponder con aquella de ≈ 33 KDa que desaparece o aparece en menor cantidad en la cepa Pb-ADAP (Fig. 44B).

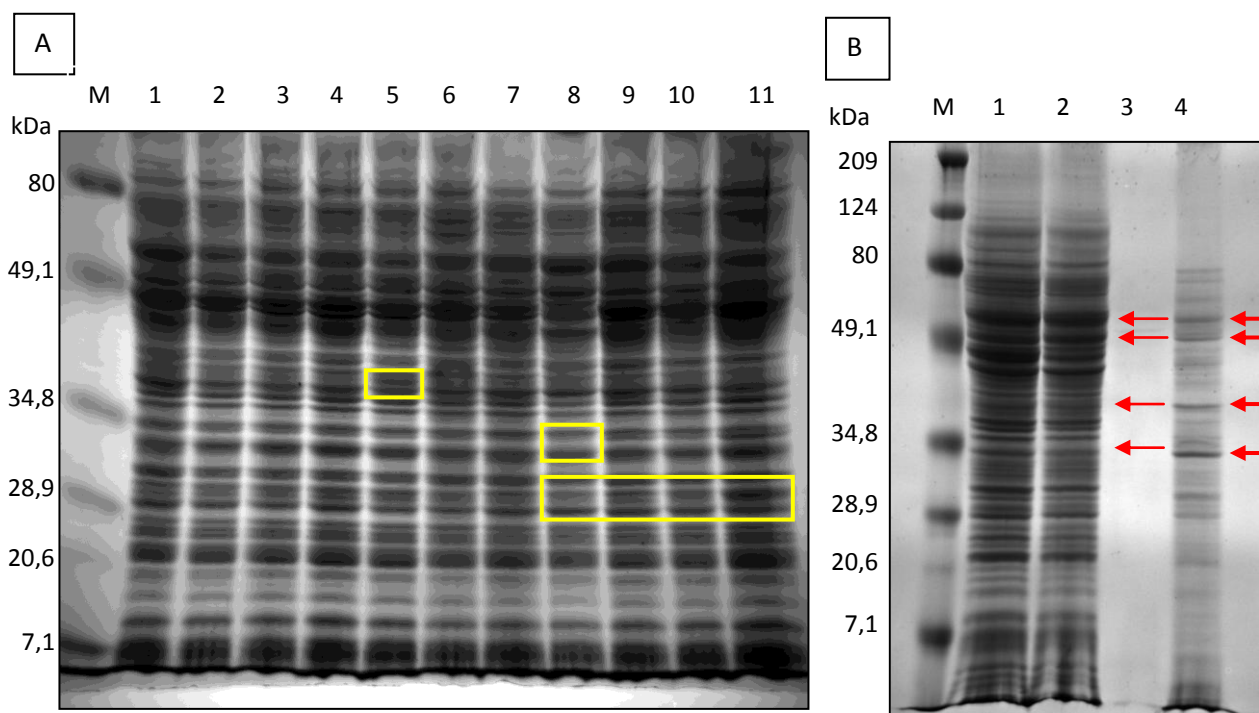


Fig. 44. Perfiles de proteínas citosólicas totales obtenidas de diferentes cepas de *T. thermophila* y visualizadas mediante una electroforesis estándar de proteínas en geles de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE). **Panel A:** (M): Marcador de masa molecular (Bio-Rad). Carriles 1-11: muestras de proteínas totales de diferentes cepas de *T. thermophila*. (1): cepa control SB1969, (2): GFPMTT1, (3): GFPMTT1 tras exponerla a Cd^{2+} durante 24h, (4): GFPMTT5, (5): GFPMTT5 tras exponerla a Cd^{2+} durante 24h, (6): Cd-ADAP, (7): Cu-ADAP, (8): Pb-ADAP, (9): MTT1KO, (10): MTT5KD y (11): MTT1KO+MTT5KD. Los recuadros amarillos contienen las diferencias más notables observadas entre los diferentes perfiles proteicos. **Panel B:** (M): Marcador de masa molecular (Bio-Rad). Carriles 1-4: perfiles de proteínas citosólicas totales de las cepas (1): SB1969 y (2): Pb-ADAP, junto con las muestras (3): la fracción soluble y (4): la fracción insoluble de los precipitados obtenidos de la cepa Pb-ADAP tras mantener los cultivos durante 1 semana en presencia de la MCT de plomo. Las flechas rojas indican las bandas correspondientes a las proteínas más abundantes.

Además de los perfiles de proteínas totales, también se compararon los perfiles de proteínas ricas en residuos tiol (-SH), previamente marcados de manera específica con el fluorógeno mBrB (Fig. 45). La mayoría de las cepas estudiadas presentan perfiles bastantes similares entre sí, aunque con diferentes intensidades fluorogénicas según la cantidad de mBrB unida a ellas. Las principales diferencias que podemos detectar son las siguientes: a)- Desde el carril 1 al 7 se aprecia una banda fluorogénica muy pequeña (≈ 7 KDa en recuadro) común a todas las muestras pero que desaparece en los carriles 8, 9, 11 y 12 (Fig. 45); b)- Algo similar ocurre con una banda de unos 20,6 KDa que desaparece o se minimiza en las muestras de los

Resultados

carriles 8, 9, 11 y 12 (recuadro en Fig. 45); c)- También ocurre lo mismo con bandas de ≈ 35 y 49 KDa, que están ausentes o son menos abundantes en estos mismos 4 carriles (recuadros en Fig. 45); d)- El carril 9, correspondiente a la muestra de la fracción insoluble del precipitado excretado por la cepa Pb-ADAP, no muestra ninguna banda fluorogénica, al igual que la muestra citosólica de la cepa Pb-ADAP que tiene muy pocas bandas fluorogénicas (carril 8, Fig. 45); e)- El carril 6 (muestra Cd-ADAP) es el que presenta bandas con un mayor marcaje fluorogénico, sobre todo la correspondiente a 20,6 KDa (Fig. 45).

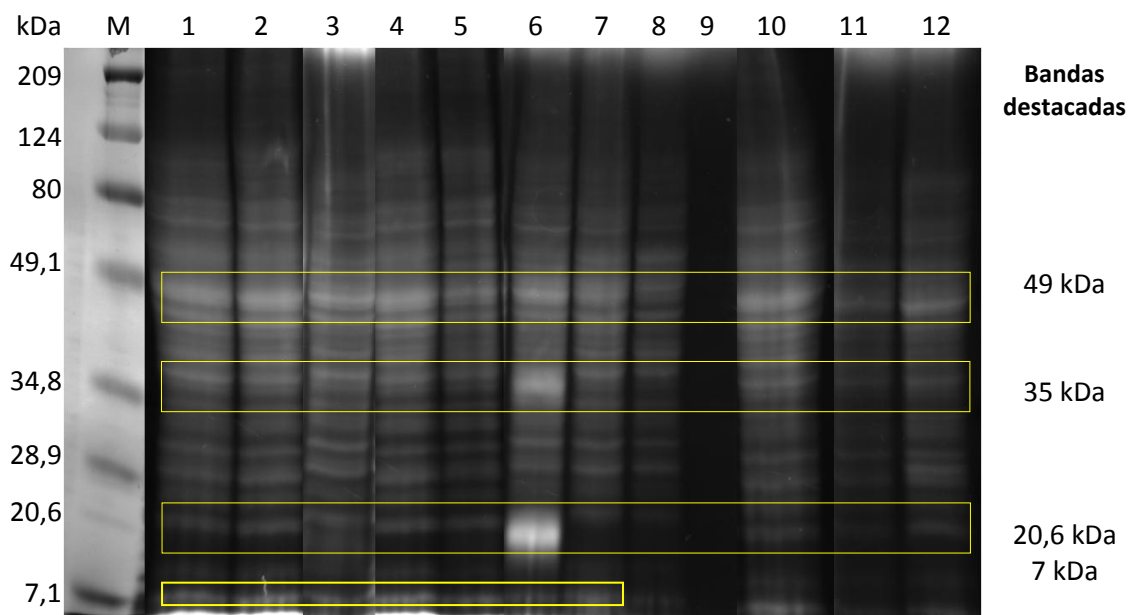


Fig. 45. Perfiles de proteínas ricas en residuos tiol obtenidos de diferentes cepas de *T. thermophila* mediante el marcaje con un compuesto fluorogénico y visualizados por electroforesis estándar de proteínas en geles de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE). (M): Marcador de masa molecular (Bio-Rad). Carriles 1-12: perfiles de diferentes cepas de *T. thermophila*. (1): control SB1969, (2): GFPMTT1, (3): GFPMTT1 tras exponerla a Cd^{2+} durante 24h, (4): GFPMTT5, (5): GFPMTT5 tras exponerla a Cd^{2+} durante 24h, (6): Cd-ADAP, (7): Cu-ADAP, (8): Pb-ADAP, (9): precipitado obtenido de la cepa Pb-ADAP, (10): MTT1KO, (11): MTT5KD y (12): MTT1KO+MTT5KD. Los recuadros amarillos contienen las diferencias más notables observadas entre las diferentes cepas. Los valores de estas bandas se indican a la derecha de la figura.

C.- ANALISIS COMPARATIVO DE LA EXPRESIÓN DE LOS GENES CODIFICANTES DE METALOTIONEÍNAS (MTs) EN SITUACIONES DE ESTRÉS EXTREMO POR METALES PESADOS (Cd²⁺, Cu²⁺ o Pb²⁺)

C.1. Análisis comparativo de la expresión de los genes MTs en diferentes cepas de *T. thermophila*

Se ha llevado a cabo un análisis comparativo de los niveles de inducción relativa (calculados mediante RT-PCR cuantitativa) en los genes MTs (*MTT1*, el par *MTT2/4*, *MTT3* y *MTT5*) tras la exposición a tres metales pesados (Cd²⁺, Cu²⁺ o Pb²⁺). Para este estudio se han utilizado diferentes cepas de *T. thermophila*: la cepa control SB1969, las tres cepas adaptadas a elevadas concentraciones de metal (Cd-ADAP, Cu-ADAP y Pb-ADAP), las tres cepas *knockout* y/o *knockdown* para los genes *MTT1* y/o *MTT5* (*MTT1KO*, *MTT5KD*, *MTT1KO+MTT5KD*) y las dos cepas GFPMTT1 y GFPMTT5, que contienen múltiples copias de los plásmidos recombinantes pVGF::GFP::MTT1 y pVGF::GFP::MTT5 y que, por tanto, sobre-expresan las proteínas MTT1 y MTT5, respectivamente (Amaro *et al.*, 2014).

En las Figs. 46-49 y en la Tabla A8 del Anexo I se comparan los niveles de inducción relativa de los cinco genes codificantes de MTs en las diferentes cepas de *T. thermophila* previamente mencionadas. En el caso de los genes codificantes de las CuMTs MTT2 y MTT4, cuyas secuencias nucleotídicas presentan un porcentaje de identidad del $\approx 98\%$, no se pudieron diseñar cebadores específicos que distinguiesen cada uno de ellos. Por lo tanto, y al ser indistinguibles estos dos genes por qRT-PCR o qPCR, suponemos que en todo el análisis estamos valorando valorando la suma de la expresión de ambos, refiriéndonos a ella como el par *MTT2/4*.

El gen *MTT1* alcanza sus mayores niveles de inducción en presencia de Cd²⁺ y, en general, tras los tratamientos de 24h (Fig. 46). Igualmente, en presencia de Pb²⁺, también observamos elevados niveles de inducción para este gen (principalmente en el caso de las cepas SB1969 (control), Cu-ADAP, Pb-ADAP y MTT5KD), destacándose valores ligeramente mayores tras los tratamientos de 24h frente a los obtenidos tras exposiciones de 1h (Fig. 46). Este gen también se induce tras la exposición a Cu²⁺ (sobre todo en las cepas Cu-ADAP y Pb-ADAP); sin embargo, tras los tratamientos con Cu²⁺ observamos el efecto contrario al detectado con los otros dos metales, es decir, los mayores niveles de inducción se alcanzan tras los tratamientos de 1h (Fig. 46). De esta forma, el ranking de inducción para el gen *MTT1* es: Cd > Pb > Cu en las cepas control, GFPMTT1 y MTT5KD y Cd > Cu > Pb en las cepas Cd-ADAP, Cu-ADAP, Pb-ADAP y GFPMTT5 (Fig. 46). En las cepas Cd-ADAP y Pb-ADAP, los niveles de inducción para el gen *MTT1* observados en los cultivos expuestos constantemente a los valores de MCT son superiores a los obtenidos tras los tratamientos de 1 ó 24h. Por el contrario, en la cepa Cu-ADAP se detectan mayores niveles de inducción tras los tratamientos de 1 ó 24h frente a los observados en los cultivos expuestos constantemente a los valores de MCT (Fig. 46). Finalmente, el gen *MTT1* no es inducido (valores < 2) en las cepas control y Cd-ADAP tras los tratamientos de 24h con Cu²⁺ y Pb²⁺ respectivamente, ni en la cepa GFPMTT1 tras el tratamiento con Pb²⁺ (1h), a pesar de que tras tratamientos de 24h con este mismo metal sí que aparecen valores significativos de inducción ($\approx 11x$) (Fig. 46, Tabla A8).

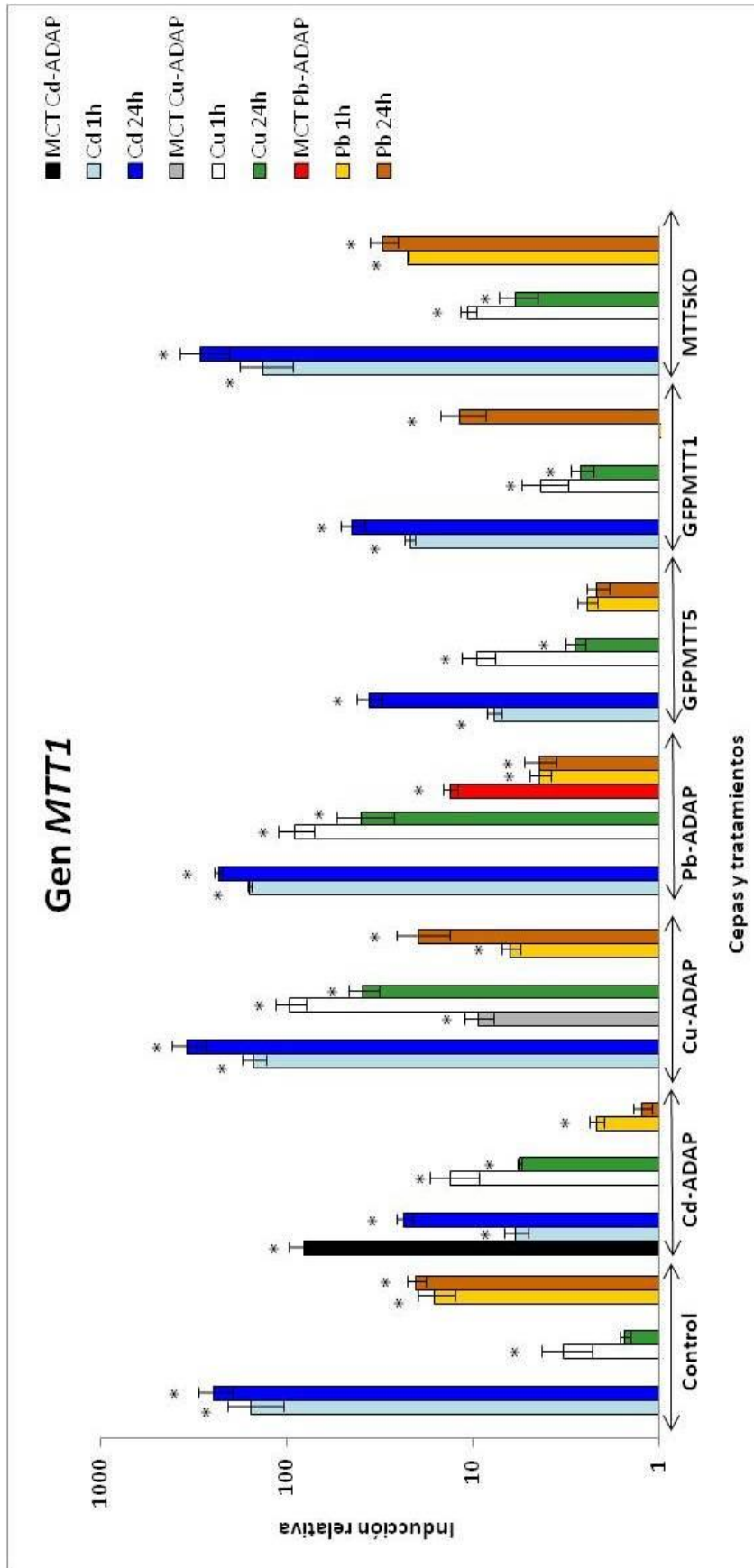


Fig. 46. Comparación de los niveles de inducción del gen *MTT1* tras el tratamiento con Cd^{2+} , Cu^{2+} o Pb^{2+} en diferentes cepas de *T. thermophila*. En el caso de las cepas adaptadas, los tratamientos de 1 y 24h se hicieron tras mantener las células 24h en ausencia de metal. MCT: máxima concentración tolerada por las cepas adaptadas (Cd^{2+} 115 μM , Cu^{2+} 4 mM o Pb^{2+} 5,5 mM), que se mantuvieron en constante exposición al metal. Las concentraciones de metales así como las condiciones de cada tratamiento se indican en la Tabla 9. Los valores de inducción relativa, calculados mediante RT-PCR cuantitativa, se expresan en escala logarítmica. Las barras representan los niveles de inducción relativa del gen *MTT1* en cada una de las condiciones ensayadas y para cada cepa respecto al cultivo no tratado (valor 1) y normalizados respecto a la expresión del gen β -actina, utilizado como control endógeno. Cada barra se corresponde con el valor medio de inducción relativa para cada tratamiento \pm la desviación estándar calculada a partir de dos o tres experimentos independientes (valores recogidos en la Tabla A8 del anexo I). Los asteriscos (*) indican la existencia de diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) respecto a la muestra control

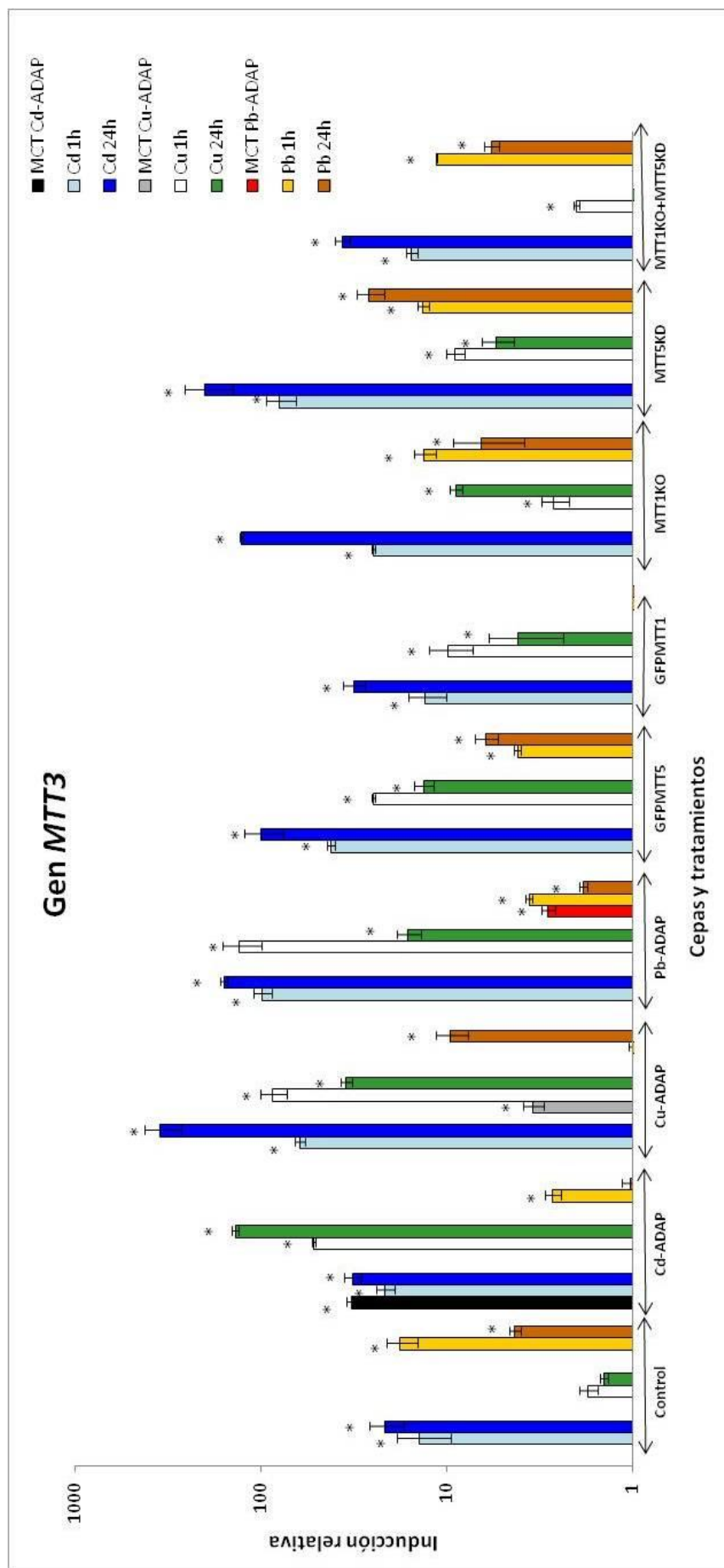


Fig. 47. Comparación de los niveles de inducción del gen *MTT3* tras el tratamiento con Cd^{2+} , Cu^{2+} o Pb^{2+} en diferentes cepas de *T. thermophila*. En el caso de las cepas adaptadas, los tratamientos de 1 y 24h se hicieron tras mantener las células 24h en ausencia de metal. MCT: máxima concentración tolerada por las cepas adaptadas (Cd^{2+} 115 μM , Cu^{2+} 4 mM y Pb^{2+} 5,5 mM), que se mantuvieron en constante exposición al metal. Las concentraciones de metales así como las condiciones de cada tratamiento se indican en la Tabla 9. Los valores de inducción relativa, calculados mediante RT-PCR cuantitativa, se expresan en escala logarítmica. Las barras representan los niveles de inducción relativa del gen *MTT3* en cada una de las condiciones ensayadas y para cada cepa respecto al cultivo no tratado (valor 1) y normalizados respecto a la expresión del gen β -actina, utilizado como control endógeno. Cada barra se corresponde con el valor medio de inducción relativa para cada tratamiento \pm la desviación estándar calculada a partir de dos o tres experimentos independientes (valores recogidos en la Tabla A8 del anexo I). Los asteriscos (*) indican la existencia de diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) respecto a la muestra control.

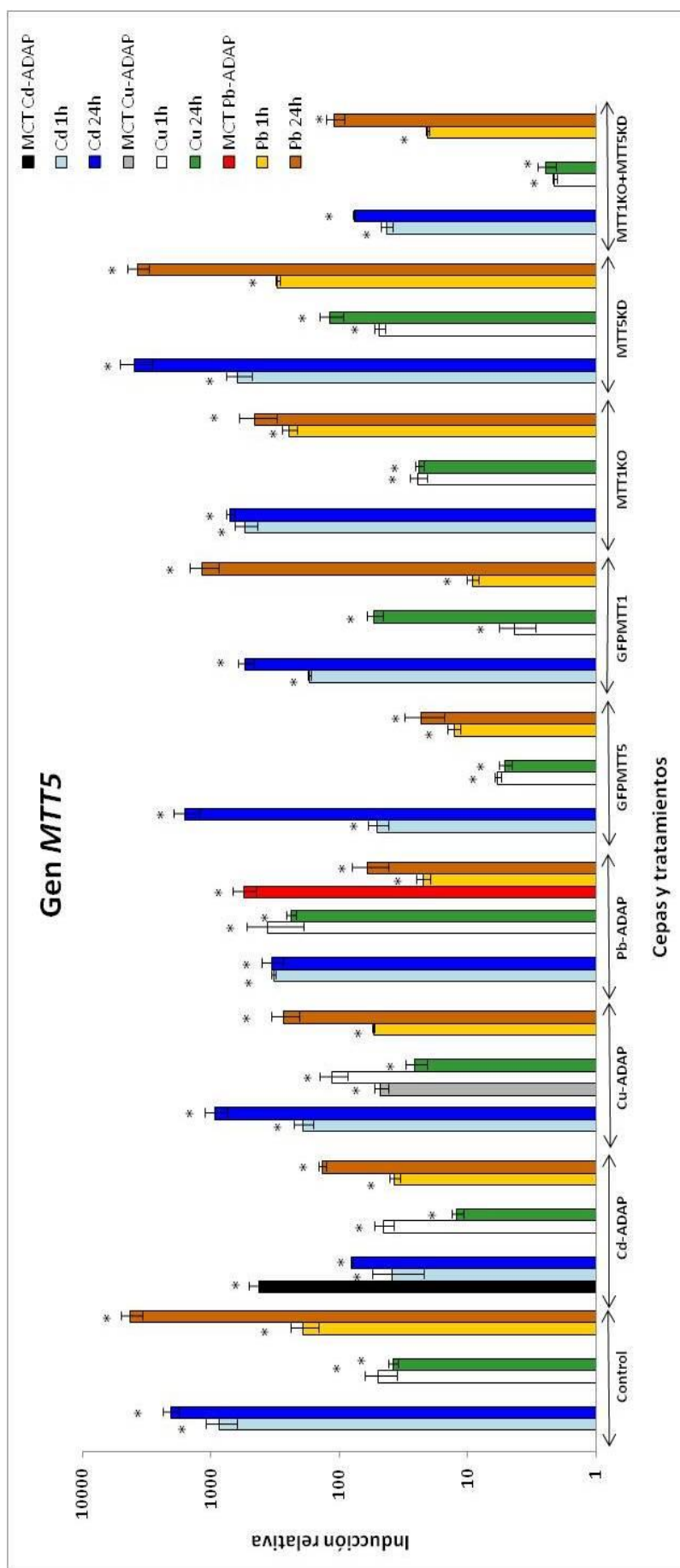


Fig. 48. Comparación de los niveles de inducción del gen *MTT5* tras el tratamiento con Cd^{2+} , Cu^{2+} o Pb^{2+} en diferentes cepas de *T. thermophila*. En el caso de las cepas adaptadas, los tratamientos de 1 y 24h se hicieron tras mantener las células 24h en ausencia de metal. MCT: máxima concentración tolerada por las cepas adaptadas (Cd^{2+} 115 μM , Cu^{2+} 4 mM o Pb^{2+} 5,5 mM), que se mantuvieron en constante exposición al metal. Las concentraciones de metales así como las condiciones de cada tratamiento se indican en la Tabla 9. Los valores de inducción relativa, calculados mediante RT-PCR cuantitativa, se expresan en escala logarítmica. Las barras representan los niveles de inducción relativa del gen *MTT5* en cada una de las condiciones ensayadas y para cada cepa respecto al cultivo no tratado (valor 1) y normalizados respecto a la expresión del gen β -actina, utilizado como control endógeno. Cada barra se corresponde con el valor medio de inducción relativa para cada tratamiento \pm la desviación estándar calculada a partir de dos o tres experimentos independientes (valores recogidos en la Tabla A8 del anexo I). Los asteriscos (*) indican la existencia de diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) respecto a la muestra control.

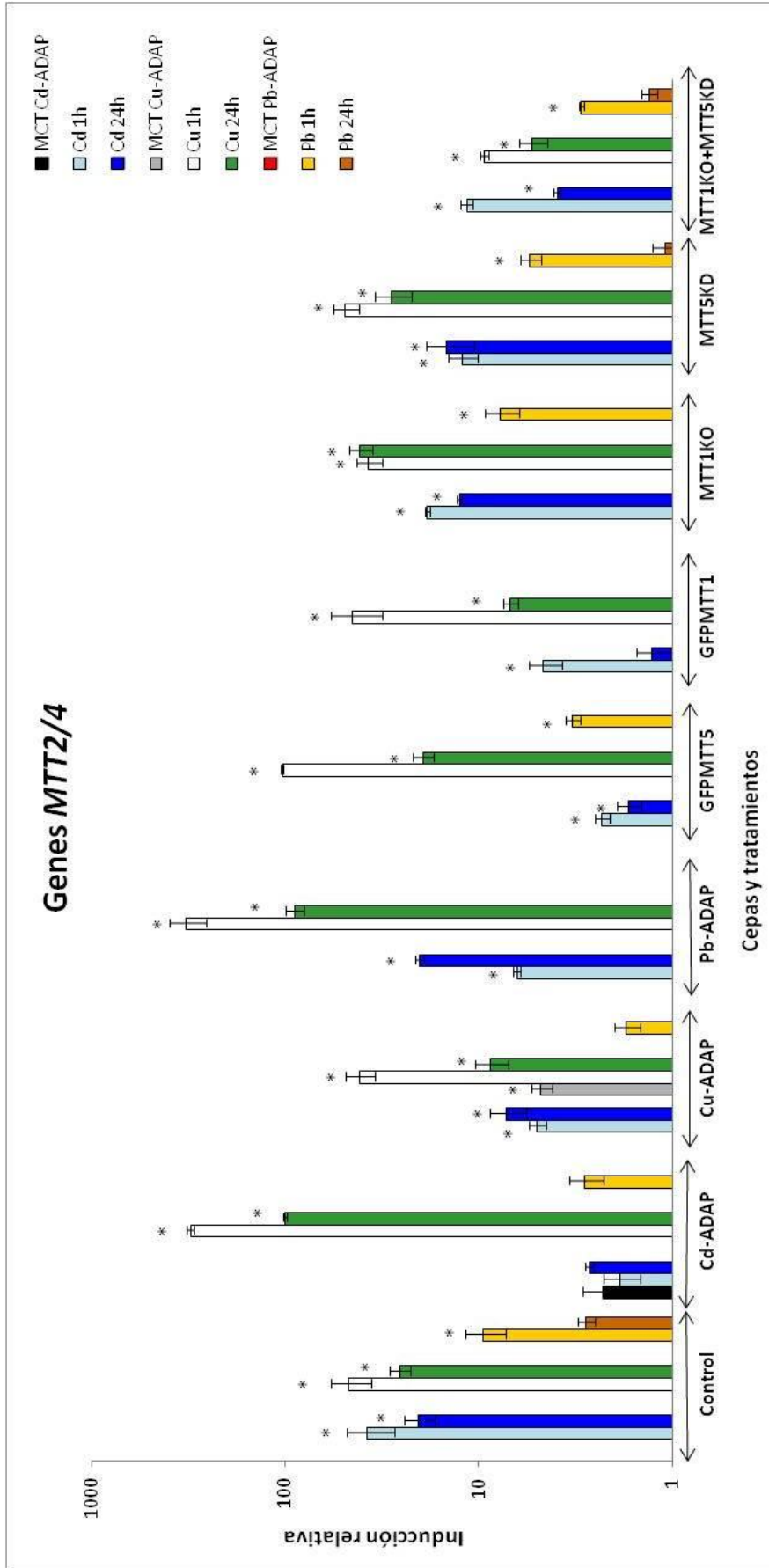


Fig. 49. Comparación de los niveles de inducción de los genes *MTT2/4* tras el tratamiento con Cd^{2+} , Cu^{2+} o Pb^{2+} en diferentes cepas de *T. thermophila*. En el caso de las cepas adaptadas, los tratamientos de 1 y 24h se hicieron tras mantener las células 24h en ausencia de metal. MCT: máxima concentración tolerada por las cepas adaptadas (Cd^{2+} 115 μ M, Cu^{2+} 4 mM o Pb^{2+} 5,5 mM), que se mantuvieron en constante exposición al metal. Las concentraciones de metales así como las condiciones de cada tratamiento se indican en la Tabla 9. Los valores de inducción relativa, calculados mediante RT-PCR cuantitativa, se expresan en escala logarítmica. Las barras representan los niveles de inducción relativa de los genes *MTT2/4* en cada una de las condiciones ensayadas y para cada cepa respecto al cultivo no tratado (valor 1) y normalizados respecto a la expresión del gen β -actina, utilizado como control endógeno. Cada barra se corresponde con el valor medio de inducción relativa para cada tratamiento \pm la desviación estándar calculada a partir de dos o tres experimentos independientes (valores recogidos en la Tabla A8 del anexo I). Los asteriscos (*) indican la existencia de diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) respecto a la muestra control.

Resultados

Los niveles de inducción relativos obtenidos para el gen *MTT3* se muestran en la Fig. 47 y en la Tabla A8 (Anexo I). Al igual que el gen *MTT1*, el gen *MTT3* responde principalmente a Cd^{2+} en la mayoría de las cepas analizadas, a excepción de la cepa Cd-ADAP, en la que los mayores niveles de inducción se detectan tras los tratamientos con Cu^{2+} (Fig. 47). En las cepas control, MTT1KO, MTT5KD y MTT1KO+MTT5KD el ranking de inducción para el gen *MTT3* es: $\text{Cd} > \text{Pb} > \text{Cu}$. El perfil de este ranking cambia en el caso de las cepas Cu-ADAP, Pb-ADAP, GFPMTT5 y GFPMTT1, siendo en estos casos: $\text{Cd} > \text{Cu} > \text{Pb}$ (Fig. 47). Finalmente, en la cepa Cd-ADAP el ranking es: $\text{Cu} > \text{Cd} > \text{Pb}$ (Fig. 47). En general, en los tratamientos con Cd^{2+} , los mayores niveles de inducción para esta isoforma génica se obtienen tras las exposiciones de 24h, mientras que en los tratamientos con Cu^{2+} o Pb^{2+} los mayores niveles de inducción se obtienen a 1 ó 24h según la cepa analizada (Fig. 47). En dos de las cepas adaptadas (Cd-ADAP y Pb-ADAP), los niveles de inducción obtenidos en cultivos constantemente expuestos a la MCT son muy similares a los detectados tras exposiciones de 1 y 24h, mientras que en la cepa Cu-ADAP, estos valores son muy inferiores a los obtenidos tras los tratamientos de 1 y 24h (Fig. 47). Los niveles de inducción del gen *MTT3* aumentan considerablemente en las cepas MTT1KO y MTT5KD con respecto a los registrados en la cepa control tras los tratamientos con Cd^{2+} 1h ($\approx 2x$ y $\approx 6x$) y 24h ($\approx 6x$ y $\approx 9x$, respectivamente). Sin embargo, en el caso de la cepa MTT1KO+MTT5KD, el gen *MTT3* presenta niveles de inducción similares a los obtenidos en la cepa control tras la exposición a cadmio. Finalmente, el gen *MTT3* no se induce en los siguientes casos: en la cepa GFPMTT1 tras los tratamientos con Pb^{2+} (1 ó 24h), en la cepa control tras los tratamientos con Cu^{2+} (1 y 24h), en la cepa Cd-ADAP (Pb^{2+} 24h), en la cepa Cu-ADAP (Pb^{2+} 1h) y en la cepa MTT1KO+MTT5KD (Cu^{2+} 24h) (Fig. 47, Tabla A8).

El gen *MTT5* (CdMT) es el que alcanza los mayores niveles de inducción de los cinco genes MTs, independientemente de la cepa analizada (Fig. 48). Esta isoforma génica alcanza los mayores niveles de inducción tanto en presencia de Pb^{2+} como de Cd^{2+} (Fig. 48, Tabla A8) y, aunque responde rápidamente a la presencia de metal en el medio, los mayores niveles de inducción los alcanza tras exposiciones de 24h. En la mayoría de las cepas, el gen *MTT5* presenta el siguiente ranking de inducción: $\text{Pb} \geq \text{Cd} > \text{Cu}$, a excepción de la cepa Pb-ADAP, en la que el ranking es: $\text{Cd} = \text{Cu} \geq \text{Pb}$ (Fig.48). En las cepas adaptadas a metal los niveles de inducción obtenidos en cultivos constantemente expuestos a la MCT de Cd^{2+} o Pb^{2+} son superiores a los descritos tras los tratamientos de 1 ó 24h con estos dos metales; sin embargo en el caso de la cepa Cu-ADAP ocurre lo contrario ya que en los tratamientos con Cu^{2+} se obtienen mayores niveles de inducción tras las exposiciones de 1h. Tras las exposiciones a Cd^{2+} (1 ó 24h), las cepas MTT1KO y MTT1KO+MTT5KD presentan menores niveles de inducción para el gen *MTT5* con respecto a la cepa control, mientras que en la cepa MTT5KD estos niveles de inducción son mayores a los detectados en la cepa control tras las exposiciones de 24h ($\approx 2x$ con respecto a la cepa control) (Fig. 48). Tras exposiciones de 1h a Pb^{2+} , las cepas MTT1KO y MTT5KD muestran mayores niveles de inducción del gen *MTT5* con respecto a la cepa control, mientras que estos niveles son muy inferiores (en la cepa MTT1KO) o similares (en la cepa MTT5KD) tras tratamientos de 24h con este metal (Fig. 48, Tabla A8).

Por último, el par *MTT2/4* (que codifica dos CuMTs) es inducido preferentemente por Cu^{2+} y alcanza sus mayores niveles de inducción tras los tratamientos de 1h (Fig. 49, Tabla A8), independientemente de la cepa analizada. Estos genes también se inducen de manera significativa en presencia de Cd^{2+} en la mayoría de las cepas, mientras que, tras los

tratamientos con Pb^{2+} , sólo se obtuvieron valores de inducción significativos en el caso de las cepas: SB1969, GFPMTT5, MTT1KO, MTT5KD y MTT1KO+MTT5KD para las exposiciones de 1h. En todas las cepas analizadas se presenta el siguiente ranking de inducción: $Cu > Cd > Pb$. Tras el tratamiento con cobre, en las cepas MTT1KO y MTT5KD los valores de inducción para estos genes son similares a los obtenidos en la cepa control; sin embargo, la cepa MTT1KO+MTT5KD tiene niveles de inducción considerablemente menores para estos genes con respecto a los calculados en la cepa control (Fig. 49). Los genes *MTT2/4* no se inducen en las siguientes cepas y tratamientos: en la cepa control (Pb^{2+} 24h), en la cepa Cd-ADAP (tras todos los tratamientos con Cd^{2+} o Pb^{2+} ensayados), en la cepa Cu-ADAP (Pb^{2+} 1 y 24h), en las cepas Pb-ADAP y GFPMTT1 (ante todos los tratamientos con Pb^{2+}) y en las cepas GFPMTT5, MTT1KO, MTT5KD y MTT1KO+MTT5KD (después de exposiciones a Pb^{2+} 1h). Por consiguiente, estos genes *MTT2/4* son los que muestran el mayor número de inducciones negativas (< 2) de entre los cinco genes MTs de *T. thermophila* analizados (Fig. 49, Tabla A8).

C.2. Análisis comparativo de la expresión de los genes MTs en las tres cepas adaptadas a metales tras mantenerlas durante 1 ó 6 meses sin exposición al metal

El ensayo de expresión de los genes codificantes de MTs en las tres cepas adaptadas a metales se completó tras mantener dichas cepas durante uno (-1M) o seis (-6M) meses en el medio PP210 sin la presencia del metal. Tras este tiempo se las volvió a exponer durante 1 ó 24h a la MCT del metal al que se encontraban adaptadas y se analizó la expresión de cada gen mediante RT-PCR cuantitativa (Fig. 50). Estas cepas las denominamos: Cd-ADAP (-1M), Cu-ADAP (-1M), Pb-ADAP (-1M), Cd-ADAP (-6M), Cu-ADAP (-6M) y Pb-ADAP (-6M).

Las tres cepas adaptadas a metales son capaces de crecer de nuevo en presencia de las correspondientes MCTs tras mantenerse durante 1 ó 6 meses sin el metal y, por tanto, conservan o recuperan rápidamente sus estrategias adaptativas a pesar de haber permanecido este tiempo sin la exposición a metal. Los resultados obtenidos del estudio de expresión en estas cepas se muestran en la Fig. 50 y en la Tabla A9 del Anexo I.

La cepa Cd-ADAP mantiene su característico patrón de inducción tanto tras 1 mes como tras 6 meses sin exposición a Cd^{2+} : $MTT5 > MTT1 > MTT3 > MTT2/4$ (Figs. 50A y B). Sin embargo, sus niveles de inducción tras 1 mes sin metal (Fig. 50A, Tabla A9) son muy superiores a los previamente mencionados (Figs. 46-49), principalmente para los genes *MTT5* y *MTT1*. Estos niveles de inducción son menores tras 6 meses sin exponerse a metal (Fig. 50B) pero continúan siendo superiores a los calculados inicialmente en la cepa Cd-ADAP original. En general, los tratamientos de 24h con Cd^{2+} generan mayores niveles de inducción de los genes MTs que los obtenidos con tratamientos de 1h, a excepción de los genes *MTT2/4*, que alcanzan mayores niveles de expresión tras los tratamientos de 1h (Tabla A9).

En la cepa Cu-ADAP, el ranking de inducción cambia bastante tras mantenerla durante 1 mes ($MTT2/4 > MTT3 > MTT1 > MTT5$) ó 6 meses ($MTT3 > MTT2/4 > MTT5 \approx MTT1$) en ausencia de metal, pasando el par génico *MTT2/4* de la última a la primera o segunda posición (Figs. 50C y D) con respecto al ranking descrito en la cepa original Cu-ADAP.

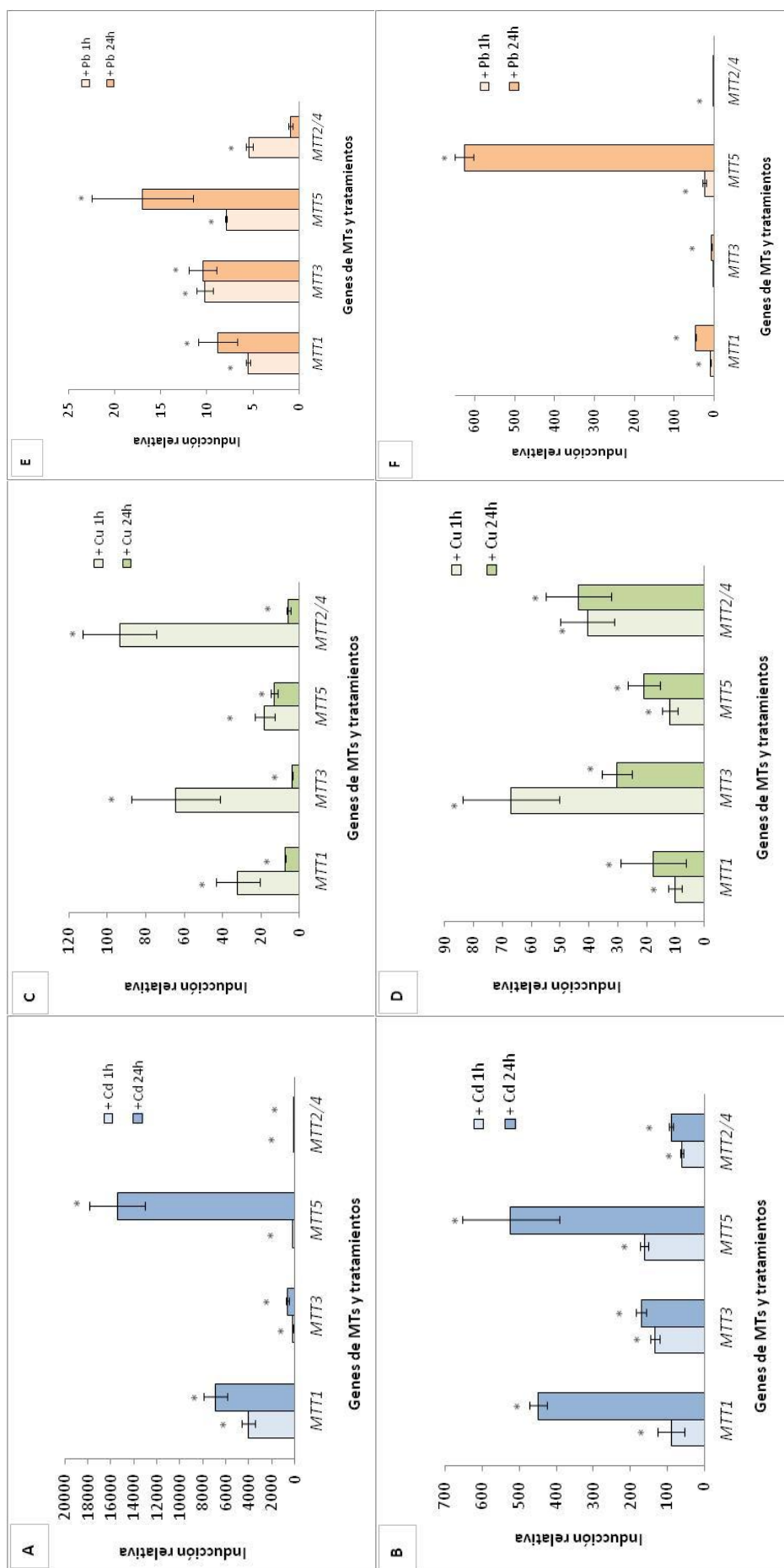


Fig. 50. Análisis de expresión mediante RT-PCR cuantitativa de los cinco genes codificantes de MTs en las tres cepas adaptadas a metales tras mantenerlas durante 1 ó 6 meses en ausencia del metal correspondiente. Tras este tiempo, se las trató de nuevo durante 1 ó 24h con la MCT del metal al que se encontraban adaptadas. **(A):** Cd-ADAP tras 1 mes sin metal (-1M). **(B):** Cd-ADAP tras 6 meses sin metal (-6M). **(C):** Cu-ADAP (-1M). **(D):** Cu-ADAP (-6M). **(E):** Pb-ADAP (-1M). **(F):** Pb-ADAP (-6M). Las barras representan los niveles de inducción relativa con respecto al cultivo control no tratado (valor 1) y normalizados respecto a la expresión del gen de la β -actina. Cada barra corresponde al valor medio de inducción relativa para cada tratamiento \pm la desviación estándar calculada a partir de los resultados obtenidos de dos o tres experimentos independientes. Los asteriscos indican la existencia de diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) respecto a la muestra control (sin tratamiento).

En la cepa Cu-ADAP (-1M) destacan los elevados niveles de inducción tras los tratamientos de 1h (sobre todo para los genes *MTT2/4* y *MTT3*), que son muy superiores a los obtenidos tras las exposiciones de 24h y a los previamente registrados en la cepa original Cu-ADAP bajo la MCT de cobre (Fig. 50C, Tabla A9). Sin embargo, tras 6 meses sin exposición a cobre, los niveles de inducción obtenidos tras los tratamientos de 24h son superiores a los obtenidos tras los tratamientos de 1h, a excepción del gen *MTT3* en el que ocurre lo contrario (Fig. 50D).

Por último, en la cepa Pb-ADAP se observa tras mantenerla durante 1 ó 6 meses sin metal un ranking de inducción ($MTT5 > MTT1 \geq MTT3 > MTT2/4$) muy parecido al que se había descrito para la cepa original ($MTT5 > MTT1 > MTT3 > MTT2/4$). Después de 1 mes sin metal, los valores de inducción de los genes *MTT1*, *MTT3* y *MTT2/4* son superiores a los que se calcularon en la cepa original (Pb-ADAP); sin embargo, en el caso del gen *MTT5*, aunque es el que más se induce bajo estas circunstancias, sus niveles de inducción son bastante inferiores a los calculados en la cepa original (Fig. 50E). Tras 6 meses sin metal, el gen *MTT5* se induce enormemente tras los tratamientos de 24h con Pb^{2+} , alcanzando valores muy similares a los obtenidos en la cepa original Pb-ADAP (Tabla A9). El gen *MTT1* también responde considerablemente bajo estas condiciones, sobre todo tras los tratamientos de 24h, mientras que los genes *MTT2/4* y *MTT3* responden en menor medida que en la cepa Pb-ADAP (-1M) (Fig.50). En general, la inducción tras 24h suele ser superior o igual que a 1h de tratamiento, tanto en la cepa (-1M) como en la (-6M) (Figs. 50E y F).

C.3. Análisis comparativo de los niveles de expresión constitutivos o basales de los genes MTs en diferentes cepas de *T. thermophila*

Los genes MTs de *T. thermophila*, como muchos genes inducibles, también tienen cierto nivel de expresión basal en ausencia de condiciones de estrés (Díaz *et al.*, 2007). Por lo tanto, también podemos comparar sus niveles de expresión basal o constitutivos (Fig. 51, Tabla 26) entre las diferentes cepas de *T. thermophila* utilizando los valores C_t obtenidos en las condiciones control (sin exposición a metal).

En los estudios por PCR cuantitativa siempre se define un valor umbral o *threshold* por encima del cual se considera estadísticamente significativa la señal detectada y, por tanto, relevante la amplificación. Los valores C_t o *threshold cycle* de cada muestra representan el ciclo a partir del cual la señal de fluorescencia emitida supera este umbral. De esta forma, el valor C_t está inversamente relacionado con la cantidad de transcrito/ADNc presente en la muestra. Así, cuánto menor sea el valor C_t de un determinado gen, mayor será la cantidad de transcrito/ADNc (en las reacciones de RT-PCR cuantitativa) o de ADN genómico (en los ensayos de PCR cuantitativa) en la muestra y, por consiguiente, mayor será la expresión de ese gen o mayor será el número de copias del mismo en dicha muestra. En la Tabla 26 se muestran los valores C_t constitutivos (calculados en ausencia de metal) para los cinco genes MT en las diferentes cepas analizadas. Estos valores se pueden comparar entre sí utilizando la fórmula: $2^{(C_{t1}-C_{t2})}$, donde $C_{t1}-C_{t2}$ es la diferencia entre los valores C_t de dos muestras diferentes. De este modo podemos calcular las diferencias que presentan los niveles relativos de expresión basal de dos genes MT dentro de una misma cepa (Tabla 27) e incluso comparar los niveles de expresión basal del mismo gen MT entre dos cepas diferentes (Tabla 28).

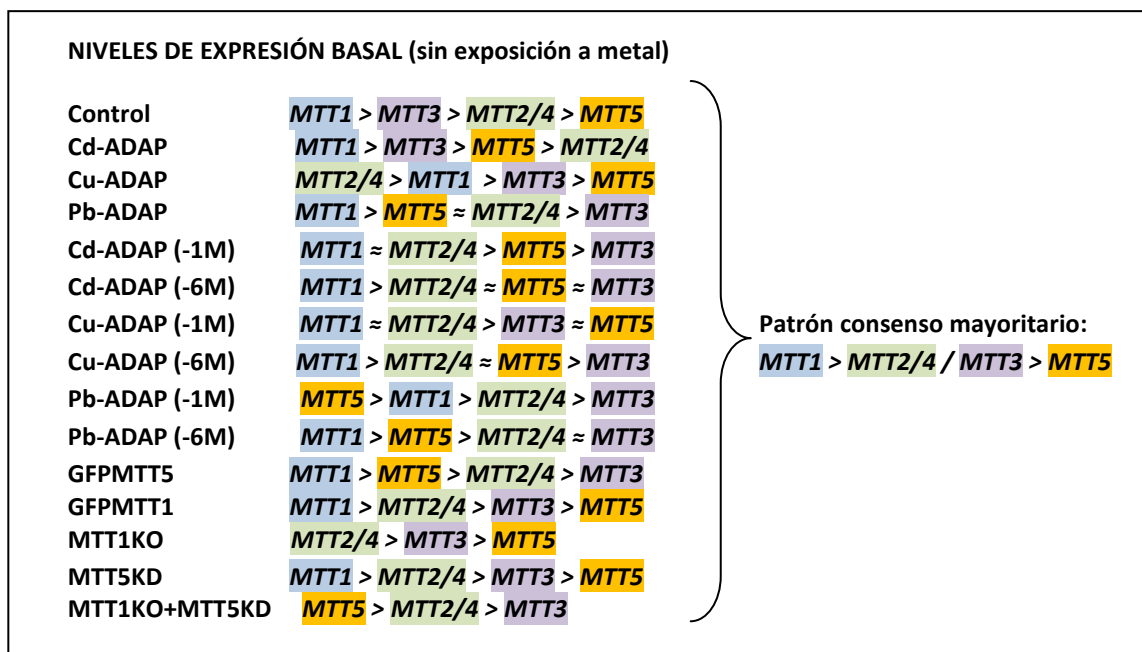


Fig. 51. Ranking de los niveles de expresión basal obtenidos en ausencia de metal para los cinco genes MTs de *T. thermophila* en las diferentes cepas seleccionadas. Se muestra el patrón consenso mayoritario.

Los resultados mostrados en la Tabla 27 y en la Fig. 51 indican que el gen *MTT1* es el que presenta de manera destacada los mayores niveles de expresión basal, concretamente se observa su primera posición en el ranking de las cepas control (SB1969), Cd-ADAP, Pb-ADAP, GFPMTT1, GFPMTT5, MTT5KD y en la mayoría de las cepas adaptadas tras mantenerlas durante 1 ó 6 meses en ausencia de metal (-1M y -6M). Sin embargo, en las cepas Cu-ADAP, Cu-ADAP (-1M) y MTT1KO, los genes *MTT2/4* son los que presentan los mayores niveles de expresión basal. Finalmente, en las cepas MTT1KO+MTT5KD y Pb-ADAP (-1M) es el gen *MTT5* el que muestra los mayores niveles de expresión constitutiva. Por el contrario, los genes *MTT5* y *MTT3* son los que tienen menores niveles de expresión basal, ocupando las posiciones 3ª ó 4ª del ranking en muchas de las cepas analizadas (SB1969, Cd-ADAP, Cu-ADAP, Cd-ADAP (-1M), Cd-ADAP (-6M), Cu-ADAP (-1M), Cu-ADAP (-6M), GFPMTT1, MTT1KO y MTT5KD) (Fig. 51).

En la cepa control (SB1969) el ranking de expresión basal de los genes MT (en ausencia de metal) es el siguiente: $MTT1 > MTT3 > MTT2/4 > MTT5$ (Fig. 51), existiendo una diferencia de hasta cinco ciclos entre los valores C_t del gen *MTT1* y del gen *MTT5*, que realmente supone una diferencia de expresión de ≈ 37 veces entre ambos genes. En definitiva, en la cepa control el gen *MTT1* se expresa $\approx 1,6$ veces más que el gen *MTT3*, ≈ 8 veces más que los genes *MTT2/4* y ≈ 37 veces más que el gen *MTT5*; además, el gen *MTT3* se expresa 5 veces más que los genes *MTT2/4* y 22x el *MTT5*, mientras que los genes *MTT2/4* se expresan unas 4 veces más que el gen *MTT5* en condiciones basales (Tablas 26 y 27). En la cepa Cd-ADAP, la relación entre los niveles de expresión basales de los genes MTs es la siguiente: $MTT1 \approx 30x MTT3$, $\approx 68x MTT5$ y $\approx 118x MTT2/4$, mientras que $MTT3 \approx 2x MTT5$ y $\approx 4x MTT2/4$ y finalmente, $MTT5 \approx 2x MTT2/4$ (Tabla 27). Por lo tanto, en la cepa Cd-ADAP el gen *MTT1* ocupa también la primera posición de

este ranking de expresión basal (al igual que en la cepa control), pero las diferencias entre los niveles de expresión basales del gen *MTT1* y los demás genes MT son muy superiores a las observadas en la cepa control (Tabla 27). En la cepa Cu-ADAP, el par *MTT2/4* es el que presenta mayores niveles de expresión basal ($MTT2/4 > MTT1 > MTT3 > MTT5$) (Fig. 51), siendo $\approx 27x$ *MTT5* y $16x$ *MTT3*. La primera parte de este ranking se mantiene en la cepa Cu-ADAP (-1M), obteniéndose la siguiente relación: $MTT2/4 \approx 11x$ *MTT5* y $6,5x$ *MTT3*, con la excepción de que el primer puesto ahora lo ocupa el gen *MTT1* o el par *MTT2/4*, que muestran valores similares (Fig. 51, Tabla 27). Finalmente, las cepas Pb-ADAP y Pb-ADAP (-6M) también presentan al gen *MTT1* en la primera posición del ranking de inducción, pero en el caso de la cepa Pb-ADAP (-1M) este gen pasa a ocupar la segunda posición del ranking ($MTT5 > MTT1 > MTT2/4 > MTT3$) (Fig. 51, Tabla 26).

En las cepas GFPMTT1 y GFPMTT5, el gen *MTT1* también muestra los mayores niveles de expresión basal, obteniéndose las siguientes relaciones: $MTT1 \approx 35x$ *MTT5* y $4x$ *MTT3* en la cepa GFPMTT1 y $\approx 3x$ *MTT5* y $22x$ *MTT3* en la GFPMTT5 (Tabla 27). Por otro lado, en las cepas MTT1KO y MTT1KO+MTT5KD (que carecen del gen *MTT1*), son los genes *MTT2/4* y *MTT5* respectivamente, los que muestran los mayores niveles de expresión basal (Fig. 51). Finalmente, en la cepa MTT5KD, destaca de nuevo el gen *MTT1* como el que presenta mayores niveles de expresión basal (Fig. 51), siendo éstos $\approx 2.194x$ *MTT5* y $34x$ *MTT3* (Tabla 27).

Tabla 26. Comparación de los valores C_t basales o constitutivos (en ausencia de metal) obtenidos para cada uno de los genes MT en las diferentes cepas de *T. thermophila* utilizadas en el estudio de expresión

Gen	Cepa	Control SB1969	Cd-ADAP	Cu-ADAP	Pb-ADAP	MTT1KO	MTT5KD	MTT1KO + MTT5KD	
<i>ACTINA</i>		14,95	15,6	14,80	15,10	13,1	15,6	13,8	
<i>MTT1</i>		16,42	11,61*	17,40	17,50	-	17,5	-	
<i>MTT3</i>		17,10	16,50	19,30	20,40	17,3	22,6	18,3	
<i>MTT5</i>		21,59	17,70*	20,10*	18,70*	18,5*	28,6	15,7*	
<i>MTT2/4</i>		19,47	18,50	15,34*	19,20	16,5*	18,7	16,1*	
Gen	Cepa	Cd-ADAP (-1M)	Cu-ADAP (-1M)	Pb-ADAP (-1M)	Cd-ADAP (-6M)	Cu-ADAP (-6M)	Pb-ADAP (-6M)	GFPMTT1	GFPMTT5
<i>ACTINA</i>		14,80	14,60	16,10	14,70	16,30	14,90	14,90	15,00
<i>MTT1</i>		17,20	17,60	15,60	16,50	16,40	15,70	15,41	14,23*
<i>MTT3</i>		20,30	20,20	20,2	19,50	19,90	19,20	17,20	18,70
<i>MTT5</i>		19,00*	20,90	14,20*	19,20*	18,50*	17,20*	20,52	15,98*
<i>MTT2/4</i>		17,60*	17,50*	19,30	19,90	18,30*	19,30	16,67*	16,79*

El gen de la actina se utiliza como control endógeno o gen normalizador de la expresión. Los asteriscos señalan los valores C_t que son considerablemente inferiores a los obtenidos para ese mismo gen en la cepa control SB1969 y que por tanto suponen mayores niveles de expresión basal para ese gen en la cepa correspondiente. (-): no aplicable, las cepas MTT1KO y MTT1KO+MTT5KD han perdido todas las copias del gen *MTT1* y por tanto estos valores no pueden ser calculados.

Resultados

Tabla 27. Comparación de los niveles de expresión basal entre las cinco isoformas génicas de MTs en cada cepa de *T. thermophila*

SB1969	MTT1	MTT3	MTT5	MTT2/4	Cd-ADAP	MTT1	MTT3	MTT5	MTT2/4
	MTT1					MTT1			
	MTT3	1.60x	1			MTT3	29.65x	1	
	MTT5	36x	22.47x	1		MTT5	68.12x	2.3x	1
	MTT2/4	8.28x	5.17x	4.35x	1	MTT2/4	118.6x	4x	1.74x
Cd-ADAP (-1M)	MTT1	MTT3	MTT5	MTT2/4	Cd-ADAP (-6M)	MTT1	MTT3	MTT5	MTT2/4
	MTT1					MTT1			
	MTT3	8.57x	1			MTT3	8x	1	
	MTT5	3.48x	2.46x	1		MTT5	6.5x	1.23x	1
	MTT2/4	1.32x	6.5x	2.64x	1	MTT2/4	10.56x	1.32x	1.62x
Cu-ADAP	MTT1	MTT3	MTT5	MTT2/4	Cu-ADAP (-1M)	MTT1	MTT3	MTT5	MTT2/4
	MTT1					MTT1			
	MTT3	3.73x	1			MTT3	6.06x	1	
	MTT5	6.5x	1.74x	1		MTT5	9.85x	1.62x	1
	MTT2/4	4.17x	15.56x	27.1x	1	MTT2/4	1.07x	6.5x	10.56x
Cu-ADAP (-6M)	MTT1	MTT3	MTT5	MTT2/4	Pb-ADAP	MTT1	MTT3	MTT5	MTT2/4
	MTT1					MTT1			
	MTT3	11.3x	1			MTT3	7.46x	1	
	MTT5	4.29x	2.64x	1		MTT5	2.3x	3.25x	1
	MTT2/4	3.73x	3.03x	1.15x	1	MTT2/4	3.25x	2.3x	1.41x
Pb-ADAP (-1M)	MTT1	MTT3	MTT5	MTT2/4	Pb-ADAP (-6M)	MTT1	MTT3	MTT5	MTT2/4
	MTT1					MTT1			
	MTT3	24.25x	1			MTT3	11.3x	1	
	MTT5	2.64x	64x	1		MTT5	2.83x	4x	1
	MTT2/4	12.99x	1.87x	34.3x	1	MTT2/4	12.13x	1.07x	4.29x
GFPMTT5	MTT1	MTT3	MTT5	MTT2/4	GFPMTT1	MTT1	MTT3	MTT5	MTT2/4
	MTT1					MTT1			
	MTT3	22.16x	1			MTT3	3.46x	1	
	MTT5	3.36x	6.59x	1		MTT5	34.54x	9.99x	1
	MTT2/4	5.9x	3.76x	1.75x	1	MTT2/4	2.39x	1.44x	3.85x
MTT1KO	MTT1	MTT3	MTT5	MTT2/4	MTT5KD	MTT1	MTT3	MTT5	MTT2/4
	MTT1	-				MTT1			
	MTT3	-	1			MTT3	34.3x	1	
	MTT5	-	2.3x	1		MTT5	2,194.9x	64x	1
	MTT2/4	-	1.74x	4x	1	MTT2/4	2.3x	14.93x	955.4x
MTT1KO+MTT5KD	MTT1	MTT3	MTT5	MTT2/4					
	MTT1	-							
	MTT3	-	1						
	MTT5	-	6.06x	1					
	MTT2/4	-	4.59x	1.32x	1				

En cada cepa, los genes MT se comparan dos a dos entre sí, distinguiéndolos con dos colores: rojo y verde. Los valores obtenidos de cada comparación se indican en uno de estos dos colores según el gen que presenta un mayor nivel de expresión basal. Se consideran diferencias realmente significativas (sombreadas en gris) aquellas que son mayores que 4 (más de dos ciclos entre los valores C_t comparados).

Además de comparar los niveles de expresión basal entre los diferentes genes MT dentro de una misma cepa, también podemos comparar los niveles de expresión basal de un determinado gen entre las diferentes cepas analizadas (Tabla 28). Los mayores niveles de expresión basal para los genes *MTT1* y *MTT3* se detectan en la cepa Cd-ADAP, para el par *MTT2/4* en la Cu-ADAP y, en el caso del gen *MTT5*, en la cepa GFPMTT5 (Tabla 28).

A partir de los resultados recogidos en la Tabla 28 podemos comparar para cada uno de los genes MT sus valores de expresión basal entre las diferentes cepas y la cepa control SB1969. En la cepa GFPMTT1 se observa un aumento significativo de los niveles de expresión basales de los genes *MTT2/4* (≈ 7 veces superior que el observado en la cepa control). En la cepa GFPMTT5, además de aumentar enormemente los niveles de expresión basales del gen *MTT5* (≈ 64 veces superior al de la cepa control), también se aprecia un aumento significativo de la expresión basal de los genes *MTT1* ($\approx 4,5$ veces superior) y *MTT2/4* ($\approx 6,5$ veces superior al control) (Tabla 28).

Una situación similar se aprecia en las cepas adaptadas a metales: en la cepa Cd-ADAP se observan mayores niveles de expresión basales para los genes *MTT1* (≈ 28 veces superior) y *MTT5* (≈ 15 veces superior) con respecto a la cepa control, en la cepa Cu-ADAP los genes *MTT2/4* son los que aumentan sus niveles de expresión basales ($\approx 17,5$ veces superior) con respecto a los observados en la cepa control y, finalmente, en el caso de la cepa Pb-ADAP es el gen *MTT5* el que aumenta significativamente sus niveles de expresión basales ($\approx 7,5$ veces superior con respecto a la cepa control) (Tabla 28). Tras mantener estas cepas durante 1 ó 6 meses sin la presencia constante del metal y obtener de nuevo sus niveles de expresión basal para los genes MT se observa lo siguiente:

- En la cepa Cd-ADAP (-1M) el gen *MTT1* ha recuperado sus niveles de expresión basales normales, similares a los de la cepa control, pero se mantienen elevados los niveles de expresión basales de los genes *MTT2/4* (≈ 4 veces superiores) y del gen *MTT5* (≈ 6 veces superiores), que incluso permanece así tras mantener las células durante 6 meses sin exponer a Cd^{2+} (≈ 5 veces superiores respecto de los de la cepa control) (Tabla 28).
- La cepa Cu-ADAP (-1M) también mantiene elevados niveles basales del par *MTT2/4* (≈ 4 veces superiores con respecto de la cepa control), aunque éstos se han reducido bastante con respecto a los que tenía en presencia constante de Cu^{2+} ($\approx 17,5$ veces superiores). En la cepa Cu-ADAP (-6M) los niveles basales de expresión de los genes *MTT2/4* han recuperado prácticamente sus valores normales pero se observa que el gen *MTT5* ha aumentado los suyos ($\approx 8,5$ veces superiores) (Tabla 28).
- Las cepas Pb-ADAP (-1M) y Pb-ADAP (-6M) aún mantienen elevados niveles de expresión basal para el gen *MTT5* (≈ 168 veces superiores y ≈ 21 veces superiores respecto a los de la cepa control, respectivamente) tras este período de tiempo sin metal (Tabla 28).

Finalmente, en las cepas *knockout* (KO) y/o *knockdown* (KD) se observa que la cepa MTT1KO presenta mayores niveles de expresión basal para los genes *MTT5* ($\approx 8,5x$) y *MTT2/4* ($\approx 8x$) con respecto a la cepa control SB1969. El doble mutante MTT1KO+MTT5KD tiene mayores niveles de expresión basal para los genes *MTT5* ($\approx 60x$) y *MTT2/4* ($\approx 10x$) (Tabla 27). El MTT5KD presenta un patrón de expresión basal muy similar a la cepa GFPMTT1 (Fig. 51).

Tabla 28. Comparación de los niveles de expresión basal para cada gen codificante de MTs entre las diferentes cepas de *T. thermophila*

Gen MTT1	SB1969	Cd-ADAP	Cd-ADAP (-1M)	Cd-ADAP (-6M)	Cu-ADAP	Cu-ADAP (-1M)	Cu-ADAP (-6M)	Pb-ADAP	Pb-ADAP (-1M)	Pb-ADAP (-6M)	GFP MTT5	GFP MTT1	MTT1KO	MTT5KD	MTT1KO + MTT5KD
SB1969	1														
Cd-ADAP	28,05x	1													
Cd-ADAP (-1M)	1,72x	48,2x	1												
Cd-ADAP (-6M)	1,06x	29,7x	1,62x	1											
Cu-ADAP	1,97x	55,3x	1,15x	1,87x	1										
Cu-ADAP (-1M)	2,26x	63,6x	1,32x	2,14	1,15x	1									
Cu-ADAP (-6M)	1,01x	27,7x	1,74x	1,07x	2x	2,29x	1								
Pb-ADAP	2,11x	59,3x	1,23x	2x	1,07x	1,07x	2,14x	1							
Pb-ADAP (-1M)	1,77x	15,9x	3,03x	1,87x	3,48x	4x	1,74x	3,73x	1						
Pb-ADAP (-6M)	1,65x	17,0x	2,82x	1,74x	3,25x	3,73x	1,62x	3,48x	1,07	1					
GFPMTT5	4,56x	6,14x	7,84x	4,82x	9,00x	10,34x	4,50x	9,65x	2,58x	2,78x	1				
GFPMTT1	2,01x	13,9x	3,46x	2,13x	3,97x	4,56x	1,99x	4,26x	1,14x	1,22x	2,27x	1			
MTT1KO	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1		
MTT5KD	2,11x	59,3x	1,23x	2x	1,07x	1,07x	2,14x	1x	3,73x	3,48x	9,65x	4,26x	-	1	
MTT1KO + MTT5KD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1

Gen	SB1969	Cd-ADAP	Cd-ADAP (-1M)	Cd-ADAP (-6M)	Cu-ADAP	Cu-ADAP (-1M)	Cu-ADAP (-6M)	Pb-ADAP	Pb-ADAP (-1M)	Pb-ADAP (-6M)	GFP MTT5	GFP MTT1	MTT1KO	MTT5KD	MTT1KO + MTT5KD
SB1969	1														
Cd-ADAP	1,52x	1													
Cd-ADAP (-1M)	9,19x	13,9x	1												
Cd-ADAP (-6M)	5,28x	8x	1,74x	1											
Cu-ADAP	4,59x	6,96x	2x	1,15x	1										
Cu-ADAP (-1M)	8,57x	13x	1,07x	1,62x	1,87x	1									
Cu-ADAP (-6M)	6,96x	10,6x	1,32x	1,32x	1,52x	1,23x	1								
Pb-ADAP	9,85x	14,9x	1,07x	1,87x	2,14x	1,15x	1,41x	1							
Pb-ADAP (-1M)	8,57x	13x	1,07x	1,62x	1,87x	1x	1,23x	1,15x	1						
Pb-ADAP (-6M)	4,28x	6,49x	1,87x	1,23x	1,07x	2x	1,62x	2,3x	2x	1					
GFPMTT5	3,03x	4,59x	3,03x	1,74x	1,52x	2,83x	2,3x	3,25x	2,83x	1,41x	1				
GFPMTT1	1,07x	1,62x	8,58x	4,92x	4,29x	8x	6,5x	9,19x	8x	4x	2,82x	1			
MTT1KO	1,15x	1,74x	8x	4,59x	4x	7,46x	6,06x	8,57x	7,46x	3,73x	2,63x	1,07x	1		
MTT5KD	42,2x	64x	4,59x	8x	9,19x	4,92x	6,06x	4,29x	4,93x	9,85x	13,9x	39,4x	36,7x	1	
MTT1KO + MTT5KD	2,3x	3,48x	4x	2,3x	2x	3,73x	3,03x	4,29x	3,73x	1,87x	1,32x	2,14x	2x	18,4x	1

Gen MTT5	SB1969	Cd-ADAP	Cd-ADAP (-1M)	Cd-ADAP (-6M)	Cu-ADAP	Cu-ADAP (-1M)	Cu-ADAP (-6M)	Pb-ADAP	Pb-ADAP (-1M)	Pb-ADAP (-6M)	GFP MTT5	GFP MTT1	MTT1KO	MTT5KD	MTT1K1+ MTT5KD
SB1969	1														
Cd-ADAP	14,83	1													
Cd-ADAP (-1M)	6,02x	2,46x	1												
Cd-ADAP (-6M)	5,24x	2,83x	1,15 x	1											
Cu-ADAP	2,81x	5,28x	2,14x	1,87x	1										
Cu-ADAP (-1M)	1,61x	9,19x	3,73x	3,25x	1,74x	1									
Cu-ADAP (-6M)	8,51x	1,74x	1,41x	1,62x	3,03x	5,28x	1								
Pb-ADAP	7,41	2x	1,23x	1,14x	2,64x	4,59x	1,15x	1							
Pb-ADAP (-1M)	167,7x	11,3x	27,86x	32x	59,7x	103,97x	19,7x	22,6x	1						
Pb-ADAP (-6M)	20,97x	1,41x	3,48x	4x	7,46x	12,99x	2,46x	2,83x	8x	1					
GFPMTT5	48,84x	3,29x	8x	9,32x	17,39x	30,27x	5,74x	6,59x	3,43x	2,32x	1				
GFPMTT1	2,09x	7,06x	2,8x	2,5x	1,34x	1,34x	4,06x	3,53x	79,89x	9,99x	23,26x	1			
MTT1KO	8,51x	1,74x	1,41x	1,62x	3,03x	5,28x	1x	1,15x	19,7x	2,46x	5,74x	4,06x	1		
MTT5KD	120,3x	1,783x	724x	630,3x	337,8x	194x	1.024x	891,4x	20.171x	2.521,4x	5.873x	252,5x	1.024x	1	
MTT1KO + MTT5KD	59,3x	4x	9,85x	11,31x	21,1x	36,76x	6,96x	8x	2,83x	2,83x	1,21x	28,25x	6,96x	7.131x	1

Genes	SB1969	Cd-ADAP	Cd-ADAP (-1M)	Cd-ADAP (-6M)	Cu-ADAP	Cu-ADAP (-1M)	Cu-ADAP (-6M)	Pb-ADAP	Pb-ADAP (-1M)	Pb-ADAP (-6M)	GFP MTT5	GFP MTT1	MTT1KO	MTT5KD	MTT1KO + MTT5KD
SB1969	1														
Cd-ADAP	1,94x	1													
Cd-ADAP (-1M)	3,66x	1,87x	1												
Cd-ADAP (-6M)	1,35x	2,64x	4,92x	1											
Cu-ADAP	17,51x	8,94x	4,79x	23,6x	1										
Cu-ADAP (-1M)	3,92	2x	1,07x	5,28x	4,47x	1									
Cu-ADAP (-6M)	2,25x	1,15x	1,62x	3,03x	7,78x	1,74x	1								
Pb-ADAP	1,62x	1,62x	3,03x	1,62x	14,5x	3,25x	1,87x	1							
Pb-ADAP (-1M)	1,13x	1,74x	3,25x	1,52x	15,6x	3,48x	2x	1,07x	1						
Pb-ADAP (-6M)	1,13x	1,74x	3,25x	1,52x	15,6x	3,48x	2x	1,07x	1x	1					
GFPMTT5	6,41x	3,27x	1,75x	8,63x	2,73x	1,65x	2,85x	5,31x	5,7x	5,7x	1				
GFPMTT1	6,96x	3,56x	1,91x	9,38x	2,51x	1,78x	3,1x	5,78x	6,19x	6,19x	1,09x	1			
MTT1KO	7,84x	4x	2,14x	10,6x	2,23x	2x	3,48x	6,5x	6,95x	6,95x	1,22x	1,13x	1		
MTT5KD	1,96x	1,15x	1,87x	2,64x	8,94x	2x	1,15x	1,62x	1,74x	1,74x	3,27x	3,56x	4x	1	
MTT1KO + MTT5KD	10,34x	5,28x	2,83x	13,93x	1,69x	2,64x	4,59x	8,57x	9,19x	9,19x	1,61x	1,48x	1,32x	5,28x	1

Se comparan las distintas cepas entre sí dos a dos, distinguiéndose con dos colores: rojo y verde. Los valores obtenidos de cada comparación se indican en uno de estos dos colores según la cepa que presenta un mayor nivel de expresión basal. Se consideran diferencias realmente significativas (sombreadas en gris) si las diferencias entre los niveles de expresión basal son mayores que 4, que suponen diferencias de más de dos ciclos entre los valores C_t comparados.

C.4. Análisis de la variación del número de copias/ μl de los genes macronucleares codificantes de MTs en las diferentes cepas de *T. thermophila*

Con el fin de dilucidar la existencia de posibles procesos de amplificación diferencial o variaciones en el número de copias de los genes macronucleares codificantes de MTs como una respuesta adaptativa a la constante presencia de metal en las cepas adaptadas, se realizó (mediante PCR cuantitativa) el cálculo del número de copias/ μl de los cinco genes codificantes de MTs (*MTT1*, *MTT3*, *MTT5*, *MTT2/4*) en las diferentes cepas de *T. thermophila* (Figs. 52 y 53, Tabla A10). En este análisis también se incluyeron dos genes control: el gen de la actina (usado en los estudios de expresión como control endógeno) y el gen denominado *CYCLIC* (*Cyclic nucleotide-binding domain protein*, THERM_00241620), situado muy próximo ($\approx 2,7$ Kb) a la región codificante del gen *MTT1* (en el brazo izquierdo del cromosoma 4 micronuclear). Se han empleado las siguientes cepas de *T. thermophila*: varias cepas control (SB1969, CU420, SB210), la cepa GFPMTT1, las cepas adaptadas a elevadas concentraciones de metal (Cd-ADAP, Cu-ADAP y Pb-ADAP) y las tres cepas *knockout* (KO) y/o *knockdown* (KD) (*MTT1KO*, *MTT5KD*, *MTT1KO+MTT5KD*). En el caso de la cepa Cd-ADAP también se calculó el número de copias/ μl de los genes MT en distintas condiciones: tras 1, 7 ó 10 meses en ausencia de metal (-1M, -7M ó -10M) y tras una nueva exposición (24h) a la MCT de Cd^{2+} tras mantener esta cepa 10 meses sin metal (-10M + 1 semana con Cd) (Fig. 52).

De los resultados mostrados en la Fig 52 y en la Tabla A10 se deduce que las tres cepas utilizadas en el estudio como cepas controles (SB1969, CU428 y SB210), la cepa GFPMTT1 y las cepas Cu-ADAP y Pb-ADAP presentan el mismo número de copias/ μl para todos los genes MT macronucleares, no mostrándose diferencias significativas entre las seis. En todas ellas, se obtiene ≈ 1 copia/ μl para todos los genes analizados excepto para los genes *MTT2/4*, para los que se estiman ≈ 2 copias/ μl ya que realmente se trata de la suma de ambos genes (*MTT2* + *MTT4*) por no poder distinguirse mediante PCR (Fig. 52, Tabla A10). Por el contrario, en la cepa Cd-ADAP se ha detectado un incremento del número de copias/ μl que afecta exclusivamente a los genes *MTT1*, *MTT3* y *CYCLIC* (≈ 5 -6 veces más con respecto a la cepa control SB1969) (Fig. 52). Estos tres genes están localizados muy próximos entre sí en el mismo subfragmento cromosómico macronuclear (derivado del brazo izquierdo del cromosoma 4 micronuclear). Sin embargo, en esta cepa Cd-ADAP se mantiene el mismo número de copias/ μl para los genes *MTT2/4*, *MTT5* y actina (*ACT*) previamente mencionado para el resto de cepas analizadas.

Con el fin de dilucidar si el número extra de copias de los genes *MTT1* y *MTT3* se mantiene independientemente de la presión selectiva inducida por el metal, el análisis de PCR cuantitativa se repitió tras mantener la cepa Cd-ADAP durante 1, 7 ó 10 meses sin exposición a metal. En la cepa Cd-ADAP (-1M) se reduce aproximadamente a la mitad (unas 3 copias/ μl) el número de copias/ μl para estos genes (*MTT1*, *MTT3* y *CYCLIC*) con respecto a los valores calculados en la cepa Cd-ADAP original (expuesta constantemente a Cd^{2+}) (Fig. 52). Tras 7 meses sin metal [cepa Cd-ADAP (-7M)], el número de copias/ μl de estos tres genes ya ha disminuido hasta ser el mismo que el calculado en las cepas control (≈ 1 copia/ μl) (Fig. 52). Por último, con el fin de conocer si el aumento selectivo del número de copias/ μl de los genes *MTT1*, *MTT3* y *CYCLIC* se trata de un proceso reversible, se mantuvieron las células Cd-ADAP durante 10 meses en ausencia de metal (células control) y, posteriormente, se expusieron de nuevo a la máxima concentración tolerada (MCT) de Cd^{2+} durante una semana. Las células

control (Cd-ADAP mantenidas durante 10 meses sin ninguna exposición a metal) presentaban ≈ 1 copia/ μl de los genes *MTT1*, *MTT3* y *CYCLIC* al igual que el resto de las cepas analizadas (Fig. 52). Sin embargo, al volver a exponer a estas células a la MCT de Cd^{2+} durante 1 semana se observa que el número de copias/ μl de estos tres genes aumenta de nuevo progresivamente hasta alcanzarse valores de ≈ 3 copias/ μl (Fig. 52).

También se calculó el número de copias/ μl de los genes codificantes de MTs en las cepas KO y/o KD. Los resultados corroboraron que las cepas *MTT1KO* y *MTT1KO+MTT5KD* habían perdido todas las copias del gen *MTT1* (Fig. 53, Tabla A10) y eran, por consiguiente, *knockout* (KO) estables para este gen. Sin embargo, el gen *MTT5* parece ser un gen esencial ya que no fue posible eliminar por completo todas las copias de este gen del macronúcleo, por lo que las cepas obtenidas se consideran cepas *knockdown* (KD) para este gen (*MTT5KD* y *MTT1KO+MTT5KD*). Se detectaron 0,012 y 0,071 copias/ μl del gen *MTT5* en las cepas *MTT5KD* y *MTT1KO+MTT5KD*, respectivamente (Tabla A10). Si consideramos que el valor definido como 1 copia/ μl se corresponde con una dotación subcromosómica macronuclear de $\approx 45n$ en *T. thermophila* (Prescott, 1994), 0,012 copias/ μl se corresponderían con $\approx 1n$ y 0,071 copias/ μl con $\approx 3n$. Por lo tanto, en las cepas *knockdown* se ha conseguido reducir considerablemente el número de copias/ μl para el gen *MTT5* pero no se han podido eliminar por completo todas las copias de este gen y, por ello, la mutación podría revertir, recuperándose de nuevo progresivamente el número de copias/ μl del gen *MTT5*. Para evitar esta reversión, estas dos cepas se conservan expuestas de manera constante a altas dosis de paromomicina (Pm) (800 $\mu\text{g/ml}$) (*MTT5KD*) o cicloheximida (CHX) (60 $\mu\text{g/ml}$) (*MTT1KO+MTT5KD*), con el fin de mantener a niveles mínimos el número de copias/ μl del gen *MTT5*. De hecho, en otro ensayo, las cepas *MTT5KD* y *MTT1KO+MTT5KD* se mantuvieron durante una semana en el medio PP210 en ausencia de estos antibióticos y se calculó, de nuevo, el número de copias/ μl del gen *MTT5* en ambas cepas. Se observa que, al eliminar la presión selectiva de los antibióticos, el número de copias/ μl del gen *MTT5* comienza a subir de nuevo, alcanzándose valores de $\approx 0,55$ - $0,61$ copias/ μl (≈ 23 - $27n$) en ambas cepas mutantes tras sólo una semana.

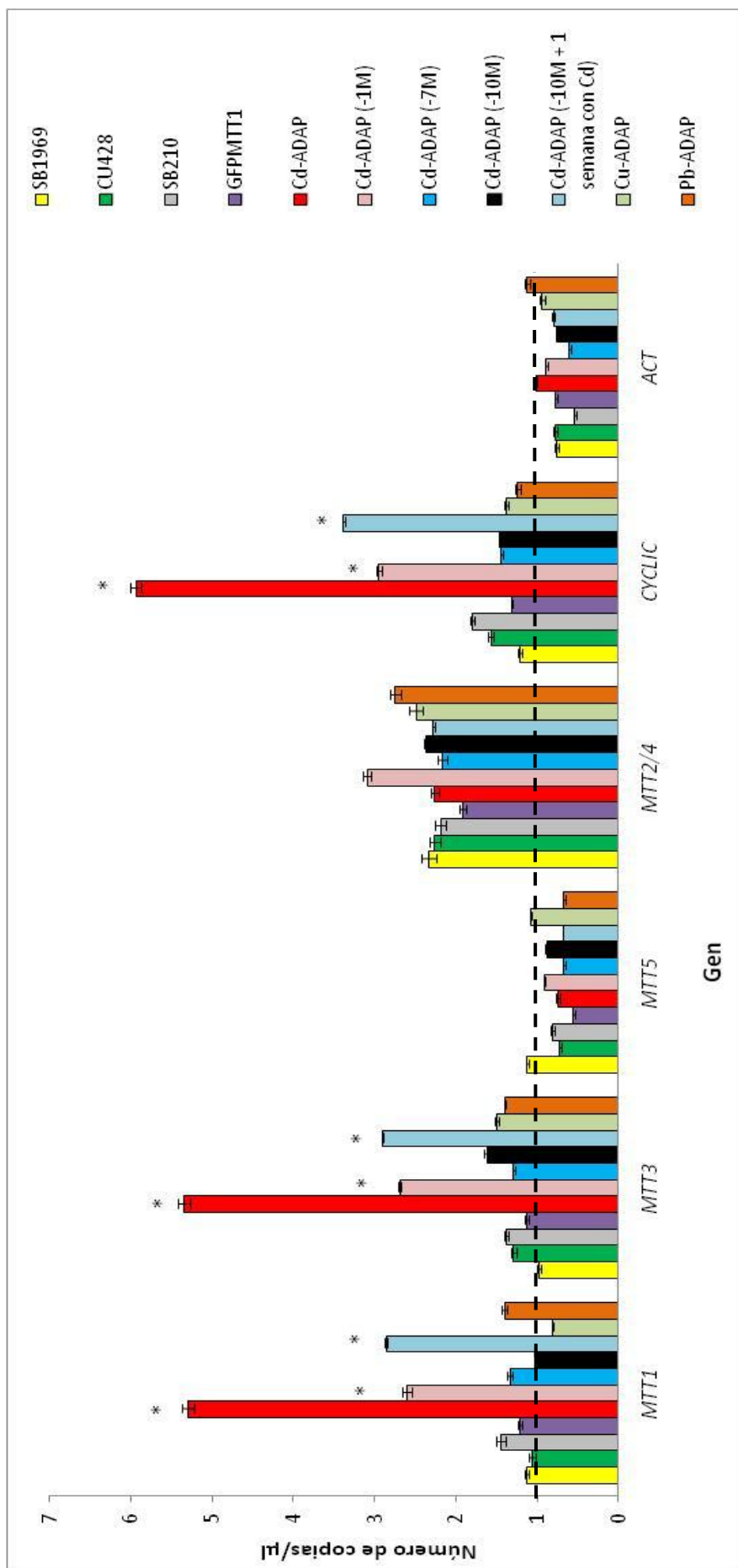


Fig. 52. Cálculo del número de copias/ μ l de cada uno de los genes codificantes de MTs en diferentes cepas de *T. thermophila*. Los genes de la actina (ACT) y *CYCLIC* (*cyclic nucleotide-binding domain protein*, THERM_00241620) se utilizan como controles internos del experimento. Cada barra se corresponde con el valor medio del número de copias/ μ l \pm la desviación estándar y se calcula a partir de los valores C_t obtenidos en al menos cuatro experimentos independientes de PCR cuantitativa, utilizando la ecuación: $C_t = \text{pendiente} \times \log (\text{número de copias}/\mu\text{l}) + y\text{-intercept}$. Estos valores se recogen en la Tabla A10 del Anexo I. Los asteriscos indican la existencia de diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,01$) respecto a la muestra de la cepa control SB1969. Con una línea discontinua (próxima al valor 1) se señala el umbral definido por las cepas usadas con controles.

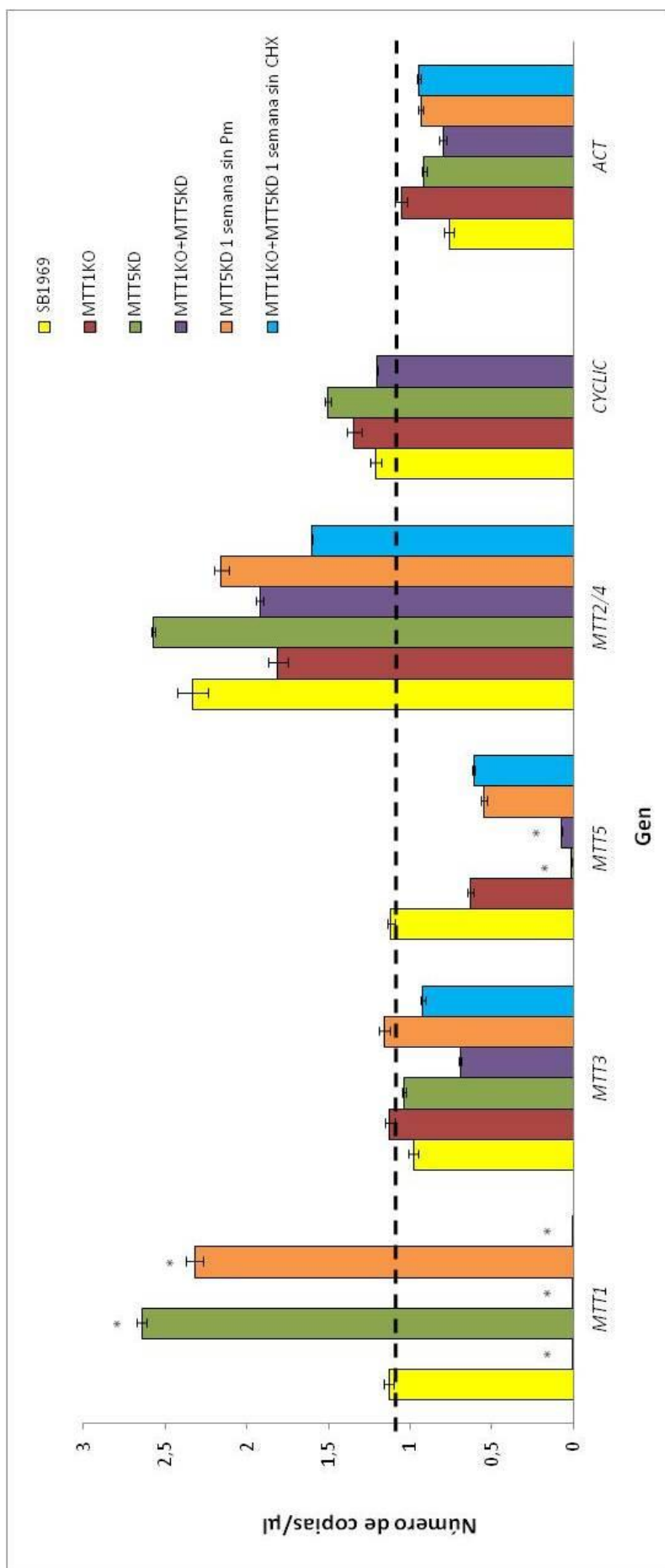


Fig. 53. Cálculo del número de copias/ μl de cada uno de los genes codificantes de MTs en las cepas *knockout* (KO) y/o *knockdown* (KD). Los genes de la actina (ACT) y *CYCLIC* (*cyclic nucleotide-binding domain protein*, THERM_00241620) se utilizan como controles internos del experimento. Pm: paromomicina. CHX: cicloheximida. Cada barra se corresponde con el valor medio del número de copias/ μl \pm la desviación estándar y se calcula a partir de los valores C_t obtenidos en al menos cuatro experimentos independientes de PCR cuantitativa utilizando la ecuación: $C_t = \text{pendiente} \times \log(\text{número de copias}/\mu\text{l}) + y\text{-intercept}$. Estos valores se recogen en la Tabla A10 del Anexo I. Los asteriscos indican la existencia de diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,01$) respecto a la muestra de la cepa control SB1969. Con una línea discontinua (próxima al valor 1) se señala el umbral definido por las cepas usadas con controles.

C.5. Aislamiento y caracterización de dos nuevas isoformas génicas de metalotioneínas (*MTT1a* y *MTT1b*) derivadas por recombinación homóloga a partir del gen *MTT1* en la cepa MTT5KD

En la cepa MTT5KD se detectó un aumento selectivo del número de copias/ μ l del gen *MTT1* ($\approx 2x$ con respecto a la cepa control) (Fig. 53, Tabla A10). Sin embargo, y a diferencia de lo que ocurría en la cepa Cd-ADAP (Fig. 52), en este caso los genes *MTT3* y *CYCLIC* mantenían los mismos niveles que en las cepas control (sin aumentar su número de copias en el macronúcleo) y, por consiguiente, el aumento del número de copias del gen *MTT1* no podía explicarse por procesos de amplificación diferencial de un subfragmento cromosómico completo, tal y como ocurría en la cepa Cd-ADAP (Fig. 52).

Con el fin de intentar dilucidar el origen de este mayor número de copias que afecta exclusivamente al gen *MTT1* en la cepa MTT5KD, se amplificó mediante una PCR estándar el ORF completo de este gen y los resultados se analizaron en una electroforesis estándar de ADN (Fig. 54). Como se puede apreciar en la Fig. 54, además de la banda correspondiente al gen *MTT1* original (489 pb), se detectaron al menos dos bandas más, correspondientes a amplicones más cortos y menos abundantes (Fig. 54). Estas dos nuevas bandas fueron extraídas del gel, clonadas y secuenciadas. Tras su secuenciación se comprobó que se correspondían con dos nuevas isoformas génicas (que hemos denominado como *MTT1a* y *MTT1b*) derivadas por recombinación homóloga del gen original *MTT1* en la cepa MTT5KD. El nuevo gen *MTT1a* tiene una longitud de 321 pb (ha perdido 168 pb del gen *MTT1* original) y el nuevo gen *MTT1b* tiene sólo 150 pb, por lo que ha perdido 339 pb con respecto al gen original, aproximadamente el doble que el gen *MTT1a*.

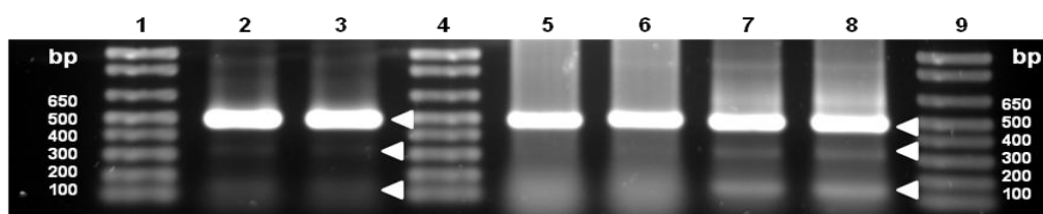


Fig. 54. Electroforesis en gel de agarosa de los amplicones obtenidos a partir del gen *MTT1* en diferentes cepas. 1, 4 y 9: Marcador de tamaño *1Kb Plus DNA Ladder* (Life Technologies). 2 y 3: Amplicones obtenidos a partir ADN genómico de la cepa MTT5KD. 5: Amplicones obtenidos a partir de muestras de ADNc de la cepa SB1969 (control). 6: Amplicones obtenidos a partir de muestras de ADNc de la cepa MTT5KD (aisladas en ausencia de metal). 7 y 8: Amplicones obtenidos a partir de muestras de ADNc extraídas de la cepa MTT5KD (tras tratamientos de 1h con Cd^{2+} 44,5 y 50 μ M, respectivamente). Las flechas indican las bandas correspondientes a los ORFs de los genes *MTT1* original (489 pb), *MTT1a* (321 pb) y *MTT1b* (150 pb); estos dos últimos únicamente se pueden detectar en los pocillos 2, 3, 7 y 8.

Estas dos nuevas isoformas, o versiones más cortas de la *MTT1*, muestran un 100% de identidad en sus secuencias aminoacídicas con la *MTT1* original, así como un 84% (*MTT1a*) y un 86% (*MTT1b*) de identidad con la *MTT3*, respectivamente (Fig. 55). Esto también se pone de manifiesto en el árbol filogenético construido con las secuencias aminoacídicas inferidas de

estos genes, donde se muestra una total identidad entre estas dos nuevas isoformas y la MTT1 original (Fig. 56).

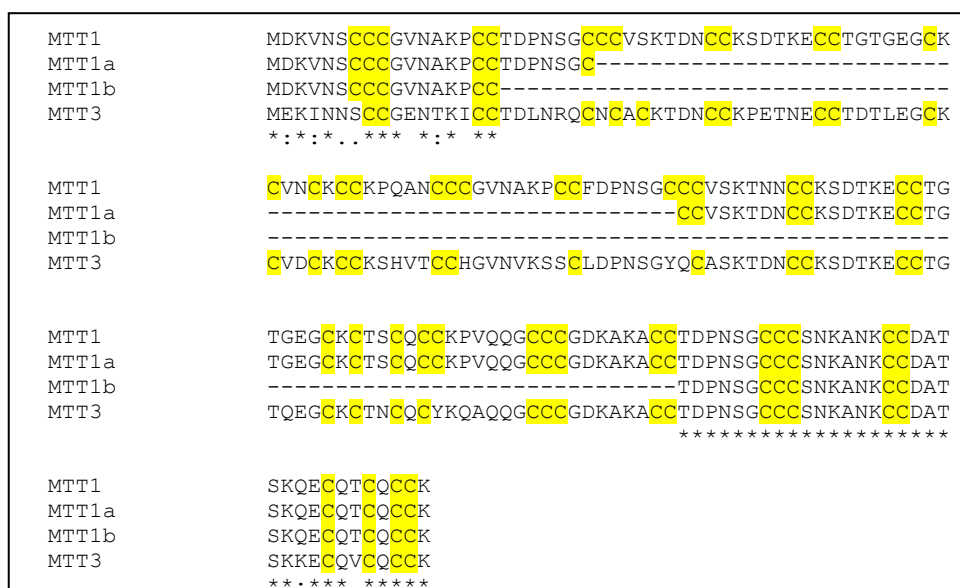


Fig. 55. Alineamiento múltiple de las secuencias aminoacídicas de las CdMTs MTT1, MTT1a, MTT1b (nuevas isoformas en la cepa MTT5KD) y MTT3. Los residuos de cisteína aparecen sombreados en amarillo.

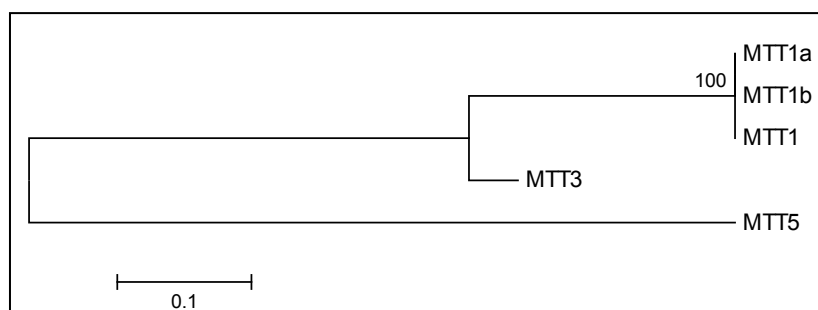


Fig. 56. Árbol filogenético de las CdMTs descritas en *T. thermophila*, incluyendo las dos nuevas isoformas (MTT1a y MTT1b) encontradas en la cepa MTT5KD. Este árbol se construyó con el programa MEGA 5.01 utilizando el método de máxima verosimilitud. La longitud de cada rama sigue la escala indicada.

Por último, con el fin de determinar si estas dos nuevas isoformas génicas eran realmente funcionales en la cepa MTT5KD y, por tanto, se expresaban ante una situación de estrés, se trataron varios cultivos con Cd^{2+} (44,5 y 50 μM) durante 1h, se extrajeron las muestras de ARN total y se obtuvieron los ADNc correspondientes a estas dos nuevas isoformas de *MTT1* (Fig.54). Así se corroboró que estas dos nuevas isoformas de MTs no sólo aparecían de manera exclusiva en el genoma de la cepa MTT5KD sino que, en condiciones de estrés por Cd^{2+} , éstas eran capaces de expresarse y, por tanto, eran funcionales. Las secuencias de los ADNc de las nuevas isoformas (incluyendo sus regiones 3'UTRs) se muestran en el Anexo II y sus números de acceso de la base de datos *GenBank* se recogen en la Tabla A2 del Anexo I.

D.- FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN DEL TIPO AP-1 (bZIP) COMO POSIBLES REGULADORES DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DE LAS MTs DE *Tetrahymena thermophila*

D.1. Identificación y caracterización estructural de los factores de transcripción del tipo AP-1 localizados en el genoma de diferentes especies de *Tetrahymena*

El genoma macronuclear de *T. thermophila* presenta cuatro genes identificados como codificantes de cuatro factores de transcripción pertenecientes a la superfamilia bZIP. Estos genes han sido denominados *TthebZIP1*, *TthebZIP2*, *TthebZIP3* y *TthebZIP4* (Tabla 29). Además, hemos buscado genes ortólogos a estos genes bZIP de *T. thermophila* en los genomas macronucleares de *T. borealis*, *T. elliotti* y *T. malaccensis* (recientemente secuenciados) y hemos podido identificar cuatro posibles factores de transcripción del tipo AP-1 en cada una de estas tres especies de *Tetrahymena*. Las principales características de estos factores de transcripción y sus números de acceso en la base de datos de *Tetrahymena* (*Tetrahymena Genome Database Wiki*: <http://ciliate.org>) aparecen recogidos en la Tabla 29.

El análisis comparativo de estos genes nos muestra que cada gen identificado en *T. thermophila* parece tener su ortólogo en las otras tres especies, presentando características comunes entre sí. Todos estos genes presentan intrones en un número variable, desde sólo 2 (como en el caso de *TthebZIP2*, *TborbZIP3*, *TmalabZIP2* y *TellibZIP2*) hasta 11 (*TthebZIP3*, *TborbZIP4*, *TmalabZIP3* y *TellibZIP3*) (Tabla 29). Las proteínas presentan tamaños comprendidos entre 500 y 746 aa y, en cada una de las especies analizadas, se distinguen dos proteínas de menor tamaño (\approx 500-550 aa) y otras dos de mayor tamaño (\approx 700-746 aa) (Tabla 29).

Las proteínas pertenecientes a la superfamilia bZIP (*Basic leucine zipper*) se caracterizan por presentar un dominio característico formado por una región rica en aminoácidos básicos (región básica) y un motivo denominado "cremallera de leucina". En general, pocos residuos se conservan de manera estricta en las regiones básicas. Sin embargo, las cremalleras de leucina sí suelen tener un patrón más conservado y normalmente están compuestas por cuatro o más residuos de leucina que se repiten cada 6 aminoácidos (Hurst, 1995). A partir del análisis *in silico* llevado a cabo con estos 16 genes, se observa que todas las secuencias aminoacídicas inferidas presentan el dominio bZIP, similar al identificado en las secuencias de otros factores bZIP descritos en algunos organismos modelo, tales como: *H. sapiens*, *C. elegans*, *M. musculus* o *R. norvegicus* (Fig. 57).

Algunas de las secuencias analizadas, tales como *TthebZIP2*, *TborbZIP3*, *TmalabZIP2* o *TellibZIP2*, presentan repeticiones de leucina (L) distribuidas de manera muy estricta en su dominio bZIP, observándose en total cinco residuos de este aminoácido distribuidos cada 6 aminoácidos de manera exacta (Fig. 57). Esto también se cumple en algunas de las secuencias de factores bZIP descritas en especies modelo, como son: *HsapFOS*, *MmusJUN-B* o *RnorATF3* (Fig. 57). Sin embargo, en otros casos este patrón de leucinas no está tan conservado y algunos residuos no aparecen en la misma posición o son sustituidos por otros aminoácidos alifáticos como valina, alanina o isoleucina, formando una conformación más flexible. Esto último también ocurre en los factores de transcripción bZIP *FOS1* y *JUN-1B* descritos en el nematodo

C. elegans, así como en la mayoría de los factores de transcripción encontrados en las cuatro especies de *Tetrahymena* (Fig. 57).

Tabla 29. Características estructurales de los genes bZIP presentes en el genoma de diferentes especies del género *Tetrahymena*

Especie	Nombre del gen	Nº de acceso	Longitud total del gen (pb)	Longitud del ORF (pb)	Longitud de la proteína (aa)	MM (KDa)
<i>T. thermophila</i>	TthebZIP1	TTHERM_00442410	3.494 (6 Ex; 5 In)	1.755	584	66,9
	TthebZIP2	TTHERM_00245720	1.975 (3 Ex; 2 In)	1.524	507	59,3
	TthebZIP3	TTHERM_00442930	3.242 (12 Ex; 11 In)	2.199	732	84,2
	TthebZIP4	TTHERM_00349090	2.868 (8 Ex; 7 In)	2.181	726	84,6
<i>T. borealis</i>	TborbZIP1	EI9_12572.1	3.475 (6 Ex; 5 In)	1.788	595	68,1
	TborbZIP3	EI9_00516.1	2.138 (3 Ex; 2 In)	1.566	521	60,7
	TborbZIP4	EI9_12630.1	3.481 (12 Ex; 11 In)	2.241	746	85,7
	TborbZIP2	EI9_09817.1	2.986 (8 Ex; 7 In)	2.205	734	85,1
<i>T. malaccensis</i>	TmalabZIP1	EIA_12351.1	3.492 (6 Ex; 5 In)	1.761	586	67,1
	TmalabZIP2	EIA_03662.1	1.901 (3 Ex; 2 In)	1.506	501	58,4
	TmalabZIP3	EIA_12297.1	3.154 (12 Ex; 11 In)	2.208	735	84,4
	TmalabZIP4	EIA_09172.1	2.862 (8 Ex; 7 In)	2.184	727	84,6
<i>T. ellioti</i>	TellibZIP1	EI7_15490.1	3.386 (6 Ex; 5 In)	1.767	588	67,6
	TellibZIP2	EI7_01112.1	1.969 (3 Ex; 2 In)	1.536	511	59,8
	TellibZIP3	EI7_15548.1	3.081 (12 Ex; 11In)	2.202	733	84,3
	TellibZIP4	EI7_14928.1	2.869 (8 Ex; 7 In)	2.190	729	85,1

Los números de acceso se corresponden a los obtenidos de la base de datos del genoma de *Tetrahymena* (*Tetrahymena Genome Database Wiki*). pb: pares de bases. Ex: exones. In: intrones. MM: masa molecular de la proteína (KDa). Los diferentes colores indican el homólogo correspondiente presente en cada especie de *Tetrahymena*.

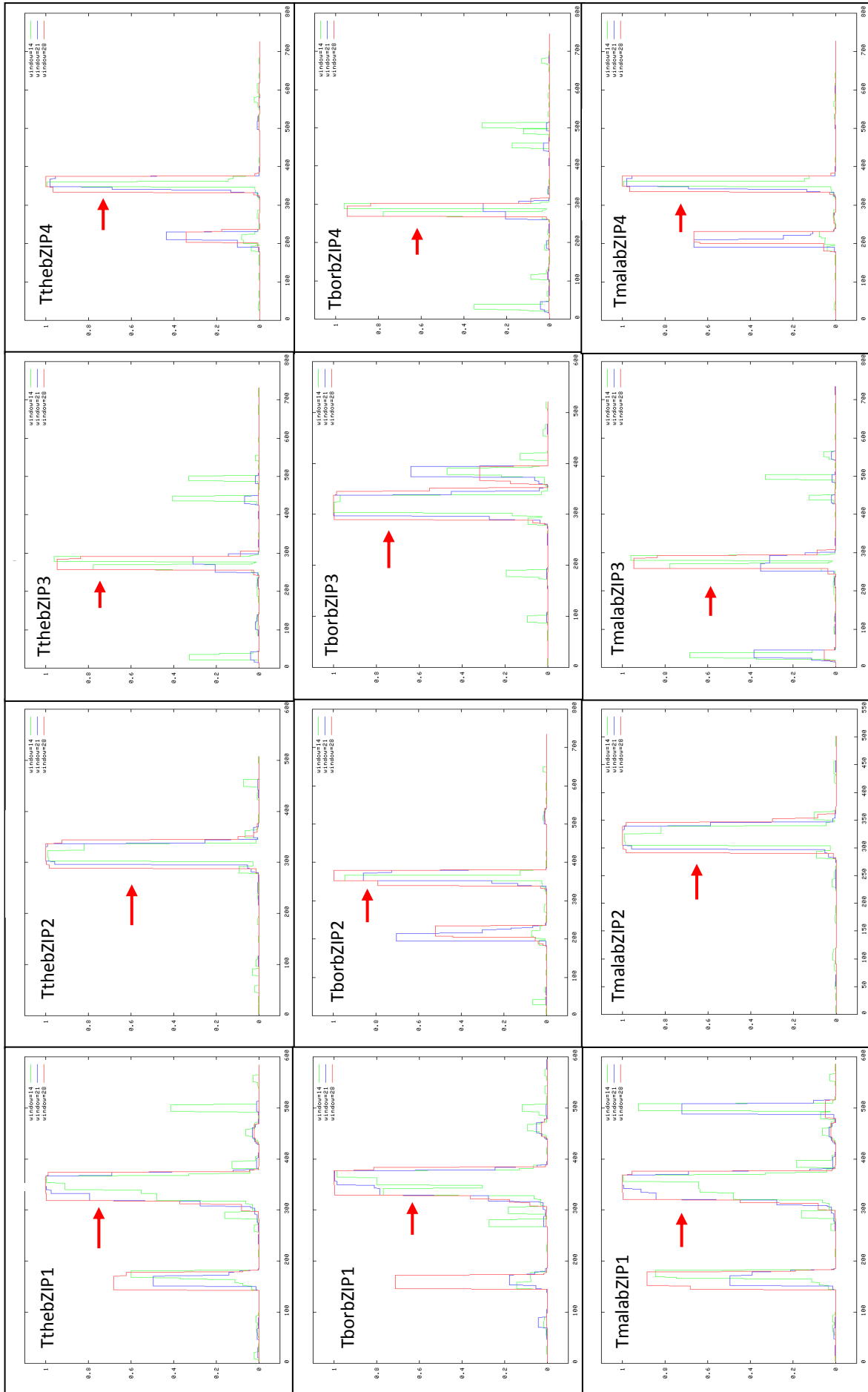
Tabla 30. Identificación de auténticas cremalleras de leucina y de otros motivos posiblemente relacionados con la dimerización y la formación de estructuras *coiled-coil* mediante los programas *2ZIP Server* y *COILS Server*

Especie	Nombre del factor bZIP	Presencia de auténticas cremallera de leucina ⁽¹⁾	Localización (aa)	Zona de posible dimerización ⁽²⁾	Localización (aa)
<i>T. thermophila</i>	TthebZIP1	NO	-	SI (2)	144-178 319-374*
	TthebZIP2	SI (1)	306-334	SI (1)	288-344
	TthebZIP3	NO	-	SI (1)	257-291
	TthebZIP4	NO	-	SI (1)	334-375
<i>T. borealis</i>	TborbZIP1	NO	-	SI (2)	146-173 329-384*
	TborbZIP2	NO	-	SI (2)	208-235 339-380*
	TborbZIP3	SI (1)	307-335	SI (1)	290-352
	TborbZIP4	NO	-	SI (1)	268-302
<i>T. malaccensis</i>	TmalabZIP1	NO	-	SI (2)	145-179 321-376*
	TmalabZIP2	SI (1)	308-343	SI (1)	291-346
	TmalabZIP3	NO	-	SI (1)	259-293
	TmalabZIP4	NO	-	SI (2)	201-231 335-376*
<i>T. ellioti</i>	TellibZIP1	NO	-	SI (1)	322-377
	TellibZIP2	SI (1)	311-339	SI (1)	294-349
	TellibZIP3	NO	-	SI (1)	243-291
	TellibZIP4	NO	-	SI (2)	201-231 335-376*
<i>H. sapiens</i>	HsapFOS	SI (1)	165-193	SI (1)	151-193
<i>C. elegans</i>	CeleFOS-1	NO	-	SI (1)	188-236
	CeleJUN-1B	NO	-	SI (1)	243-277
<i>M. musculus</i>	MmusJUN-B	SI (1)	293-321	SI (1)	263-324
<i>R. norvegicus</i>	RnorATF3	SI (1)	114-142	SI (1)	84-145

⁽¹⁾ El programa *2ZIP Server* identifica como auténticas cremalleras de leucina sólo aquellos motivos que presentan un patrón estricto para este aminoácido. Se indica entre paréntesis el número de posibles cremalleras de leucina que presenta cada secuencia y su localización. ⁽²⁾ En aquellas secuencias en que el patrón de Leu es menos estricto, el programa *2ZIP Server* identifica posibles zonas de dimerización o de formación de estructuras del tipo *coiled-coil*. Se indica entre paréntesis el número de estos motivos para cada secuencia y su localización. En los casos en que sí se identifican auténticas cremalleras de leucina, éstas se definen igualmente dentro de una posible zona de dimerización. Por otro lado, el programa *COILS* identifica todas las posibles regiones que pueden formar estructuras del tipo *coiled-coil* en general. Con un asterisco se señalan los motivos que con una mayor probabilidad se corresponden con zonas de posible dimerización según el programa *COILS* y corroboradas por el alineamiento múltiple realizado (Fig. 57).

Por otro lado, mediante el programa *PSIPRED* se analizó la estructura secundaria de las secuencias aminoacídicas de todos los nuevos factores bZIP considerados en este estudio y se observó que todos ellos presentan una estructura en α -hélice en sus hipotéticos motivos bZIP (Fig. 59).

Resultados



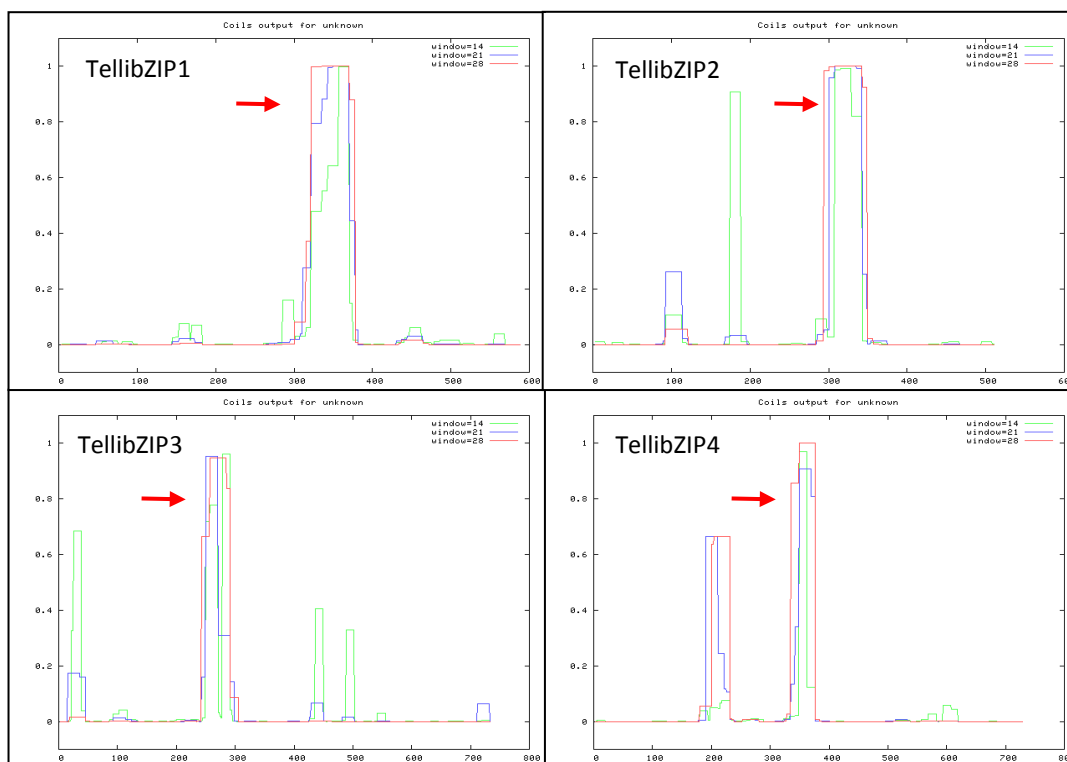


Fig. 58. Representación gráfica de los resultados obtenidos con el programa informático *COILS* sobre las posibles regiones implicadas en la formación de estructuras *coiled-coil* para todos los posibles factores de transcripción bZIP identificados en las cuatro especies de *Tetrahymena*. Cada gráfico muestra las regiones de cada secuencia aminoacídica capaces de interactuar con otra proteína (monómero) bZIP para formar estructuras del tipo *coiled-coil* y la probabilidad de que estas regiones se correspondan con zonas de dimerización. Con una flecha roja se indican las regiones que presentan una mayor probabilidad para dimerizar y formar estructuras *coiled-coil*. Tthe: *T. thermophila*; Tbor: *T. borealis*; Tmala: *T. malaccensis*; Telli: *T. ellioti*.

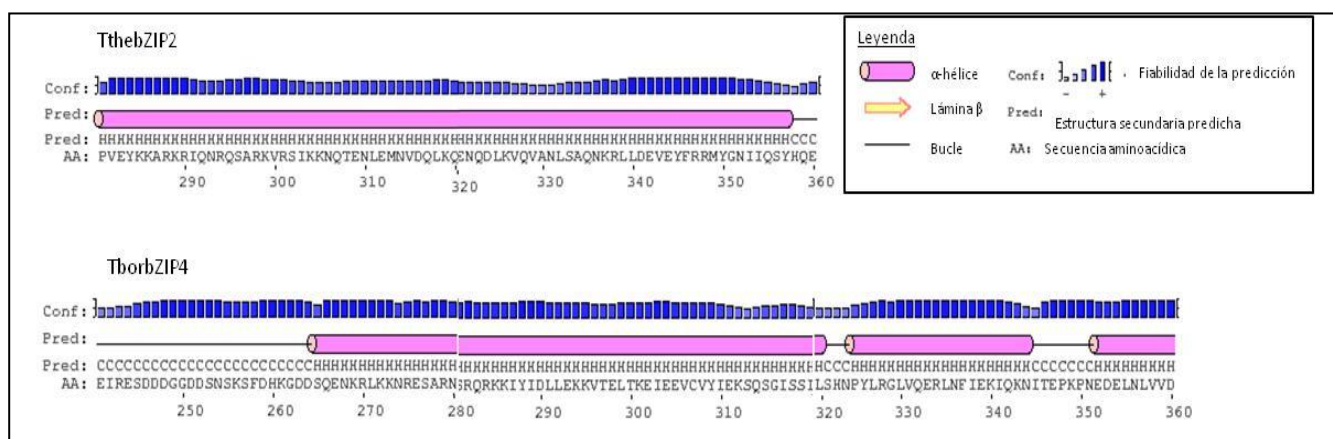
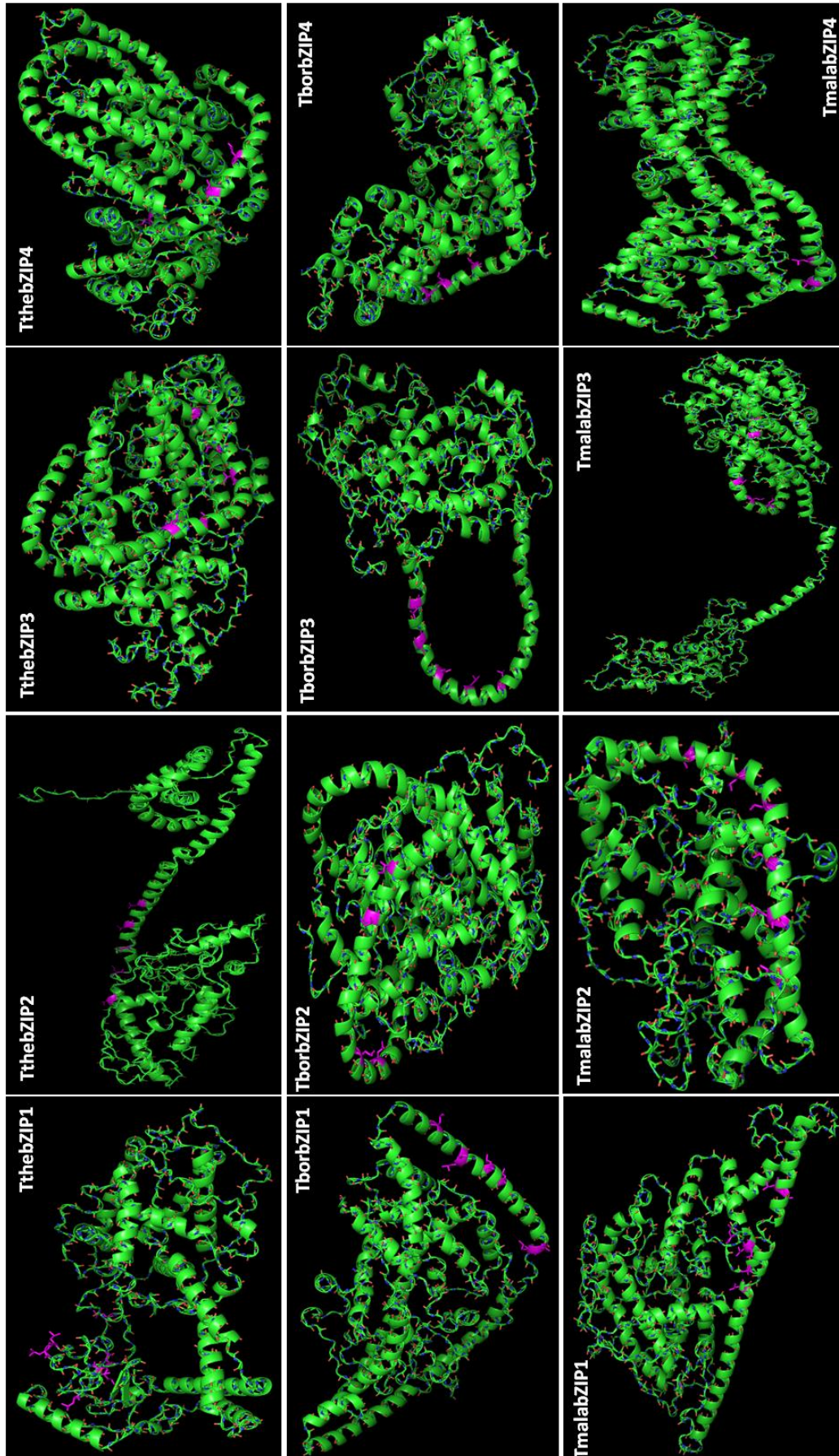


Fig. 59. Ejemplos de las estructuras secundarias obtenidas con el programa *PSIPRED*, inferidas a partir de las secuencias aminoacídicas de cada uno de los factores de transcripción AP-1. Aquí solo se muestran las estructuras correspondientes a los motivos bZIP de las proteínas TthebZIP2 y TborbZIP4. Los cilindros rosas indican la posición de las α -hélices y las barras azules el nivel de confianza de la predicción (véase la leyenda).



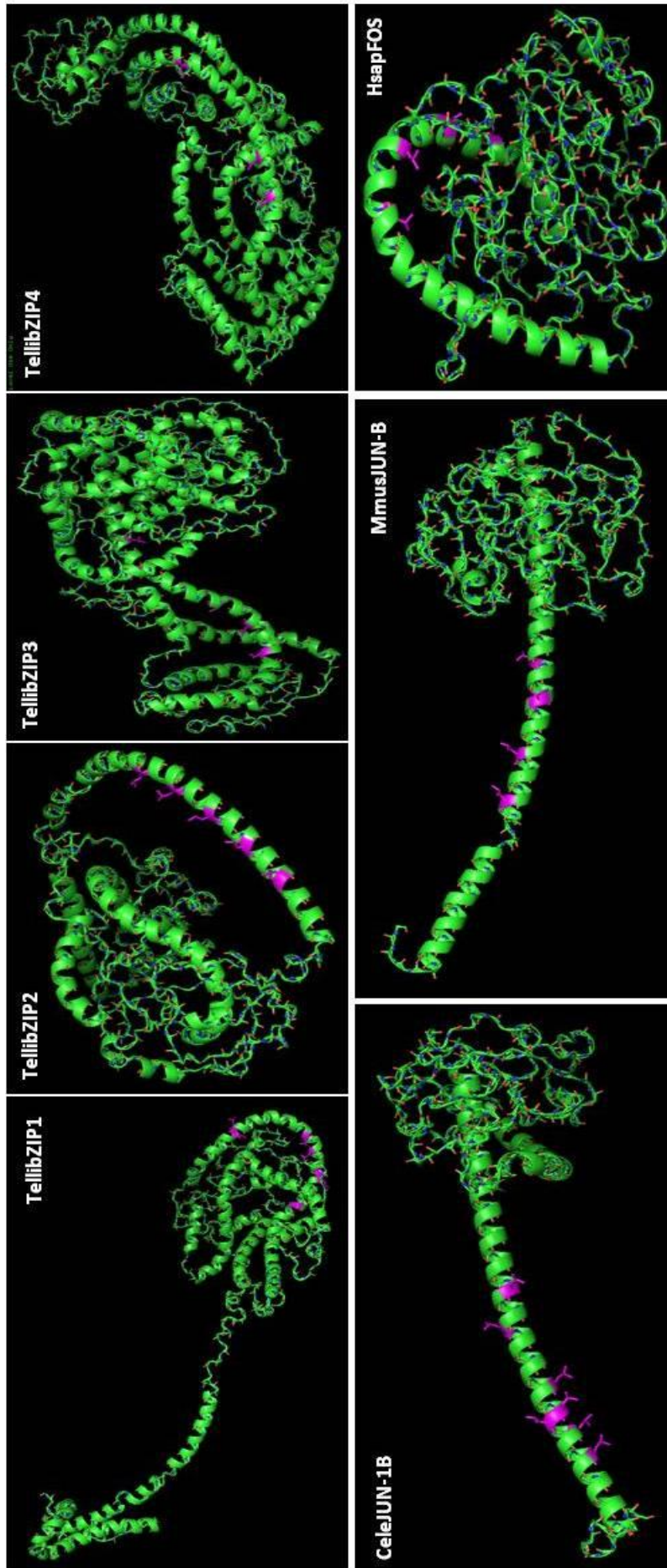


Fig. 60. Estructuras tridimensionales obtenidas con el programa *Phyre2* (modo intensivo) a partir de las secuencias aminoacídicas de los factores de transcripción bZIP descritos en las cuatro especies de *Tetrahymena* analizadas, así como de algunos factores bZIP conocidos de otras especies modelo. En morado se señalan los residuos de leucina que constituyen las cremalleras de leucina. Tbor: *T. borealis*. Telli: *T. ellioti*. Tmala: *T. malaccensis*. Tthe: *T. thermophila*. Cele: *C. elegans*. Mmus: *M. musculus*. Hsap: *H. sapiens*.

Resultados

Mediante el programa informático *Phyre2* se pudieron predecir las estructuras tridimensionales (3D) de estas proteínas bZIP. Este programa compara las secuencias aminoacídicas de las nuevas proteínas con las de otras proteínas cuya estructura 3D se ha dilucidado previamente por difracción de rayos X o por resonancia magnética nuclear y con las que presentan cierta homología. Actualmente, se conocen muy pocas estructuras 3D de factores de transcripción del tipo bZIP obtenidas experimentalmente y, por lo tanto, muy pocas de estas proteínas fueron modeladas con una elevada precisión (superior al 90%).

De las proteínas TmalabZIP1, CeleJUN-1B y MmusJUn-B sólo se modelaron con una gran precisión el 14%, 25% y 28% de sus cadenas aminoacídicas respectivamente. En las demás proteínas, las estructuras inferidas por el programa no garantizan para ninguno de sus aminoácidos (0%) una gran precisión en la obtención de sus hipotéticas estructuras 3D. A pesar de ello, a partir de las estructuras obtenidas por el programa, se observa que estas proteínas presentan una estructura más o menos globular, disponiéndose los motivos bZIP en una región con configuración en α -hélice (tal y como se había predicho con el programa *PSIPRED*). Además, en general, esta estructura en α -hélice está expuesta en la superficie de la proteína (Fig. 60) tal y como se observa claramente en el caso de los factores TborbZIP1, TborbZIP2, TborbZIP3, TborbZIP4, TellibZIP1, TellibZIP2, TmalabZIP2, TmalabZIP4, TthebZIP2 o HsapFOS; igualmente los residuos de leucina (en morado) tienden a situarse en la misma posición rotacional (Figs. 60 y 61).

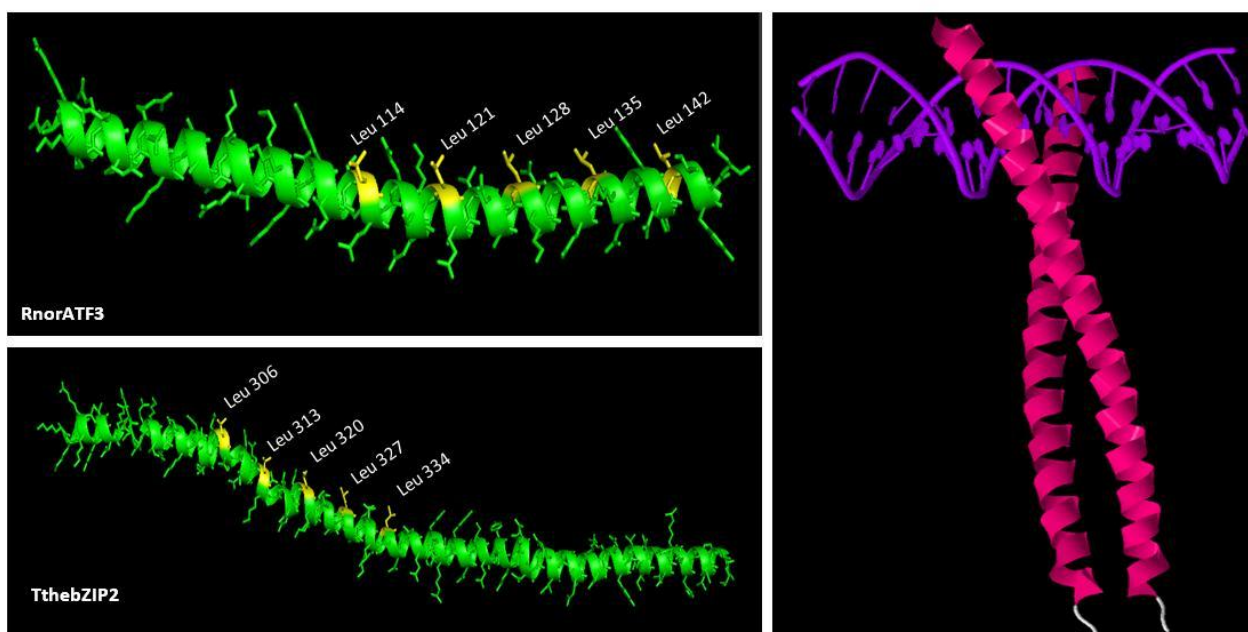


Fig. 61. Estructura en α -hélice de los motivos bZIP de los factores de transcripción del tipo AP-1. **(A y B):** Estructuras en α -hélice correspondientes a los motivos bZIP de los factores de transcripción RnorATF3 **(A)** y TthebZIP2 **(B)**. En amarillo se muestran los residuos de leucina (Leu) que forman parte de la cremallera de leucina y su posición respecto a la secuencia aminoacídica total, todos estos residuos se disponen en la misma posición rotacional. **(C):** Homodímero formado por la unión de dos monómeros del factor de transcripción JUN (Número de acceso del *Protein Data Bank* (PDB): 2H7H), que se asocia a una molécula de ADN para regular su expresión a nivel transcripcional.

En otros casos, estas proteínas parecen presentar una estructura compuesta por uno o dos dominios globulares de desigual tamaño conectados por una α -hélice, tal y como se observa en los factores TellibZIP1, TmalabZIP3, TthebZIP2, CeleJUN-1B o MmusJUN-B. En estos tres últimos ejemplos, el motivo bZIP se localiza en la α -hélice que conecta los dos motivos globulares (Fig. 60).

Por otro lado, las cremalleras de leucina también se relacionan con la capacidad de estas proteínas para formar homo- o heterodímeros con otras proteínas (monómeros) de esta misma familia bZIP, dando lugar a las estructuras del tipo *coiled-coil*. En la Fig. 61C podemos observar el homodímero compuesto por la unión de dos proteínas JUN (Número de acceso del *Protein Data Bank* (PDB): 2H7H), que se asocian entre sí a través de sus cremalleras de leucina. Las formas diméricas son capaces de interactuar con las moléculas de ADN a través de sus regiones básicas (Fig. 57), participando en los procesos de regulación de la expresión génica a nivel transcripcional.

Mediante el programa informático *bZIP coiled-coil scoring form* (Fong *et al.*, 2004) se pueden predecir las interacciones más probables entre las regiones *coiled-coil* de los diferentes factores de la familia bZIP y, así, establecer mediante un estudio *in silico* la probabilidad para cada factor bZIP de formar homo- o heterodímeros. En la Tabla 31 se muestran las puntuaciones obtenidas en cada una de las especies de *Tetrahymena* analizadas para todas las posibles interacciones entre los motivos bZIP de los cuatro posibles factores de transcripción. Es importante tener en cuenta que cuanto mayor es la puntuación obtenida por el programa, más probable es una determinada interacción y, por tanto, la formación de homo- o heterodímeros. Los valores negativos son considerados como interacciones no óptimas.

En todas las especies de *Tetrahymena* analizadas se establece preferentemente la formación de homodímeros frente a la formación de heterodímeros (Tabla 31), principalmente para los factores denominados como bZIP1, bZIP2 y bZIP3. Por otro lado, los factores bZIP4 pueden formar tanto homodímeros como heterodímeros en cualquiera de las especies de *Tetrahymena* (Tabla 31). Por ejemplo, el factor bZIP4 de *T. thermophila* tiene una mayor probabilidad de formar un heterodímero con el factor bZIP3 que un homodímero consigo mismo. En las especies *T. ellioti* y *T. malaccensis* ocurre algo similar, ya que sus factores bZIP4 tienen una mayor probabilidad de formar un heterodímero con el factor bZIP3 correspondiente que de constituir un homodímero consigo mismos (Tabla 31). Sin embargo, el factor bZIP4 de *T. borealis* tiene una mayor probabilidad de formar homodímeros consigo mismo que con el factor bZIP2 de la misma especie. De esta forma, dentro de una misma especie se podrían formar los siguientes heterodímeros: TthebZIP3-TthebZIP4, TborbZIP2-TborbZIP4, TellibZIP3-TellibZIP4 o TmalabZIP3-TmalabZIP4 (Tabla 31). Por el contrario, algunos factores parecen no presentar un motivo bZIP óptimo para la interacción con otros factores diferentes, como es el caso de TthebZIP2, TborbZIP3, TellibZIP1, TellibZIP2 o TmalabZIP2, a los que el programa asigna puntuaciones negativas o muy bajas al enfrentarlos con los motivos bZIP de las otras tres isoformas descritas (Tabla 31). Finalmente, observamos que los valores más negativos los muestra, en casi todos los casos, el factor bZIP1 (independiente de la especie de *Tetrahymena*), confirmando así su predisposición preferente a formar homodímeros consigo mismo (Tabla 31).

Resultados

Tabla 31. Puntuaciones obtenidas con el programa *bZIP coiled-coil scoring form* para definir las interacciones más probables entre los diferentes factores de transcripción bZIP (formas monómericas) analizados en este trabajo

<i>T. thermophila</i>				
Interacción	TthebZIP1	TthebZIP2	TthebZIP3	TthebZIP4
TthebZIP1	43,89			
TthebZIP2	-15,82	32,64		
TthebZIP3	10,38	-7,16	29,32	
TthebZIP4	8,63	0,25	23,14	20,33
<i>T. borealis</i>				
Interacción	TborbZIP1	TborbZIP2	TborbZIP3	TborbZIP4
TborbZIP1	47,90			
TborbZIP2	9,93	23,57		
TborbZIP3	-13,96	8,01	23,72	
TborbZIP4	11,67	23,20	-4,52	29,32
<i>T. ellioti</i>				
Interacción	TellibZIP1	TellibZIP2	TellibZIP3	TellibZIP4
TellibZIP1	43,89			
TellibZIP2	-16,82	32,64		
TellibZIP3	-1,56	-7,16	29,32	
TellibZIP4	8,63	0,25	23,14	20,33
<i>T. malaccensis</i>				
Interacción	TmalabZIP1	TmalabZIP2	TmalabZIP3	TmalabZIP4
TmalabZIP1	43,89			
TmalabZIP2	-2,97	46,99		
TmalabZIP3	10,32	-2,35	29,32	
TmalabZIP4	8,63	-3,30	23,14	20,33

Se muestran las puntuaciones tanto de la interacción entre dos monómeros idénticos (formación de un homodímero) como de dos monómeros diferentes (formación de un heterodímero). Cuanto mayor sea la puntuación obtenida, más probable es una determinada interacción. Las puntuaciones más elevadas se destacan en rojo. Los valores negativos son identificados por el programa como interacciones no óptimas.

Finalmente, para los cuatro genes codificantes de los factores bZIP descritos en *T. thermophila*, se identificaron mediante el programa *MEME* tres motivos conservados en sus regiones 5'UTRs (potenciales promotores), posiblemente relacionados con la regulación de la expresión de estos genes (Tabla 32). Estos tres motivos conservados presentan las siguientes secuencias consenso:

- Motivo 1: GCT [A/C/T] [G/C] [A/T] CT [T/G] [A/T] [C/G]
- Motivo 2: G [C/G] [C/G] TT [T/C] [C/G] C
- Motivo 3: [C/A] [T/C] C [A/G] A [G/C/A] T [A/C/T] [C/A/T] [A/G] [C/T] C [C/T] [A/C/T] [C/T] [C/T] [A/G] A [A/T] [A/G/T] [C/A/T] T [C/T] [A/T] [G/C/T] A [A/C] [C/A]A

Tabla 32. Motivos presentes en las regiones promotoras (5'UTRs) de los cuatro factores de transcripción AP-1 descritos en *T. thermophila*

Gen AP-1	Motivos identificados en las regiones 5'UTRs			
	Nº de cajas TATA (5'TAATAA3')	Motivo 1 (posición)	Motivo 2 (posición)	Motivo 3 (posición)
<i>TthebZIP1</i>	4	GCTAGACTGAC (-565)	GCGTTTCC (-926)	CTCAACTCACCACCAAAACTCTTACCA (-307)
<i>TthebZIP2</i>	4	GCTTGACTTTG (-776)	-	CTCAAGTATATCTACTGATATTAGACAA (-73)
<i>TthebZIP3</i>	12	GCTACTCTTTC (-2.691)	GGCTTTGC (-1.994)	CCCAAGTCAATCTCCTGATGATCTGAACA (-1.509)
<i>TthebZIP4</i>	8	GCTCGTCTTAC (-857)	GCCTTCCC (-967)	ATCGAATACGCCCTTCAAATCTCACAAACA (-628)

(-): No existente. Se muestran las secuencias y la localización (entre paréntesis) respecto al inicio del ORF de los tres motivos conservados identificados con el programa informático *MEME*. Se sombrea en amarillo los residuos comunes (totalmente conservados) para cada uno de los tres motivos descritos en los cuatro genes AP-1.

Los cuatro genes bZIP tienen un solo motivo de cada uno de los tres tipos identificados. El motivo 2 es el que presenta un mayor porcentaje (50%) de residuos conservados entre las cuatro secuencias, seguido por el motivo 1 (45% de residuos totalmente conservados) y, finalmente, el motivo 3 sólo mantiene idénticos el 28% de sus residuos en los cuatro genes AP-1. El motivo 3 del gen *TthebZIP2* es el que se localiza más cercano (nucleótido -73) al inicio del ORF de todos los motivos identificados en los cuatro genes bZIP (Tabla 32). Al mismo tiempo, el motivo 3 es el más extenso (29 pb) en comparación con los otros dos motivos (el motivo 2 tiene 8 pb y el motivo 3 tiene 11 pb) (Tabla 32). Los motivos más alejados del ORF son los correspondientes al gen *TthebZIP3*. El motivo 2 está ausente en el gen *TthebZIP2*, que a su vez es el que tiene un mayor número de cajas TATA (Tabla 32). Estos 3 motivos se encuentran más alejados de la región codificante a medida que el gen bZIP presenta un mayor número de cajas TATA en su región promotora. Por lo tanto, los motivos más cercanos al ORF son los de los genes *TthebZIP1* y *TthebZIP2*, con solo 4 cajas TATA (Tabla 32).

D.2. Análisis comparativo de la expresión de los genes codificantes de los cuatro factores de transcripción AP-1 descritos en *T. thermophila*

Hemos comparado los niveles de inducción relativa (calculados mediante RT-PCR cuantitativa) de los genes codificantes de los cuatro factores de transcripción AP-1 descritos en *T. thermophila* (*TthebZIP1*, *TthebZIP2*, *TthebZIP3* y *TthebZIP4*), tras el tratamiento (1 ó 24h) de cultivos celulares con tres metales pesados (Cd^{2+} , Cu^{2+} o Pb^{2+}). El estudio se ha realizado con diferentes cepas: la cepa control SB1969, las tres cepas adaptadas a elevadas concentraciones de metal (Cd-ADAP, Cu-ADAP y Pb-ADAP), las tres cepas *knockout* (KO) y/o *knockdown* (KD) para los genes *MTT1* y/o *MTT5* (MTT1KO, MTT5KD, MTT1KO+MTT5KD) y las dos cepas GFPMTT1 y GFPMTT5 que sobre-expresan los genes *MTT1* o *MTT5* (fusionados con la GFP), respectivamente (Amaro *et al.*, 2014).

Resultados

En las Figs. 62-65 se comparan los niveles de inducción relativa para estos cuatro genes entre las diferentes cepas seleccionadas. Por consenso internacional en lo relativo a la técnica de RT-PCR cuantitativa, se fija un valor mínimo de 2 para considerar positivos los niveles de inducción de la expresión de un gen; por debajo de 2 estos valores no se consideran como inducción positiva, tal y como ocurre con muchos de los resultados obtenidos (Tabla A11 del Anexo I).

El gen *TthebZIP1* se induce principalmente tras el tratamiento con Cd^{2+} (1 ó 24h), destacándose mayores niveles de inducción tras los tratamientos de 24h (Fig. 62). Concretamente, se obtienen mayores niveles de inducción en las cepas MTT5KD, GFPMTT5 y Cd-ADAP. Sin embargo, este gen también se induce en presencia de Pb^{2+} (24h) (como es en el caso de la cepa control SB1969, la cepa GFPMTT5 y la cepa MTT5KD) o incluso tras el tratamiento con Cu^{2+} (24h) (aunque con mucha menor intensidad), como se detecta principalmente en la cepa MTT5KD. De esta forma, el ranking de inducción para este gen es el siguiente: $\text{Cd} > \text{Pb} > \text{Cu}$ (Fig. 62, Tabla A11).

El gen *TthebZIP2* destaca del resto por ser el que, en general, alcanza los mayores niveles de inducción de los cuatro genes codificantes de factores de transcripción del tipo AP-1 en *T. thermophila* (Fig. 63). Al igual que ocurre en el gen *TthebZIP1*, en general, los valores de inducción de este gen son mayores tras los tratamientos de 24h. Destaca enormemente su inducción por Cu^{2+} (24h) en la cepa Cd-ADAP. En el resto de las cepas en que este gen se induce (Cu-ADAP, Pb-ADAP, GFPMTT5, GFPMTT1 y MTT1KO+MTT5KD), se observa una mayor respuesta tras el tratamiento con Cd^{2+} (24h) (Fig. 63, Tabla A11). En la cepa control SB1969 este gen se induce (aunque en menor medida) tras el tratamiento con Pb^{2+} (24h) (Fig. 63).

Por último, los genes *TthebZIP3* (Fig. 64) y *TthebZIP4* (Fig. 65) alcanzan en general menores niveles de inducción (<10x) que los otros dos genes anteriormente mencionados. El gen *TthebZIP3* presenta sus mayores niveles de inducción tras el tratamiento con Cd^{2+} (1 ó 24h), destacándose las cepas Cd-ADAP, Cu-ADAP GFPMTT5, MTT5KD y MTT1KO+MTT5KD y, tras la exposición a Pb^{2+} (24h) principalmente en las cepas control SB1969, MTT5KD y MTT1KO+MTT5KD (Fig. 64, Tabla A11). Igualmente, existe cierta inducción de este gen tras los tratamientos con Cu^{2+} en las cepas Cd-ADAP (1h) y MTT5KD (24h). El gen *TthebZIP4* presenta un patrón de inducción de expresión bastante similar al gen *TthebZIP3* frente al tratamiento con Cd^{2+} pero, a diferencia de éste, el gen *TthebZIP4* también se induce alcanzando niveles moderados tras el tratamiento con Cu^{2+} (1 ó 24h), destacándose las cepas Cd-ADAP, GFPMTT5, control SB1969 y MTT5KD (Fig. 65, Tabla A11).

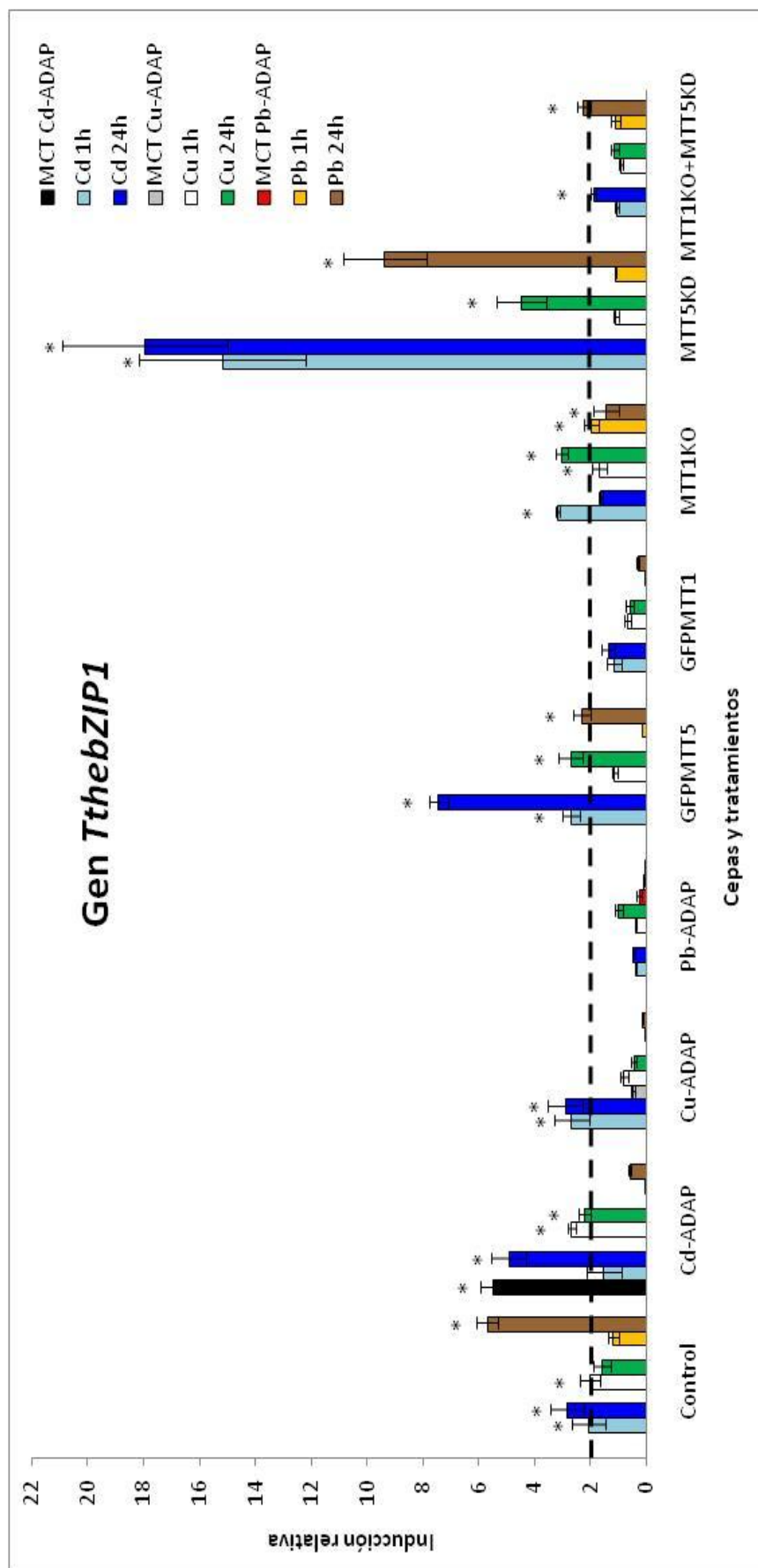


Fig. 62. Comparación de los niveles de inducción del gen *TthebZIP1* tras el tratamiento con Cd^{2+} , Cu^{2+} o Pb^{2+} (1 ó 24h) en diferentes cepas de *T. thermophila*. En el caso de las cepas adaptadas, los tratamientos de 1 ó 24h se hicieron tras mantener las células 24h en ausencia de metal. MCT: máxima concentración tolerada por las cepas adaptadas (Cd^{2+} 115 μM , Cu^{2+} 4 mM y Pb^{2+} 5,5 mM). Las concentraciones de metales así como las condiciones de cada tratamiento se indican en la Tabla 9. Las barras representan los niveles de inducción relativa del gen *TthebZIP1* en cada una de las condiciones ensayadas respecto al cultivo no tratado (valor 1) y normalizados respecto a la expresión del gen β -actina, utilizado como control endógeno. Cada barra se corresponde con el valor medio de inducción relativa para cada tratamiento \pm la desviación estándar calculada a partir de dos o tres experimentos independientes. Los asteriscos indican la existencia de diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) respecto a la muestra control.

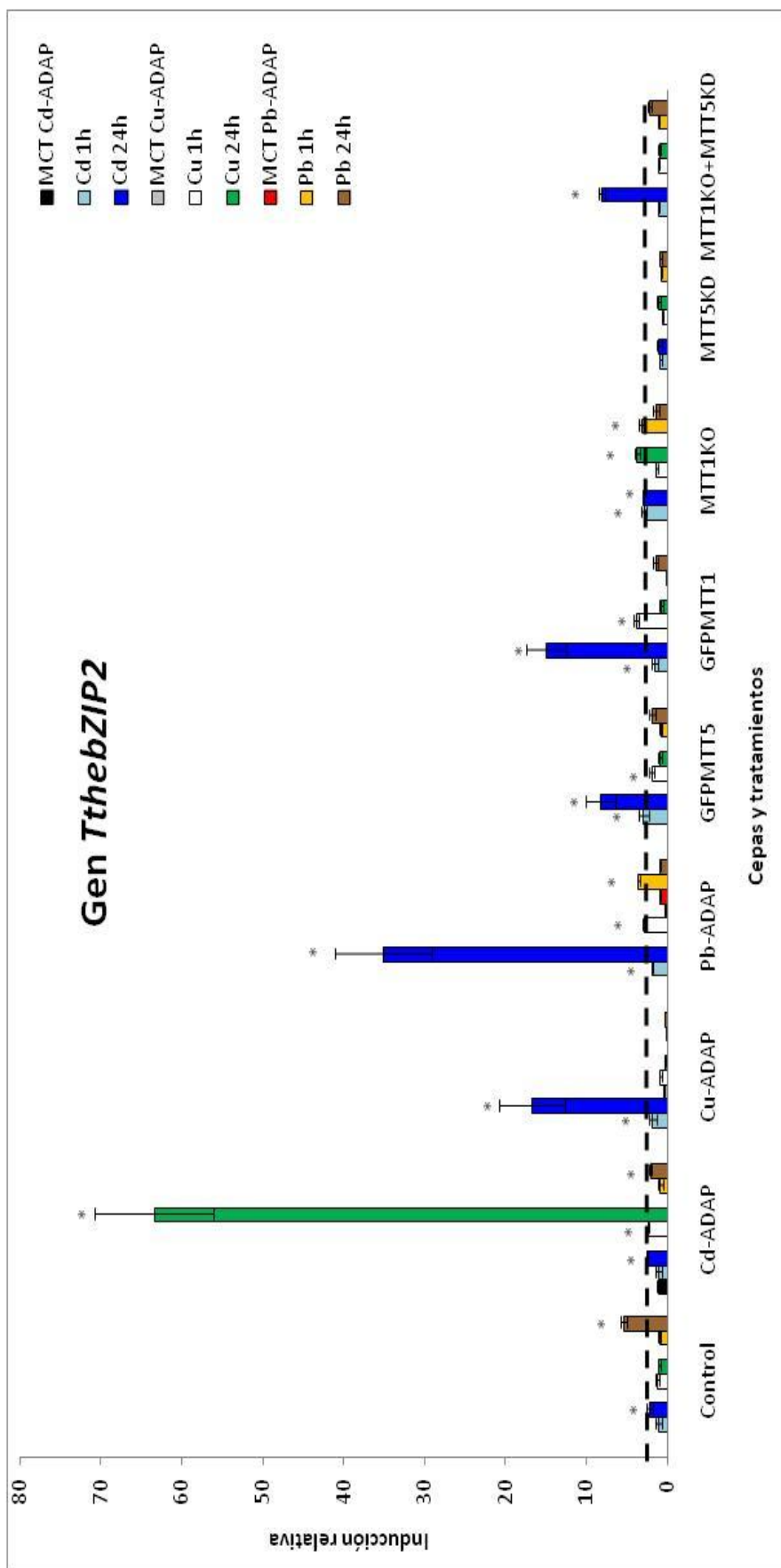


Fig. 63. Comparación de los niveles de inducción del gen *TthebZIP2* tras el tratamiento con Cd^{2+} , Cu^{2+} o Pb^{2+} (1 ó 24h) en diferentes cepas de *T. thermophila*. En el caso de las cepas adaptadas, los tratamientos de 1 ó 24h se hicieron tras mantener las células 24h en ausencia de metal. MCT: máxima concentración tolerada por las cepas adaptadas (Cd^{2+} 115 μ M, Cu^{2+} 4 mM y Pb^{2+} 5,5 mM). Las concentraciones de metales así como las condiciones de cada tratamiento se indican en la Tabla 9. Las barras representan los niveles de inducción relativa del gen *TthebZIP2* en cada una de las condiciones ensayadas respecto al cultivo no tratado (valor 1) y normalizados respecto a la expresión del gen β -actina, utilizado como control endógeno. Cada barra se corresponde con el valor medio de inducción relativa para cada tratamiento \pm la desviación estándar calculada a partir de dos o tres experimentos independientes. Los asteriscos indican la existencia de diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) respecto a la muestra control.

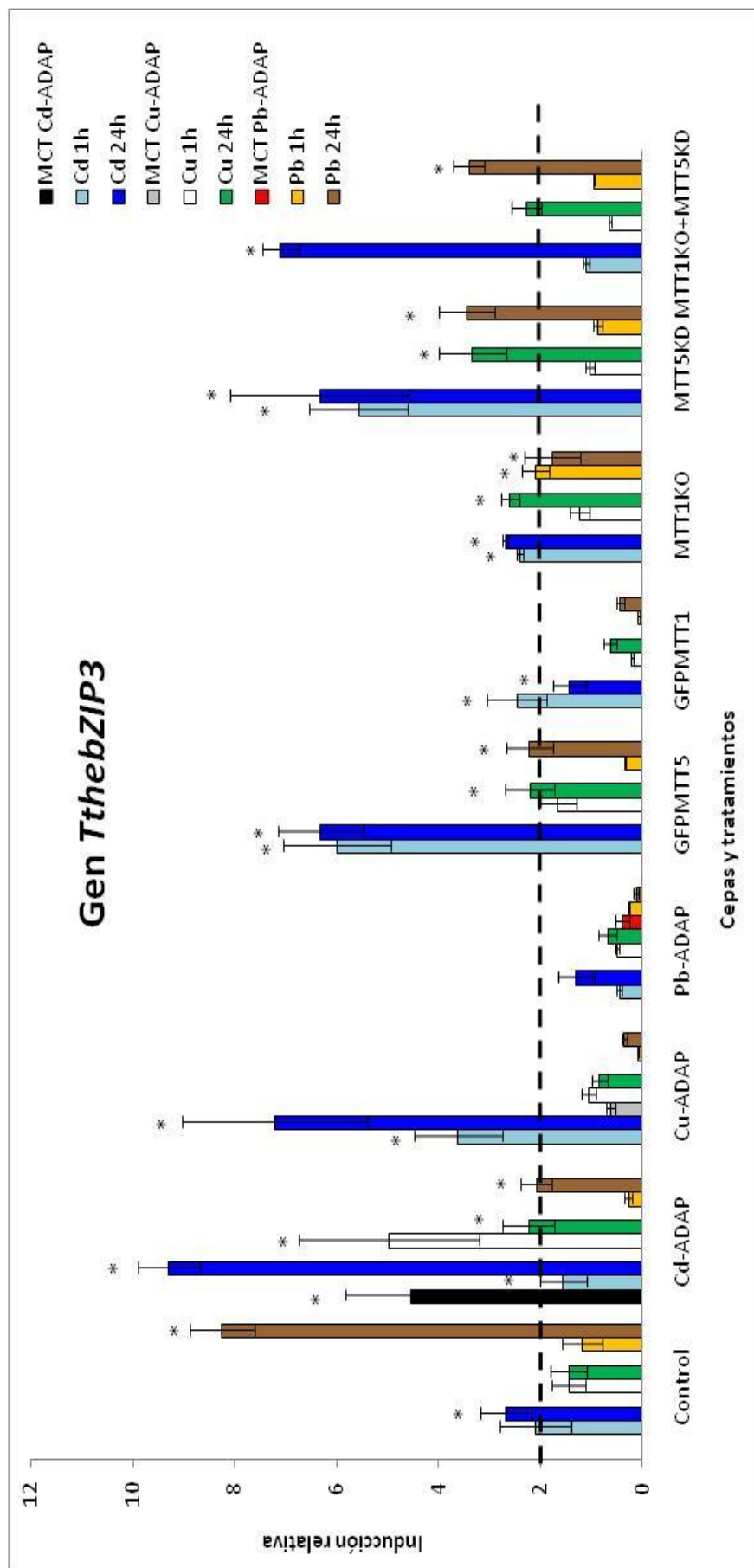


Fig. 64. Comparación de los niveles de inducción del gen *TthebZIP3* tras el tratamiento con Cd^{2+} , Cu^{2+} o Pb^{2+} (1 ó 24h) en diferentes cepas de *T. thermophila*. En el caso de las cepas adaptadas, los tratamientos de 1 ó 24h se hicieron tras mantener las células 24h en ausencia de metal. MCT: máxima concentración tolerada por las cepas adaptadas (Cd^{2+} 115 μM , Cu^{2+} 4 mM y Pb^{2+} 5,5 mM). Las concentraciones de metales así como las condiciones de cada tratamiento se indican en la Tabla 9. Las barras representan los niveles de inducción relativa del gen *TthebZIP3* en cada una de las condiciones ensayadas respecto al cultivo no tratado (valor 1) y normalizados respecto a la expresión del gen β -actina, utilizado como control endógeno. Cada barra se corresponde con el valor medio de inducción relativa para cada tratamiento \pm la desviación estándar calculada a partir de dos o tres experimentos independientes. Los asteriscos indican la existencia de diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) respecto a la muestra control.

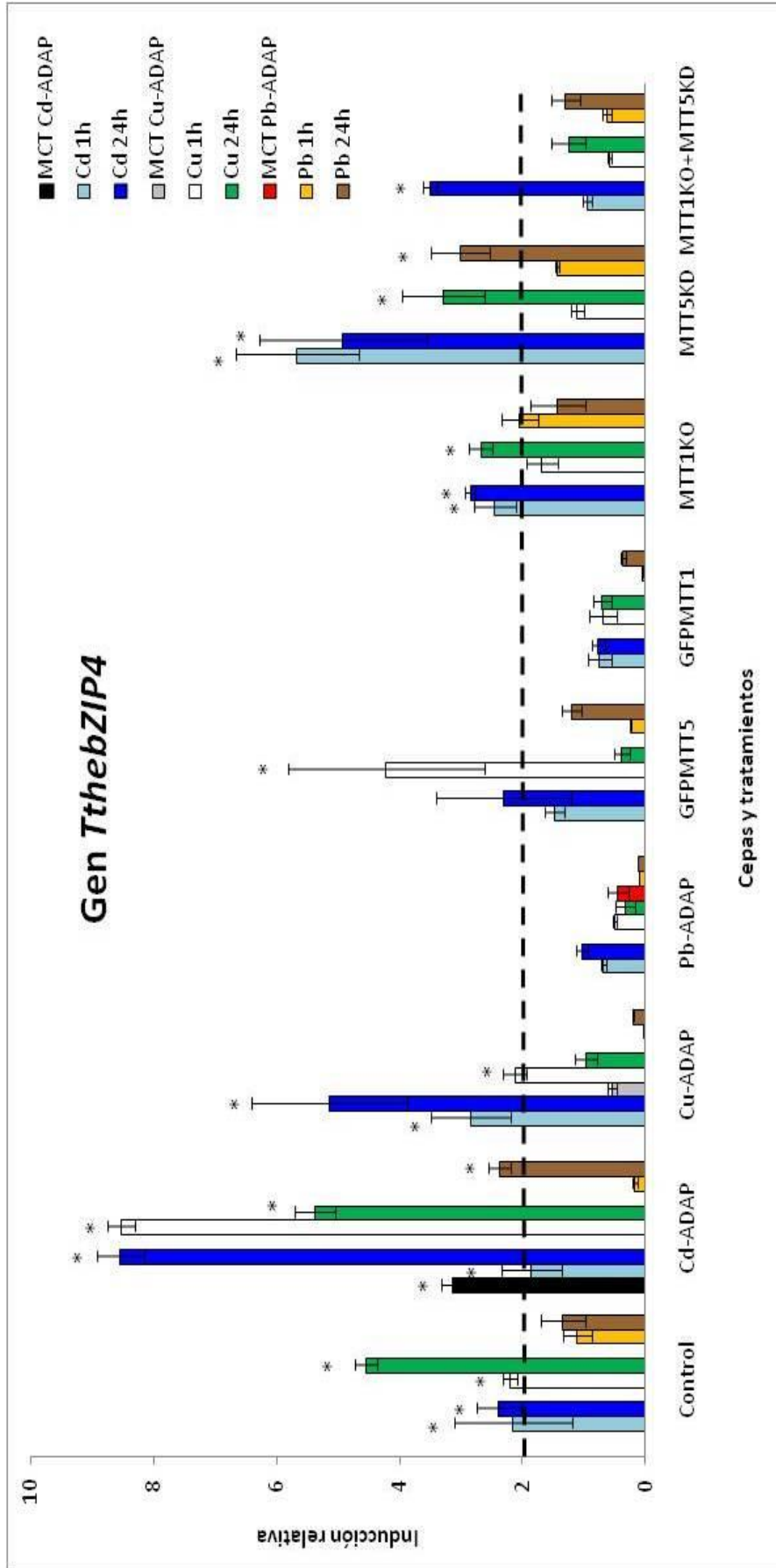


Fig. 65. Comparación de los niveles de inducción del gen *TthebZIP4* tras el tratamiento con Cd^{2+} , Cu^{2+} o Pb^{2+} (1 ó 24h) en diferentes cepas de *T. thermophila*. En el caso de las cepas adaptadas, los tratamientos de 1 ó 24h se hicieron tras mantener las células 24h en ausencia de metal. MCT: máxima concentración tolerada por las cepas adaptadas (Cd^{2+} 115 μM , Cu^{2+} 4 mM y Pb^{2+} 5,5 mM). Las concentraciones de metales así como las condiciones de cada tratamiento se indican en la Tabla 9. Las barras representan los niveles de inducción relativa del gen *TthebZIP4* en cada una de las condiciones ensayadas respecto al cultivo no tratado (valor 1) y normalizados respecto a la expresión del gen β -actina, utilizado como control endógeno. Cada barra se corresponde con el valor medio de inducción relativa para cada tratamiento \pm la desviación estándar calculada a partir de dos o tres experimentos independientes. Los asteriscos indican la existencia de diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) respecto a la muestra control.

Un análisis comparativo de los patrones de inducción tanto bajo el estrés por metales como en condiciones basales (sin metal) se muestra en la Fig. 66, donde, como ya se indicó previamente, solo se han considerado los valores > 2). De este análisis comparativo podemos indicar los siguientes puntos:

- El gen *TthebZIP2* tiende a encontrarse, en la mayoría de las cepas analizadas, en las primeras posiciones (primera o segunda generalmente) de este ranking de los diferentes patrones de inducción de la expresión génica, independientemente del tratamiento aplicado (Fig. 66). Sin embargo, una clara excepción se observa en el caso de la cepa MTT5KD, en la que, tras ninguno de los tratamientos aplicados, se obtienen valores significativos de inducción para este gen (Figs. 63 y 66). En esta misma cepa, por el contrario, destaca el gen *TthebZIP1*, que se sitúa en la primera posición del ranking, manteniéndose el mismo orden ($bZIP1 \geq bZIP3 \geq bZIP4$) en todos los tratamientos (Fig. 66).
- El gen *TthebZIP4* tiende a encontrarse en la última posición del ranking tras los tratamientos con Cd^{2+} o Pb^{2+} como patrón consenso mayoritario, pero adopta una primera o segunda posición tras los tratamientos con Cu^{2+} (Fig. 66).
- Principalmente en las cepas adaptadas a metal, aunque no exclusivamente, se induce un único factor AP-1 de los cuatro posibles como respuesta frente a un estrés por metal. Los factores *TthebZIP2* y *TthebZIP4* son normalmente los que predominan en estos casos de "respuesta única" frente a los genes *TthebZIP1* y *TthebZIP3* (Fig. 66).
- Los genes *TthebZIP1* y *TthebZIP3* presentan un patrón de inducción menos definido, induciéndose en menor medida pero ante casi todas las condiciones de estrés ensayadas. El gen *TthebZIP3* es, en general, el que presenta los mayores niveles de inducción tras los tratamientos con plomo, pudiéndose localizar en el primer puesto. Este gen también puede encontrarse en el último puesto tras los tratamientos con Cu^{2+} (Fig. 66).

Por otro lado, si analizamos cada una de las cepas de manera independiente y comparamos los niveles de inducción de los cuatro genes AP-1 en cada una de ellas (Figs. 62-66) podemos destacar los siguientes resultados:

- En la cepa control SB1969, los genes *TthebZIP1*, *TthebZIP2* y *TthebZIP3* muestran un patrón de inducción muy similar entre sí, respondiendo principalmente a los tratamientos con Pb^{2+} (24h) y Cd^{2+} (24h) (Fig. 62-64). Sin embargo, el gen *TthebZIP4* presenta un patrón muy diferente y responde principalmente frente a Cu^{2+} (24h) y Cd^{2+} (24h) (Fig. 65).
- En la cepa Cd-ADAP destaca la expresión del gen *TthebZIP2* en respuesta al tratamiento con Cu^{2+} (24h) (Fig. 63). Los genes *TthebZIP3* y *TthebZIP4* presentan un patrón de inducción muy similar, respondiendo principalmente a Cd^{2+} (24h) y Cu^{2+} (1h) (Figs. 64 y 65). Finalmente, el gen *TthebZIP1* se expresa principalmente en presencia de Cd^{2+} (24h) (Fig. 62).

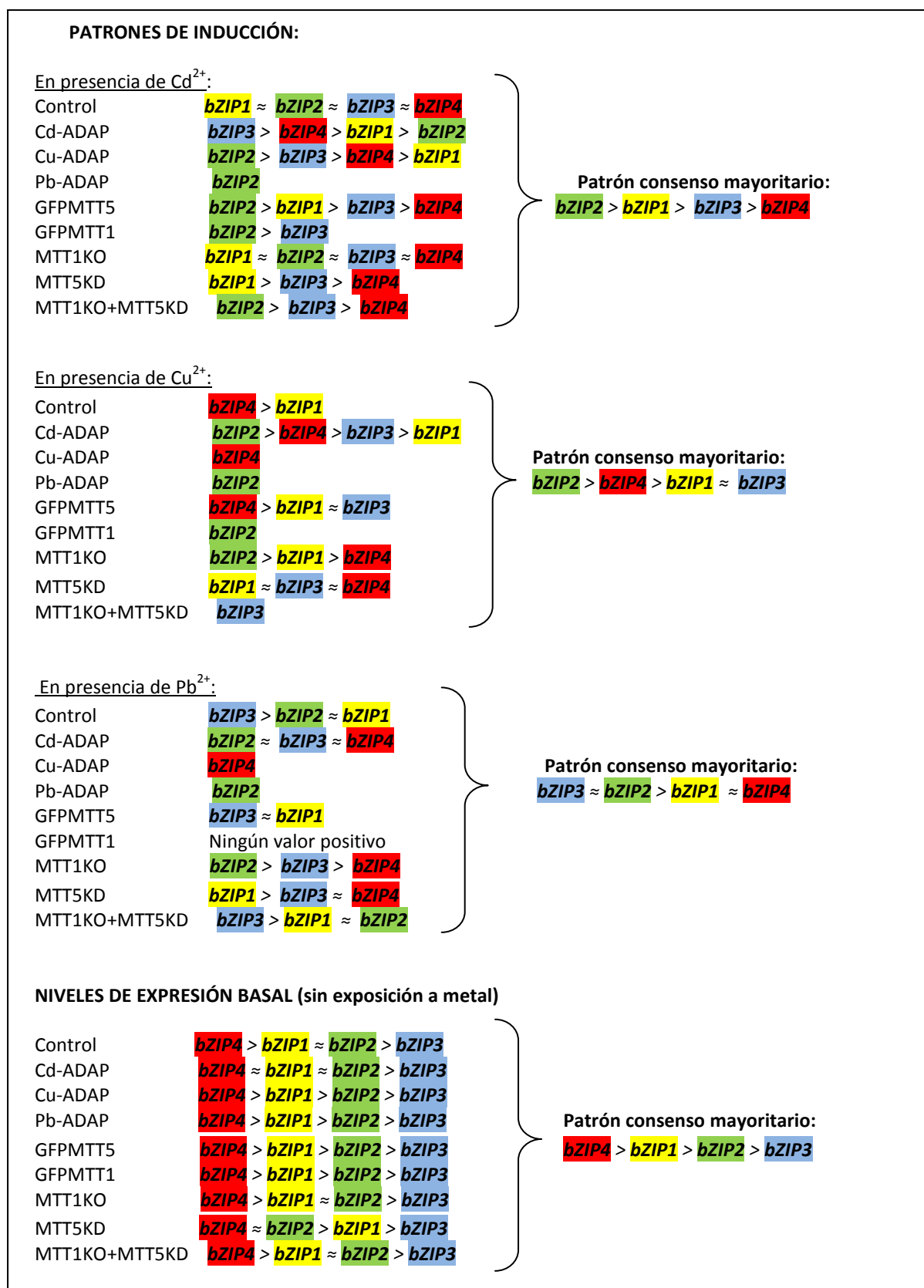


Fig 66. Ranking de los niveles de expresión basal (sin exposición a metal) y de los valores de inducción tras el tratamiento con Cd²⁺, Cu²⁺ o Pb²⁺ (1 ó 24h) para los cuatro genes codificantes de factores de transcripción AP-1 en cada una de las cepas de *T. thermophila* analizadas. Se indican los patrones consenso mayoritarios.

- Igualmente, en la cepa Cu-ADAP también destaca el gen *TthebZIP2*, que tiene los mayores niveles de inducción tras el tratamiento con Cd^{2+} (24h) (Fig. 63). Los otros tres genes, aunque se expresan en menor medida, presentan patrones de inducción similares entre sí y respecto del gen *TthebZIP2*, distinguiéndose los mayores niveles de expresión tras el tratamiento con Cd^{2+} (24h) (Figs. 62-65).
- En la cepa Pb-ADAP solamente el gen *TthebZIP2* muestra niveles de inducción significativos, obteniéndose los mayores niveles tras el tratamiento con Cd^{2+} (24h) (Fig. 63).
- Los genes *TthebZIP1*, *TthebZIP2* y *TthebZIP3* tienen patrones de inducción similares en la cepa GFPMTT5, distinguiéndose los mayores niveles de inducción tras el tratamiento con Cd^{2+} (24h) (Figs. 62-64). De forma similar a lo detectado en la cepa control SB1969, el gen *TthebZIP4* muestra un patrón de inducción diferente al de los otros tres genes AP-1, expresándose sobre todo tras el tratamiento con Cu^{2+} (1h) (Fig. 65).
- La cepa GFPMTT1 se expresa de manera similar a la Pb-ADAP pues, casi de manera exclusiva, el gen *TthebZIP2* es el único que responde a los tratamientos con metales, obteniéndose los mayores niveles de inducción tras los tratamientos con Cd^{2+} (24h) (Fig. 63).
- Finalmente, en el caso de las cepas *knockout* (KO) y/o *knockdown* (KD), observamos diferentes patrones de inducción. La cepa MTT5KD es la que presenta mayores niveles de inducción, concretamente para el gen *TthebZIP1*, que se induce principalmente tras los tratamientos con Cd^{2+} (1 ó 24h), Cu^{2+} (24h) y Pb^{2+} (24h) (Fig. 62). Los genes *TthebZIP3* y *TthebZIP4* muestran patrones de inducción similares, destacándose los niveles alcanzados tras los tratamientos con Cd^{2+} (1 ó 24h) (Figs. 64 y 65) y, como se ha comentado previamente, el gen *TthebZIP2* no presenta valores de inducción significativos para ninguno de los tratamientos llevados a cabo. Sin embargo, en la cepa MTT1KO+MTT5KD destacan las respuestas de los genes *TthebZIP2* y *TthebZIP3* bajo estrés por Cd^{2+} (24h) (Figs. 63 y 64). Por último, en la cepa MTT1KO, los niveles de inducción registrados para cualquiera de los tratamientos son mucho más bajos, existiendo pocas diferencias entre los cuatro genes bZIP (Figs. 62-65).

D.3. Análisis comparativo de los niveles de expresión basal de los genes codificantes de los cuatro factores de transcripción AP-1 descritos en *T. thermophila*

Además de comparar los niveles de inducción de estos cuatro genes *bZIP* entre las diferentes cepas de *T. thermophila*, también podemos comparar sus niveles de expresión basal, medidos en condiciones control (Fig. 66). Para ello, se compararon los valores C_t obtenidos en las condiciones control (sin exposición a metal) (Tabla 33) utilizando la siguiente fórmula: $2^{\Delta C_t}$, donde ΔC_t es la diferencia entre los dos valores C_t comparados, bien dentro de una misma especie entre sus cuatro genes *bZIP* o para el mismo gen *bZIP* entre las diferentes cepas (Fig. 66, Tablas 33-35).

Resultados

En todas las cepas analizadas, el gen *TthebZIP4* es el que presenta mayores niveles de expresión basal o constitutiva, mientras que es el gen *TthebZIP3* el que tiene niveles de expresión basal más bajos (Fig. 66). De esta forma, el patrón consenso mayoritario de expresión basal para casi la totalidad de las cepas de *T. thermophila* analizadas es el siguiente: *bZIP4* > *bZIP1* > *bZIP2* > *bZIP3* (Fig. 66). Las mayores diferencias entre los niveles de expresión basales para los genes *TthebZIP4* y *TthebZIP3* se observan en las cepas GFPMTT5 ($\approx 32x$) y control SB1969 ($\approx 27x$) (Tabla 34). Por otro lado, los genes *TthebZIP1* y *TthebZIP2* presentan niveles de expresión basal muy similares entre sí en la mayoría de las cepas analizadas (Fig. 66, Tabla 34). A modo de ejemplo, en el caso de la cepa control, si comparamos los niveles de expresión basal de los cuatro genes podemos calcular que el gen *TthebZIP4* se expresa ≈ 5 veces más que el gen *TthebZIP2*, ≈ 6 veces más que el gen *TthebZIP1* y ≈ 27 veces más que el gen *TthebZIP3* (Tabla 34). Las comparaciones de los niveles de expresión basales entre los cuatro genes *bZIP* para cada una de las cepas de *T. thermophila* analizadas se muestran en la Tabla 34.

Tabla 33. Valores C_t obtenidos para cada uno de los genes codificantes de factores *bZIP* en la situación control (ausencia de metal) en las diferentes cepas de *T. thermophila*

Gen	Cepa	Control	Cd-adap	Cu-adap	Pb-adap	
<i>ACTINA</i>		14,90	15,80	15,20	15,20	
<i>TthebZIP1</i>		23,67	23,78	22,33	22,07	
<i>TthebZIP2</i>		23,51	23,19	23,34	23,54	
<i>TthebZIP3</i>		25,86	27,23	24,98	25,06	
<i>TthebZIP4</i>		21,10	23,30	21,80	20,50	
Gen	Cepa	GFPMTT1	GFPMTT5	MTT1KO	MTT5KD	MTT1KO+MTT5KD
<i>ACTINA</i>		14,80	15,10	13,00	15,00	14,10
<i>TthebZIP1</i>		20,98*	23,79	22,40	25,80	21,70
<i>TthebZIP2</i>		22,66	24,42	22,70	23,4	22,80
<i>TthebZIP3</i>		24,25	26,25	23,30*	26,60	23,00*
<i>TthebZIP4</i>		19,80	21,25	20,70	23,60	20,70

El gen de la actina se utiliza como control endógeno o gen normalizador de la expresión en estos estudios de RT-PCR cuantitativa. (*) indica los valores C_t que son considerablemente inferiores a los obtenidos para ese mismo gen en la cepa control SB1969 (al menos con dos ciclos de diferencia) y, por tanto, que reflejan mayores niveles de expresión basal para ese gen en otra de las cepas analizadas.

Por otro lado, también podemos comparar para cada uno de los genes *bZIP* los niveles de expresión basales entre las diferentes cepas de *T. thermophila* (Tabla 35). Al comparar los niveles de expresión basal de cada gen *bZIP* con los obtenidos en la cepa control SB1969, se observa que en el caso del gen *TthebZIP2* sus niveles no aumentan de manera significativa en ninguna de las cepas analizadas con respecto a los niveles calculados para este gen en la cepa control. Los niveles de expresión basales del gen *TthebZIP1* aumentan en la cepa GFPMTT1 ($\approx 6,5x$) con respecto a la cepa control. Finalmente, los niveles basales del gen *TthebZIP3* son mayores en las cepas MTT1KO ($\approx 6x$) y MTT1KO+MTT5KD ($\approx 7x$) con respecto a los niveles de expresión basales obtenidos para la cepa control SB1969 (Tabla 35).

Además de comparar cada cepa con respecto a la cepa control SB1969, también podemos comparar los niveles de expresión basales de los cuatro genes *bZIP* entre todas las cepas analizadas. Podemos apreciar que la cepa GFPMTT1 es la que presenta mayores niveles de expresión basales para los genes *TthebZIP1*, *TthebZIP2* y *TthebZIP4* de entre todas las cepas analizadas. Aunque el gen *TthebZIP3* es el que muestra menores niveles de expresión basales de entre los cuatro factores AP-1 (Fig. 66), es en las cepas MTT1KO y MTT1KO+MTT5KD en las que más se expresa en ausencia de metal (Tabla 35). En contraposición, de entre todas las cepas analizadas, se detectan menores niveles de expresión basales en las cepas MTT5KD (para los genes *TthebZIP1* y *TthebZIP4*), GFPMTT5 (para el gen *TthebZIP2*) y Cd-ADAP (para el caso de los genes *TthebZIP3* y *TthebZIP4*), que son las que presentan valores Ct más elevados para los casos concretos mencionados (Tabla 33). Estas deducciones también se corroboran observando los resultados mostrados en la Tabla 35.

Tabla 34. Comparación de los niveles de expresión basal entre los cuatro genes codificantes de los factores *bZIP* en cada cepa de *T. thermophila*

Control	<i>bZIP1</i>	<i>bZIP2</i>	<i>bZIP3</i>	<i>bZIP4</i>	Cd-ADAP	<i>bZIP1</i>	<i>bZIP2</i>	<i>bZIP3</i>	<i>bZIP4</i>
<i>bZIP1</i>	1				<i>bZIP1</i>	1			
<i>bZIP2</i>	1,12x	1			<i>bZIP2</i>	1,50x	1		
<i>bZIP3</i>	4,56x	5,10x	1		<i>bZIP3</i>	10,93x	16,45x	1	
<i>bZIP4</i>	5,94x	5,31x	27,10x	1	<i>bZIP4</i>	1,39x	1,08x	15,24x	1
Cu-ADAP	<i>bZIP1</i>	<i>bZIP2</i>	<i>bZIP3</i>	<i>bZIP4</i>	Pb-ADAP	<i>bZIP1</i>	<i>bZIP2</i>	<i>bZIP3</i>	<i>bZIP4</i>
<i>bZIP1</i>	1				<i>bZIP1</i>	1			
<i>bZIP2</i>	2,01x	1			<i>bZIP2</i>	2,77x	1		
<i>bZIP3</i>	6,28x	3,12x	1		<i>bZIP3</i>	7,94x	2,87x	1	
<i>bZIP4</i>	1,44x	2,91x	9,06x	1	<i>bZIP4</i>	2,97x	8,22x	23,59x	1
GFPMTT1	<i>bZIP1</i>	<i>bZIP2</i>	<i>bZIP3</i>	<i>bZIP4</i>	GFPMTT5	<i>bZIP1</i>	<i>bZIP2</i>	<i>bZIP3</i>	<i>bZIP4</i>
<i>bZIP1</i>	1				<i>bZIP1</i>	1			
<i>bZIP2</i>	3,20x	1			<i>bZIP2</i>	1,55x	1		
<i>bZIP3</i>	9,65x	3,01x	1		<i>bZIP3</i>	5,50x	3,56x	1	
<i>bZIP4</i>	2,27x	7,26x	21,86x	1	<i>bZIP4</i>	5,82x	9x	32x	1
MTT1KO	<i>bZIP1</i>	<i>bZIP2</i>	<i>bZIP3</i>	<i>bZIP4</i>	MTT5KD	<i>bZIP1</i>	<i>bZIP2</i>	<i>bZIP3</i>	<i>bZIP4</i>
<i>bZIP1</i>	1				<i>bZIP1</i>	1			
<i>bZIP2</i>	1,23x	1			<i>bZIP2</i>	5,28x	1		
<i>bZIP3</i>	1,87x	1,52x	1		<i>bZIP3</i>	1,74x	9,19x	1	
<i>bZIP4</i>	3,25x	4x	6,06x	1	<i>bZIP4</i>	4,59x	1,15x	8x	1
MTT1KO+ MTT5KD	<i>bZIP1</i>	<i>bZIP2</i>	<i>bZIP3</i>	<i>bZIP4</i>					
<i>bZIP1</i>	1								
<i>bZIP2</i>	2,14x	1							
<i>bZIP3</i>	2,46x	1,15x	1						
<i>bZIP4</i>	2x	4,29x	4,92x	1					

En cada cepa, los genes *bZIP* se comparan dos a dos entre sí, distinguiéndolos en esta tabla con dos colores: rojo y verde. De esta forma, los valores obtenidos de cada comparación se indican en uno de estos dos colores según el gen que presenta un mayor nivel de expresión basal. Se consideran diferencias realmente significativas (sombreadas en gris) si las diferencias entre los niveles de expresión basal son mayores que 4, que suponen diferencias de más de dos ciclos entre los valores C_t comparados.

Tabla 35. Comparación de los niveles de expresión basal de cada gen bZIP entre las diferentes cepas de *T. thermophila*

Gen <i>TthebZIP1</i>	Control	Cd-ADAP	Cu-ADAP	Pb-ADAP	GFPMTT1	GFPMTT5	MTT1KO	MTT5KD	MTT1KO+ MTT5KD
Control	1								
Cd-ADAP	1,08x	1							
Cu-ADAP	2,53x	2,73x	1						
Pb-ADAP	3,03x	3,27x	1,19x	1					
GFPMTT1	6,45x	6,96x	2,55x	2,13x	1				
GFPMTT5	1,09x	1x	2,75x	3,29x	7,01x	1			
MTT1KO	2,41x	2,60x	1,62x	1,26x	2,68x	2,62x	1		
MTT5KD	4,38x	4,06x	11,08x	13,27x	28,25x	4,03x	10,56x	1	
MTT1KO+ MTT5KD	3,92x	4,23x	1,55x	1,29x	1,44x	4,26x	1,62x	17,15x	1
Gen <i>TthebZIP2</i>	Control	Cd-ADAP	Cu-ADAP	Pb-ADAP	GFPMTT1	GFPMTT5	MTT1KO	MTT5KD	MTT1KO+ MTT5KD
Control	1								
Cd-ADAP	1,25x	1							
Cu-ADAP	1,13x	1,11x	1						
Pb-ADAP	1,02x	1,27x	1,15x	1					
GFPMTT1	1,80x	1,44x	1,60x	1,84x	1				
GFPMTT5	1,88x	2,35x	2,11x	1,84x	3,39x	1			
MTT1KO	1,75x	1,40x	1,56x	1,79x	1,03x	3,29x	1		
MTT5KD	1,08x	1,16x	1,04x	1,10x	1,67x	2,03x	1,62x	1	
MTT1KO+ MTT5KD	1,64x	1,31x	1,45x	1,67x	1,10x	3,07x	1,07x	1,52x	1
Gen <i>TthebZIP3</i>	Control	Cd-ADAP	Cu-ADAP	Pb-ADAP	GFPMTT1	GFPMTT5	MTT1KO	MTT5KD	MTT1KO+ MTT5KD
Control	1								
Cd-ADAP	2,58x	1							
Cu-ADAP	1,84x	4,76x	1						
Pb-ADAP	1,74x	4,50x	1,06x	1					
GFPMTT1	3,05x	7,89x	1,66x	1,75x	1				
GFPMTT5	1,31x	1,97x	2,41x	2,28x	4x	1			
MTT1KO	5,90x	15,24x	3,20x	3,39x	1,93x	7,72x	1		
MTT5KD	1,67x	1,55x	3,07x	2,91x	5,10x	1,27x	9,85x	1	
MTT1KO+ MTT5KD	7,26x	18,76x	3,94x	4,17x	2,38x	9,51x	1,23x	12,13x	1
Gen <i>TthebZIP4</i>	Control	Cd-ADAP	Cu-ADAP	Pb-ADAP	GFPMTT1	GFPMTT5	MTT1KO	MTT5KD	MTT1KO+ MTT5KD
Control	1								
Cd-ADAP	4,59x	1							
Cu-ADAP	1,62x	2,83x	1						
Pb-ADAP	1,52x	6,96x	2,46x	1					
GFPMTT1	2,46x	11,31x	4x	1,62x	1				
GFPMTT5	1,11x	4,14x	1,46x	1,68x	2,73x	1			
MTT1KO	1,32x	6,06x	2,14x	1,15x	1,87x	1,46x	1		
MTT5KD	5,66x	1,23x	3,48x	8,57x	13,93x	5,10x	7,46x	1	
MTT1KO+ MTT5KD	1,32x	6,06x	2,14x	1,15x	1,87x	1,46x	1x	7,46x	1

Se comparan las distintas cepas entre sí dos a dos, distinguiéndose en esta tabla con dos colores: rojo y verde. De esta forma, los valores obtenidos de cada comparación se indican en uno de estos dos colores según la cepa que presenta un mayor nivel de expresión basal para cada gen. Se consideran diferencias realmente significativas (sombreadas en gris) si las diferencias entre los niveles de expresión basal son mayores que 4, que suponen diferencias de más de dos ciclos entre los valores C_t comparados.

A partir de estas comparaciones de todas las cepas entre sí (Tabla 35), podemos decir que el gen *TthebZIP1* presenta sus mayores niveles de expresión basal en las cepas GFPMTT1, MTT1KO+MTT5KD y Cu-ADAP. Por el contrario, sus niveles de expresión basales son muy bajos en la cepa MTT5KD (Tabla 35). El gen *TthebZIP2* presenta unos niveles de expresión basal muy similares entre todas las cepas analizadas, sin observarse grandes diferencias al comparar todas las cepas entre sí (Tabla 35). El gen *TthebZIP3* muestra sus mayores niveles de expresión basal en las cepas MTT1KO+MTT5KD, MTT1KO y GFPMTT1, mientras que los menores niveles de expresión basal para este gen se detectan en las cepas Cd-ADAP, GFPMTT5 y MTT5KD (Tabla 35). Finalmente, el gen *TthebZIP4* muestra sus mayores niveles de expresión basal en las cepas GFPMTT1, MTT1KO, MTT1KO+MTT5KD y Pb-ADAP y sus menores niveles de expresión basal se detectan en las cepas Cd-ADAP y MTT5KD (Tabla 35).

E.- POSIBLE UTILIZACIÓN DE LAS CEPAS ADAPTADAS A METAL EN PROCESOS DE BIORREMEDIACIÓN: ENSAYOS PRELIMINARES

Las células adaptadas son capaces de sobrevivir expuestas constantemente a elevadas concentraciones de metal y, ante esta situación, han desarrollado una serie de mecanismos de resistencia que las convierte en potenciales herramientas para procesos de biorremediación en ecosistemas contaminados con metales pesados. En el presente trabajo hemos llevado a cabo unos experimentos preliminares para dilucidar la posible utilidad de estas cepas adaptadas a metales en los procesos de biorremediación de estos contaminantes.

E.1. Determinación de la cantidad de metal retirado del medio por las cepas adaptadas

Se ha medido la cantidad de metal presente en el medio tras mantener en él a las células adaptadas durante 24 y 48h con el fin de conocer si éstas eran capaces de retirar el metal, en qué cantidad y a qué velocidad lo hacían. En la Fig. 67 se muestran los resultados obtenidos del análisis llevado a cabo mediante espectrometría de emisión óptica con plasma de acoplamiento inductivo (ICP-OES).

La cepa Cd-ADAP retira el 36% de Cd^{2+} del medio tras 24h de exposición y un 42% tras 48h (Fig. 67A). La cepa Cu-ADAP también retira aproximadamente el 34% del cobre del medio en 24h y bastante menos tras 48h de exposición ($\approx 11\%$). Tras esta prolongada exposición al metal se observa una elevada mortalidad celular (de casi el 90% de la población) que podría relacionarse con el aumento de la cantidad de metal detectada en el medio como consecuencia de los procesos de lisis celular (Fig. 67B). Finalmente, la cepa Pb-ADAP es capaz de retirar más del 90% del Pb^{2+} presente en el cultivo en tan sólo 24h, independientemente de la concentración inicial presente (Fig. 67C). Tras 48h de incubación se observa, sólo en el ensayo realizado a la mayor concentración, un ligero aumento ($\approx 2,5\%$ más) de la cantidad de metal presente en el medio, lo que podría ser debido a la mortalidad del ciliado (con lisis celular) tras las 48h de exposición (Fig. 67C).

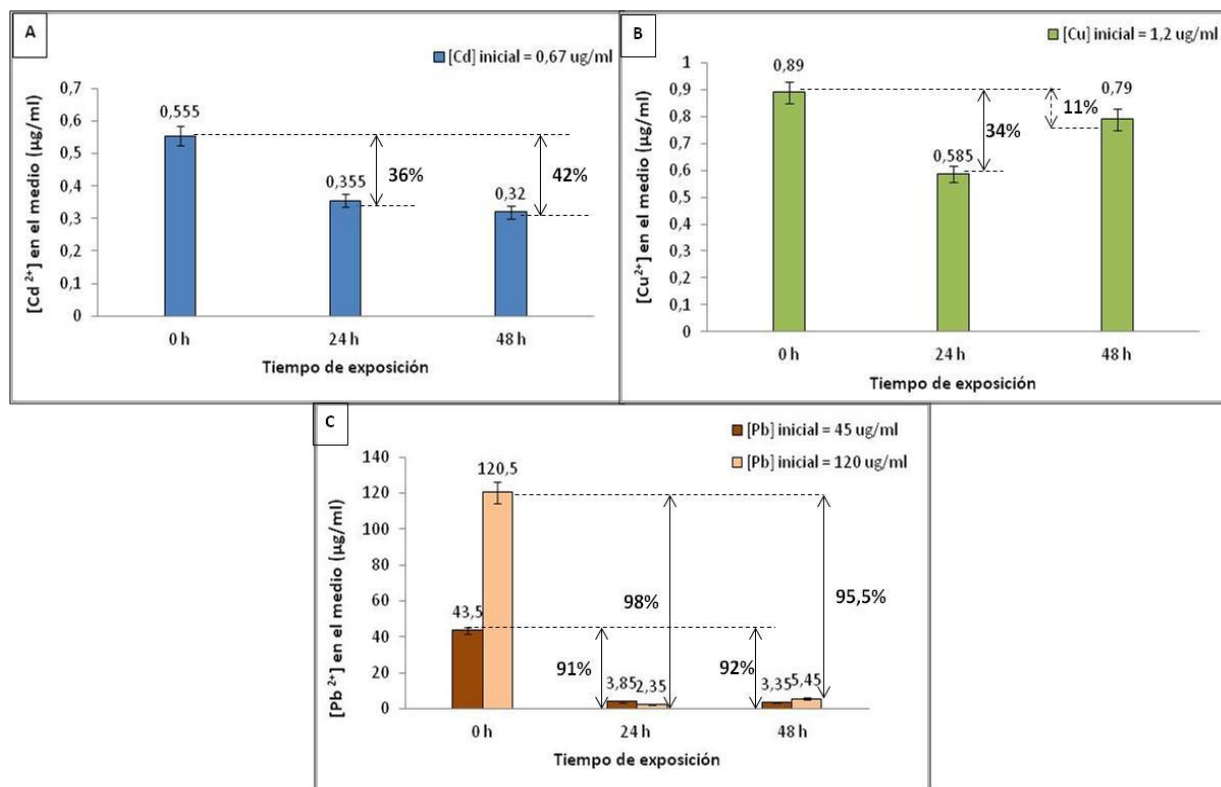


Fig 67. Cantidad de metal presente en el medio calculada mediante ICP-OES tras el cultivo con las cepas adaptadas (24 y 48h). Los resultados mostrados se corresponden con los valores medios \pm desviaciones estándar calculados a partir de dos o tres experimentos independientes. Las medidas tomadas a $t = 0h$ indican la concentración inicial del metal presente en el medio, medida antes de añadir las cepas adaptadas de *T. thermophila*. **(A):** ensayo llevado a cabo con la cepa Cd-ADAP, **(B):** cepa Cu-ADAP, **(C):** cepa Pb-ADAP. En el caso de la cepa Pb-ADAP, se hicieron dos experimentos en paralelo con dos concentraciones de partida diferentes (panel C).

E.2. Análisis de la biodisponibilidad o toxicidad del metal no retirado por las cepas adaptadas

Según los resultados obtenidos con la técnica ICP-OES (mostrados en el apartado anterior y Fig. 67), la cepa Pb-ADAP es capaz de retirar casi la totalidad del metal biodisponible presente en el medio en tan sólo 24h. Igualmente, las cepas Cd-ADAP y Cu-ADAP pueden retirar un 36 ó 34% del metal correspondiente (Fig. 67). Para dilucidar el grado de toxicidad del medio de exposición una vez retirado el porcentaje correspondiente de metal por la cepa adaptada, se llevaron a cabo una serie de bioensayos con una cepa control del mismo ciliado (SB1969). Esta cepa control se expuso a los sobrenadantes obtenidos de cultivos con células adaptadas (crecidos durante 5 días en presencia de la MCT de metal correspondiente). En el caso de la cepa Pb-ADAP, que forma un pellet o precipitado compacto tras varios días de cultivo (agregados de proteína-metal excretados por la célula) (Fig. 68), también se tomó este precipitado y se expuso a la cepa control. Los porcentajes de mortalidad se calcularon mediante citometría de flujo, utilizando como controles negativos cultivos expuestos a los

valores de CL_{50} previamente calculados en las cepas adaptadas ($800 \mu\text{M Pb}^{2+}$, $10 \mu\text{M Cd}^{2+}$ y $30 \mu\text{M Cu}^{2+}$) en el tampón TrisHCl $0,01\text{M}$ pH 6,8. Los resultados se muestran en la Tabla 36.

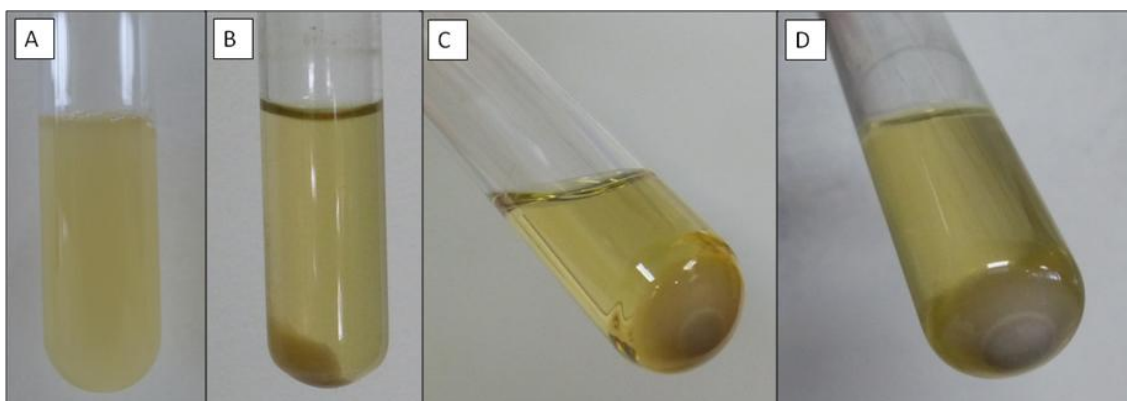


Fig. 68. Fotografías de cultivos de la cepa Pb-ADAP. (A): Cultivo recién inoculado. (B): Cultivo crecido durante cinco días. Se aprecia la formación de un precipitado compacto en el fondo del tubo. (C y D): Ampliación del precipitado o pellet formado en los tubos de la cepa Pb-ADAP, de aspecto blanquecino y compacto.

Tabla 36. Porcentajes de mortalidad calculados mediante citometría de flujo tras exponer la cepa control SB1969 a diferentes concentraciones de metal y a los sobrenadantes/precipitados obtenidos de cultivos adaptados crecidos durante cinco días

MUESTRA/TRATAMIENTO	% MORTALIDAD
Control positivo (VIVAS)	$0,49 \pm 0,16$
Control negativo (MUERTAS)	$97,94 \pm 0,14$
+ Pb^{2+} $800\mu\text{M}$	$86,76 \pm 4,54$
+ Sobrenadante (Pb-ADAP)	$1,35 \pm 0,47$
+ Pellet (Pb-ADAP)	$21,19 \pm 1,83$
+ Cd^{2+} $10 \mu\text{M}$	$98,83 \pm 0,38$
+ Sobrenadante (Cd-ADAP)	$2,73 \pm 1,91$
+ Cu^{2+} $30 \mu\text{M}$	$13,59 \pm 7,06$
+ Sobrenadante (Cu-ADAP)	$2,11 \pm 1,02$

En todos los experimentos de citometría se utilizó un control de vivas (sin exposición a ningún metal) y uno de muertas (células fijadas con formaldehído al 37%).

La cepa control SB1969 muestra elevados porcentajes de mortalidad al exponerla a los valores de CL_{50} calculados para las cepas Pb-ADAP y Cd-ADAP; sin embargo, en el caso de la CL_{50} de la cepa Cu-ADAP, el porcentaje de mortalidad es muy inferior al 50% en esta cepa control (Tabla 36). Por otro lado, se observa que los porcentajes de mortalidad obtenidos tras exponer a la cepa control a los sobrenadantes derivados de los cultivos adaptados (previamente crecidos durante cinco días) son muy bajos o casi despreciables (en ningún caso superior al 3%) (Tabla 36). Por lo tanto, podemos afirmar que la cantidad de metal que permanece en el medio y que no es retirada por las cepas adaptadas no es tóxica para la cepa

Resultados

control. No obstante, se detecta cierta mortalidad celular ($\approx 21\%$) tras exponer a la cepa control al pellet o precipitado originado en los tubos crecidos de la cepa Pb-ADAP (Tabla 36).

Introducción

Objetivos

Material y Métodos

Resultados

Discusión

Conclusiones

Cuestiones por resolver en el futuro

Bibliografía

Anexos

DISCUSIÓN

A.- AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE NUEVAS METALOTIONEÍNAS EN DIFERENTES ESPECIES DE *TETRAHYMENA*

A.1. Nuevos genes codificantes de Cd- y CuMTs en el género *Tetrahymena*

Actualmente se conocen unas 42 especies diferentes dentro del género *Tetrahymena*. Éstas se clasifican en dos grandes grupos: grupo *australis* y grupo *borealis*, según el análisis filogenético llevado a cabo con el gen de la subunidad ribosómica pequeña (SSrRNA, 17-18S). Además, dentro del grupo *borealis* se distinguen tres subgrupos o *ribosets*: RSA1, RSA2 y RSB (Chantangsi and Lynn, 2008). Recientemente se ha aislado a partir de muestras de agua residuales, una nueva especie del género *Tetrahymena*: *T. farahensis* (denominada previamente como *Tetrahymena sp 1.7*), que se incluye en el grupo *borealis*, riboset RSA1 (Zahid *et al*, 2014).

Uno de los objetivos de esta tesis doctoral es aumentar nuestro actual conocimiento sobre las MTs del género *Tetrahymena*. Para ello, y con el fin de introducir una mayor diversidad en el análisis, se han buscado nuevos genes MTs en cinco especies de *Tetrahymena* no analizadas hasta el momento: *T. malaccensis* (grupo *borealis* RSA1), *T. borealis* (grupo *borealis* RSA2), *T. elliotti* (grupo *borealis* RSA2), *T. patula* (grupo *australis*) y *T. americanis* (grupo *australis*). Estas cinco especies se seleccionaron en función de su localización entre los dos grandes grupos establecidos en el árbol filogenético construido con las secuencias de los SSrRNA 17-18S (Chantangsi and Lynn, 2008), de forma que estuviesen alejadas entre sí y respecto de las especies ya analizadas previamente.

A partir de estas cinco especies se han aislado 12 nuevas CdMTs y 9 CuMTs que, junto con aquellas previamente descritas, suponen 26 CdMTs (subfamilia 7a) y 16 CuMTs (subfamilia 7b) en el género *Tetrahymena*, haciendo un total de 42 MTs (Tabla 37) (De Francisco *et al.*, 2016). Dentro de las nuevas CdMTs, la secuencia que hemos nombrado como *TmalaMTT1* [GenBank: KU167646] es idéntica a la previamente publicada como *TmalMT1* [GenBank: HQ166894] en *T. malaccensis* (Chang *et al*, 2014); sin embargo, nosotros hemos obtenido el ADNc completo de este gen, incluyendo sus regiones 5' y 3'UTRs. Con respecto a las CuMTs, también se ha incluido en el análisis por primera vez una posible CuMT del ciliado *Ichthyophthirius multifiliis*, no perteneciente al género *Tetrahymena*. Este ciliado es un parásito histófago de peces de agua dulce que origina la enfermedad denominada "del punto blanco". Desde un punto de vista taxonómico ambos géneros se incluyen en la misma clase *Oligohymenophorea* y en la misma subclase *Hymenostomatida* (himenostomatídeos). En la Tabla A2 del Anexo I se recogen los números de acceso del GenBank (NCBI) de todas las secuencias de los genes codificantes de MTs de ciliados, incluyendo las nuevas presentadas en esta tesis.

Tabla 37. MTs de ciliados conocidas hasta la actualidad

Grupo taxonómico	Especie	CdMTs	CuMTs	Nº total de MTs descritas
Borealis (RSA1)	<i>T. malaccensis</i>	TmalaMTT1* TmalaMTT2* TmalaMTT3* TmalaMTT4*	TmalaMTT5*	5
	<i>T. thermophila</i>	TtheMTT1 TtheMTT3 TtheMTT5	TtheMTT2 TtheMTT4	5
	<i>T. farahensis</i>	?	TfarCuMT	1
Borealis (RSA2)	<i>T. borealis</i>	TborMTT1* TborMTT2*	TborMTT3* TborMTT4* TborMTT6* TborMTT7* TborMTT8*	7
	<i>T. mobilis</i>	TmobMT1	?	1
	<i>T. rostrata</i>	TrosMTT1	TrosMTT2	2
	<i>T. ellioti</i>	TelliMTT1* TelliMTT2*	TelliMTT6* TelliMTT8*	4
	<i>T. tropicalis</i>	TtroMTT1	TtropMT1 TtropMT2	3
Borealis (RSB)	<i>T. pyriformis</i>	TpyrMT-1 TpyrMT-2	?	2
	<i>T. vorax</i>	TvorMT1	?	1
Australis (RSC)	<i>T. americanis</i>	TamerMTT1* TamerMTT2*	TamerMTT3*	3
	<i>T. hegewischi</i>	ThegMT-1 ThegMT-2 ThegMT-3 ThegMT-4	?	4
	<i>T. patula</i>	TpatMTT1* TpatMTT2*	?	2
	<i>T. pigmentosa</i>	TpigMT-1	TpigMT-2	2
Ichthyophthiriidae	<i>I. multifiliis</i>	?	ImMTT2*	1
Total	15	26	17	43

* Nuevas Cd- y CuMTs descritas en esta tesis doctoral. ? : desconocido hasta el momento. RS: riboset.

El mayor número de isoformas de MTs lo presentan las especies *T. borealis*, *T. malaccensis* y *T. thermophila*, las tres pertenecientes al grupo *Borealis* (Tabla 37). En la mayoría de las especies analizadas suelen aparecer más isoformas de CdMTs que de CuMTs, con la excepción de *T. borealis* que tiene 5 CuMTs y sólo 2 CdMTs y *T. tropicalis* que presenta hasta ahora registradas 2 CuMTs y sólo 1 CdMT (Tabla 37).

Según la última clasificación propuesta para la superfamilia de las metalotioneínas (Binz and Kägi, 1999), las MTs de los ciliados se incluyen en la familia 7. Esta clasificación se basa en las características de la estructura primaria de la CdMT TpyrMT1 (Piccinni *et al.*, 1994), que era

la única MT de ciliados descrita en el momento de hacerse dicha clasificación. Shuja y Shakoori identificaron en 2009 una hipotética MT en *Paramecium spp.*, con la que aún no se han hecho estudios de expresión que corroboren su naturaleza como una verdadera MT. Además, esta hipotética MT presenta grandes diferencias en su secuencia aminoacídica con respecto tanto de las MTs de otros organismos como de las Cd- y CuMTs de *Tetrahymena* y, junto con el hecho de que en el genoma secuenciado de *Paramecium tetraurelia* no aparece ninguna MT, decidimos no incluir en este análisis dicha MT.

La familia 7 de las MTs de ciliados se subdivide en dos subfamilias: 7a (CdMTs o Cd-tioneínas) y 7b (CuMTs o Cu-tioneínas) (Díaz *et al.*, 2007; Gutiérrez *et al.*, 2011). Ambas subfamilias se diferencian principalmente en sus patrones de residuos de cisteínas y en su inducción preferente por Cd^{2+}/Zn^{2+} o Cu^{2+} , respectivamente (Gutiérrez *et al.*, 2011). Al verse incrementado notablemente el número total de secuencias disponibles de MTs de ciliados (con esta tesis doctoral se incorporan el 46% de las CdMTs y el 53% de las CuMTs actualmente conocidas), se han podido corroborar las diferencias estructurales que existen entre ambas subfamilias de MTs. Dichas diferencias se ponen de manifiesto con la construcción de un árbol filogenético actualizado (Fig. 69), que incluye las nuevas secuencias aminoacídicas inferidas de los genes MTs descritos en este trabajo. En este árbol filogenético se observan dos grupos claramente diferenciados que se corresponden con ambas subfamilias (Fig. 69). La CuMT ImMTT2 identificada en *I. multifiliis* está claramente separada de las CuMTs de *Tetrahymena*, aunque igualmente se integra en la subfamilia 7b, pudiendo tener un origen común con éstas. En general, las diferentes isoformas de MTs para una misma especie tienden a aparecer más próximas entre sí dentro del árbol, lo que podría significar un origen común entre ellas. Sin embargo, esto no es siempre así (Fig. 69), pudiendo indicarse cierta convergencia evolutiva en estos genes dentro del género *Tetrahymena* o la existencia de un ancestro común a todas ellas a partir del cual se hubieran originado proteínas muy similares en las diferentes especies. Tras utilizar el algoritmo de máxima parsimonia (Fig. 69C) se observa una clara progresión de origen o evolución desde las CuMTs a las CdMTs, que podría indicar un origen posterior de las CdMTs con respecto de las CuMTs. Como se ha señalado previamente (Gutiérrez *et al.*, 2009; Valls *et al.*, 2001), dos líneas evolutivas tempranas de MTs (Cu- y Zn-tioneínas) estaban presentes en fases tempranas en el origen de la célula eucariota, teniendo la función preferente de la homeostasis de metales esenciales.

A.2. Diferencias entre las dos subfamilias de MTs de ciliados

A.2.1. Distribución de los residuos de cisteína

Los residuos de cisteína son componentes clave de las MTs porque a través de sus grupos tiol (-SH) son capaces de unir los cationes metálicos formando enlaces metal-tiolato (Henkel and Krebs, 2004; Grüber *et al.*, 2000). La presencia de varios grupos tiol adyacentes también potencia la reactividad de estas proteínas (Parente *et al.*, 1985). Además, las diferencias en los patrones de Cys entre las CdMTs (subfamilia 7a) y las CuMTs (subfamilia 7b) de *Tetrahymena* permiten distinguir ambas subfamilias (Gutiérrez *et al.*, 2009; 2011).

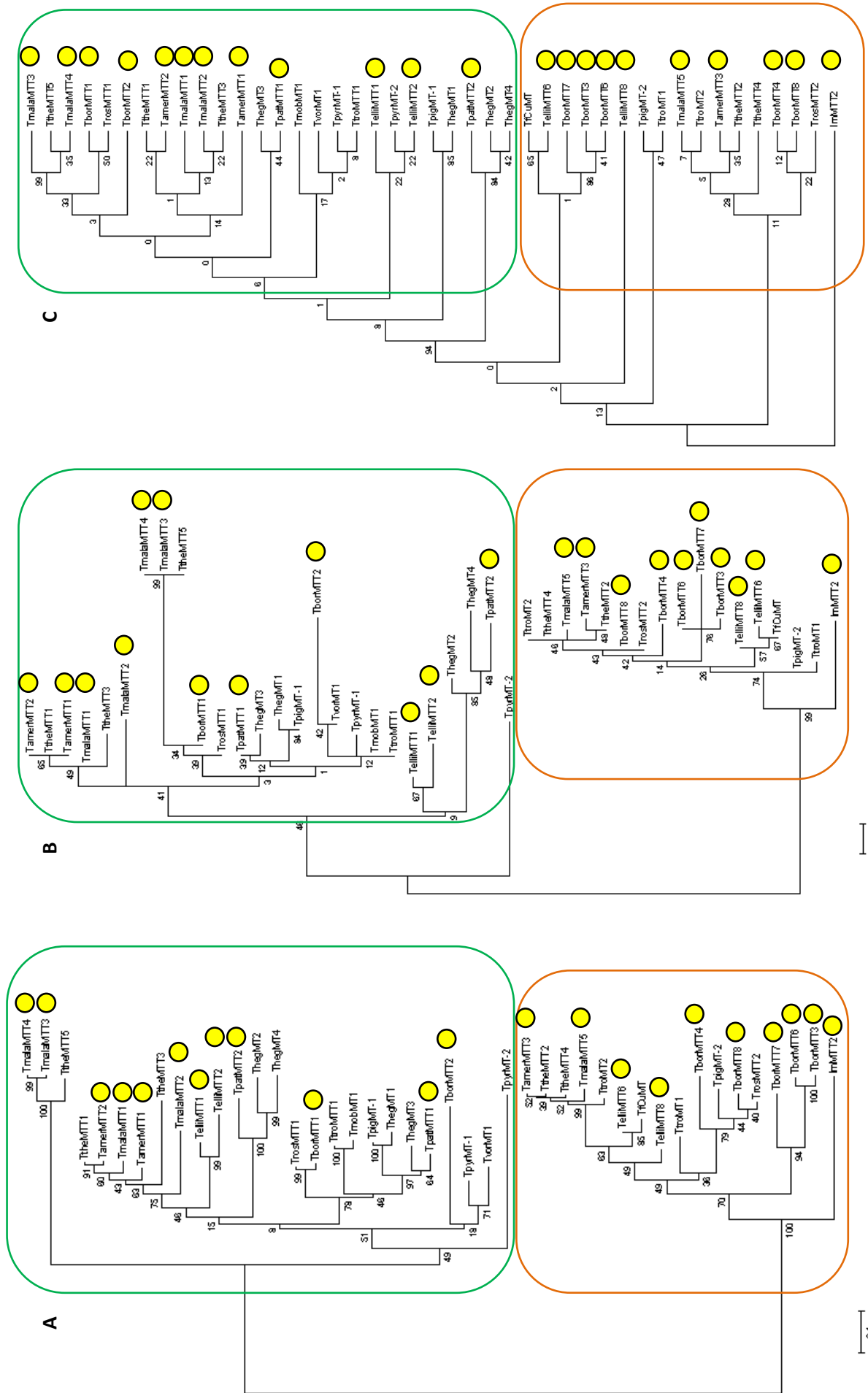


Fig. 69. Árboles filogenéticos de todas las secuencias de MTs de cilios conocidos hasta ahora. En los tres casos se distinguen perfectamente las dos subfamilias de MTs, señaladas con un recuadro verde (CdMTs) o naranja (CuMTs), respectivamente. Las nuevas secuencias se indican con un círculo amarillo. Los tres árboles fueron construidos a partir del mismo alineamiento múltiple de secuencias, empleándose diferentes algoritmos de inferencia filogenética: (a) Neighbor-Joining, (b) Máxima Verosimilitud y (c) Máxima Parsimonia. En los nodos de cada árbol se indican los valores *bootstrap* tras 2.000 repeticiones. En los dos primeros árboles, la longitud de cada rama sigue la escala indicada.

Las CdMTs del género *Tetrahymena* presentan un patrón de cisteínas característico que define su organización en módulos y submódulos. Éstas, además de presentar las agrupaciones de Cys típicas de las MTs clásicas: XCCX (34,94%), CXC (10,72%) y XXCXX o cisteínas no agrupadas (4,16%), también contienen otras agrupaciones que aparecen casi exclusivamente en ellas, tales como: CCC (32,44%), CXCC (16,91%) y CXCXC (0,83%), donde "X" es cualquier otro aminoácido. Estas agrupaciones inusuales de Cys también aparecen excepcionalmente en MTs de otros organismos, tales como: el anélido *Eisenia foetida* (el 14,29% de sus Cys se agrupan como CCC), las levaduras *Yarrowia (Candida) lipolytica* (con el 33,33% de sus Cys agrupadas en CCC) y *Saccharomyces cerevisiae* (con el 15,59% de sus Cys en agrupaciones CXCXC), el crustáceo *Callinectes sapidus* (concretamente la MT-2 presenta el 28,57% de sus Cys agrupadas en CCC y la MT-1 el 16,67% en CXCC), el molusco *Crassostrea virginica* (con el 36% de sus Cys formando agrupaciones CCC y el 12% en CXCC), la langosta americana *Homarus americanus* (16,67% de Cys en agrupaciones CXCC), el nematodo *Caenorhabditis elegans* (15,79% de Cys en CXCXC), el anfibio *Xenopus laevis* (15% de Cys en agrupaciones CXCC) o el equinoideo *Strogylocentrotus purpuratus* (15% de Cys en CXCC) (Tabla 38).

De esta forma, las agrupaciones XCCX y CCC son las más abundantes en las CdMTs de *Tetrahymena* (Tabla 16). Sin embargo, en el caso de las CuMTs, estas agrupaciones de Cys típicas de las CdMTs suelen estar ausentes, excepto en el caso de los motivos CXCC (0,53%) y XCCX (2,50%). Al igual que ocurre en las MTs de muchos otros seres vivos, los motivos CXC (92,34%) son los que predominan en las CuMTs de *Tetrahymena* (Tabla 17) frente a las demás posibles agrupaciones de cisteínas (Tabla 38). Por lo tanto, la agrupación CXC parece ser universal entre las MTs de todos los seres vivos, conteniendo un porcentaje de Cys que varía entre un mínimo del 28,57% de las Cys (como en la MT del anélido *E. foetida*) y un máximo del 100%, como se observa en la MT-1 de la mosca *Drosophila melanogaster*, que presenta todas sus Cys en agrupaciones de este tipo (Tabla 38).

En resumen, en las MTs del ciliado *Tetrahymena* según la abundancia de los diferentes tipos de agrupaciones de residuos de Cys podemos establecer el siguiente ranking: a) en las CdMTs: XCCX > CCC > CXCC > CXC > XXCXX > CXCXC y b) en las CuMTs: CXC >> XXCXX > XCCX > CXCC. Las CuMTs de *Tetrahymena* se asemejan más a las MTs clásicas presentes en la mayoría de los seres vivos, tanto por su tamaño (con un rango de 60-167 aa, más próximas al rango de tamaño de las MTs de otros organismos (40-81 aa) que las CdMTs (99-193 aa) de este ciliado), como por las agrupaciones mayoritarias de Cys que presentan sus secuencias (Tabla 38). Estas características se resumen gráficamente en la Fig. 70. Igualmente, este hecho apoyaría la hipótesis de un ancestro común para todas las MTs, que podría haber sido una MT ancestral implicada en la homeostasis de un metal esencial como el cobre.

Tabla 38. Agrupaciones de cisteína en las MTs de algunos organismos distintos a *Tetrahymena*

MTs	CCC (%)	CXCC (%)	CXCXC (%)	XCCX (%)	CXC (%)	XXCXX (%)	Total Cys por MT (%)	%Cys en las MTs	Longitud total
BACTERIAS									
PaerMT	0	0	0	1 (20)	3 (60)	2 (20)	10 (100)	12,66	79
TvulMT-NA	0	0	0	0	3 (60)	4 (40)	10 (100)	17,54	57
TOTAL Cys (%)	0	0	0	2 (10)	12 (60)	6 (30)	20(100)		
H. FILAMENT.									
AbisMT	0	0	0	0	5 (76,92)	3 (23,08)	13 (100)	22,03	59
TOTAL Cys (%)	0	0	0	0	10 (76,92)	3(23,08)	13(100)		
LEVADURAS									
ScerCuMT	0	0	1 (15,79)	1 (10,53)	5 (52,63)	4 (21,05)	19 (100)	27,54	69
YlipMT	1 (33,33)	0	0	0	3 (66,66)	0	9 (100)	16,36	55
TOTAL Cys (%)	3 (10,71)	0	3(10,71)	2 (7,14)	16 (57,14)	4(14,29)	28(100)		
INVERTEBRADOS									
MOLUSCOS									
MeduMT-10-1a	0	0	0	0	9 (85,71)	3 (14,29)	21 (100)	28,77	73
CvirMT-IVB	3 (36)	1 (12)	0	0	5 (40)	3 (12)	25 (100)	30,12	83
TOTAL Cys (%)	9 (19,55)	3 (6,5)	0	0	28 (60,87)	6 (13,04)	46(100)		
CRUSTÁCEOS									
HamerMT-1	0	1 (16,6)	0	1 (11,11)	4 (44,44)	5 (27,78)	18 (100)	31,03	58
CsapMT-1	0	1 (16,6)	0	1 (11,11)	4 (44,44)	5 (27,78)	18 (100)	30,51	59
CsapMT-2	2 (28,57)	0	0	0	5 (47,62)	5 (23,81)	21 (100)	32,81	64
TOTAL Cys (%)	6 (10,53)	6(10,5)	0	4 (7,02)	26 (45,61)	15 (26,3)	57(100)		
INSECTOS									
DmelMT-1	0	0	0	0	5 (100)	0	10 (100)	25,00	40
TOTAL Cys (%)	0	0	0	0	10 (100)	0	10(100)		
NEMATODOS									
CeleMT-1	0	0	1 (15,79)	3 (3,16)	4 (42,11)	2 (10,53)	19 (100)	25,33	75
TOTAL Cys (%)	0	0	3 (15,79)	6 (3,16)	8 (42,11)	2 (10,53)	19(100)		
ANÉLIDOS									
EfetMT	1 (14,29)	0	0	3 (28,57)	3 (28,57)	6 (28,6)	21 (100)	28,00	75
TOTAL Cys (%)	3 (14,29)	0	0	6 (28,57)	6 (28,57)	6 (28,6)	21 (100)		
EQUINOIDEOS									
SpurMT-A	0	1 (15)	0	3 (30)	5 (50)	1 (5)	20 (100)	31,25	64
TOTAL Cys (%)	0	3 (15)	0	6 (30)	10 (50)	1 (5)	20 (100)		
PLANTAS									
TaesMT-1	0	0	0	0	7 (82,35)	3 (17,65)	17 (100)	20,99	81
ZmaysMT-1	0	0	0	0	7 (82,35)	3 (17,65)	17 (100)	22,08	77
AthaMT-1A	0	0	0	0	6 (92,31)	1 (7,69)	13 (100)	28,89	45
TOTAL Cys (%)	0	0	0	0	40 (85,1)	7 (14,89)	47 (100)		
VERTEBRADOS									
PECES									
NcorMT-A	0	0	0	3 (30)	5 (50)	4 (20)	20 (100)	33,33	60
DrerMT-1	0	0	0	3 (30)	5 (50)	4 (20)	20 (100)	33,33	60
TOTAL Cys (%)	0	0	0	12 (30)	20 (50)	8 (20)	40(100)		
ANFIBIOS									
XlaeMT-A	0	1 (15)	0	2 (20)	5 (50)	3 (15)	20 (100)	32,26	62
TOTAL Cys (%)	0	3(15)	0	4 (20)	10(50)	3 (15)	20 (100)		
MAMÍFEROS									
HsapMT-1A	0	1 (15)	0	2 (20)	5 (50)	3 (15)	20 (100)	32,78	61
HsapMT-1F	0	1 (15)	0	2 (20)	5 (50)	3 (15)	20 (100)	32,78	61
HsapMT-2	0	1 (15)	0	2 (20)	5 (50)	3 (15)	20 (100)	32,78	61
PtroMT-1X	0	1 (15)	0	2 (20)	5 (50)	3 (15)	20 (100)	32,78	61
RratMT-2	0	1 (15)	0	2 (20)	5 (50)	3 (15)	20 (100)	32,78	61
MmusMT-1	0	1 (15)	0	2 (20)	5 (50)	3 (15)	20 (100)	32,78	61
EcabMT-1A	0	1 (15)	0	2 (20)	5 (50)	3 (15)	20 (100)	32,78	61
OcunMT-2A	0	1 (15)	0	2 (20)	5 (50)	3 (15)	20 (100)	32,26	62
SscroMT-1C	0	1 (15)	0	2 (20)	5 (50)	3 (15)	20 (100)	32,78	61
TOTAL Cys (%)	0	27 (15)	0	36 (20)	90 (50)	27 (15)	180 (100)		

En naranja se indican las agrupaciones de cisteínas mayoritarias dentro de cada grupo taxonómico y, en amarillo, aquellas 4 MTs que presentan la agrupación CCC, predominante en las CdMTs de *Tetrahymena*. C: cisteína. X: cualquier otro aminoácido. Los números de acceso del GenBank de todas estas secuencias se recogen en la Tabla A3 del Anexo I.

Paer: *Pseudomonas aeruginosa*; Tvul: *Thermosynechococcus vulcanus*; Abis: *Agaricus bisporus*; Scer: *Saccharomyces cerevisiae*; Ylip: *Yarrowia (Candida) lipolytica*; Medu: *Mytilus edulis*; Cvir: *Crassostrea virginica*; Hamer: *Homarus americanus*; Csap: *Callinectes sapidus*; Dmel: *Drosophila melanogaster*; Cele: *Caenorhabditis elegans*; Efet: *Eisenia foetida*; Spur: *Strongylocentrotus purpuratus*; Taes: *Triticum aestivum*; Zmays: *Zea mays*; Atha: *Arabidopsis thaliana*; Ncor: *Notothenia coriiceps neglecta*; Drer: *Danio rerio*; Xlae: *Xenopus laevis*; Hsap: *Homo sapiens*; Ptro: *Pan troglodytes*; Rrat: *Rattus rattus*; Mmus: *Mus musculus*; Ecab: *Equus caballus*; Ocun: *Oryctolagus cuniculus*; Sscro: *Sus scrofa*.

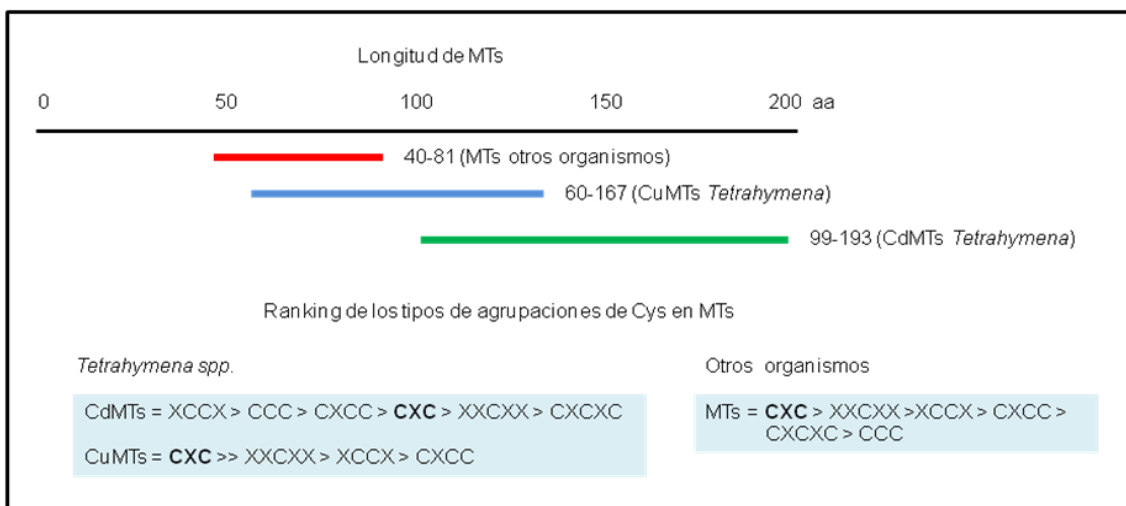


Fig. 70. Esquema comparativo del rango de longitud y de los tipos de agrupaciones de Cys entre las MTs de *Tetrahymena* y las MTs de otros organismos.

A.2.2. Relación entre los residuos de lisina y cisteína

Otra diferencia estructural entre ambas subfamilias de MTs es la relación que existe entre los residuos de lisina y cisteína (Gutiérrez *et al.*, 2011). Los residuos de lisina (K) también parecen tener un papel clave en las MTs ya que se ha demostrado que la capacidad de reactividad (a pH neutro) de los residuos de Cys depende, considerablemente, de la cercanía de éstos a grupos cargados positivamente. La localización adyacente de estos residuos básicos disminuye notablemente el valor pK y la reactividad de los múltiples residuos de Cys presentes en las MTs (Parente *et al.*, 1985). Por esta razón, es posible que algunas MTs tengan una capacidad de unión a metal inferior a la que se les asigna teóricamente.

En las CuMTs (subfamilia 7b), al igual que sucede en las MTs de otros organismos, existe una gran tendencia a que ambos aminoácidos aparezcan contiguos en la secuencia, formando agrupaciones del tipo CKC. De hecho, la mayoría de las agrupaciones CXC de las CuMTs se corresponden con agrupaciones CKC, contabilizándose un total de 149 CKC entre todas las secuencias. Por otro lado, en el caso de las CdMTs (subfamilia 7a), las agrupaciones CKC son menos frecuentes y suelen aparecer casi exclusivamente en la región C-terminal del submódulo tipo 2 de estas proteínas, registrándose un total de 55 CKC entre todas las secuencias.

A.2.3. Estructura modular/submodular de las CdMTs (subfamilia 7a)

La localización altamente conservada de los residuos de Cys (y en menor medida de los residuos de Lys) en las CdMTs de *Tetrahymena* define un marcado patrón modular/submodular en todas las proteínas de esta subfamilia (Díaz *et al.*, 2007; Gutiérrez *et al.*, 2011). Los módulos se definen según el criterio de que cada uno presenta en su extremo carboxilo terminal el motivo CXCCX (existiendo excepciones o pequeñas modificaciones),

Discusión

siendo la última "X" un residuo de lisina (K) o glutamina (Q). La longitud de los módulos varía entre 32 y 56 aminoácidos y éstos aparecen separados por "linkers" de entre 2-9 aminoácidos (Fig. 16).

Las CdMTs de *Tetrahymena* pueden presentar entre 2 y 5 módulos. Nueve de las 26 CdMTs conocidas tienen dos módulos (estructura bimodular): TpyrMT-1, TtheMTT5, TrosMTT1, TpigMT-1, ThegMT1, TborMTT1, TmalaMTT4, TpatMTT1 y TamerMTT1. Sin embargo, la mayoría de las CdMTs (13 de las 26 descritas) tienen una estructura trimodular: TtheMTT1, TtheMTT3, TtroMTT1, TvorMT1, TmobMT1, ThegMT3, TborMTT2, TelliMTT1, TelliMTT2, TmalaMTT1, TmalaMTT2, TpatMTT2 y TamerMTT2. Finalmente, sólo 3 de ellas (TmalaMTT3, ThegMT2 y ThegMT4) contienen cuatro módulos (estructura tetramodular) y sólo la TpyrMT-2 tiene cinco módulos (pentamodular).

Estos módulos están formados por dos tipos de submódulos: los submódulos de tipo 1 (sm1), que tienen la secuencia consenso $C_{2-3}X_6C_{1-2}X_6$ y los submódulos tipo 2 (sm2), que cuando se encuentran completos, se pueden representar con la siguiente secuencia: $C_2X_{6-8}+CXCXC_{1-2}XXC_{1-2}X_{1-2}$. Los sm2 completos equivalen aproximadamente a medio sm1 (C_2X_{6-8}) más el motivo típico del extremo carboxilo terminal, donde la última "X" es Lys ($\approx 55\%$ de los casos), Gln ($\approx 36\%$), Glu ($\approx 7\%$) o Asn ($\approx 1,5\%$). En general, cada módulo está formado por dos sm1 y un sm2. Sin embargo, en algunas de las CdMTs, este sm2 no siempre aparece completo, pudiendo presentar sólo el extremo C-terminal (42% de los casos) o sólo la mitad de sm1 ($\frac{1}{2}$ sm1) (en el 5% de los casos estudiados). Una estructura atípica la muestra la TpyrMT-2, cuyos cuatro primeros módulos están formados únicamente por un sm1 y la mitad de un sm2 (Fig. 16).

Por otro lado, las CuMTs de *Tetrahymena* (subfamilia 7b) no parecen mostrar una estructura modular/submodular tan estricta como las CdMTs. Sin embargo, sí que se observan repeticiones de la siguiente secuencia consenso: $CKCX_{2-5}CXC$, donde en algunos casos el aminoácido lisina (K) es sustituido por otros aminoácidos (Díaz *et al.*, 2007; Gutiérrez *et al.*, 2011) (Fig. 17).

En la Fig. 71 se muestra un árbol filogenético construido con las secuencias de los ARNr 18S de las especies de *Tetrahymena* de las que se conoce alguna MT (los números de acceso del GenBank (NCBI) de estas secuencias aparecen recogidos en la Tabla A4 del Anexo I). En este árbol se separa claramente el grupo *Borealis* del grupo *Australis*. Aunque actualmente se conocen pocas especies del grupo *Australis* en las que se hayan identificado CdMTs, se aprecia cierta prevalencia en ellas de una estructura bimodular o trimodular. Por otro lado, en las CdMTs de las especies del grupo *Borealis* predomina claramente la estructura trimodular (Fig. 71). En definitiva, el hecho de que la estructura trimodular sea la configuración preferente entre las diferentes especies de *Tetrahymena* sugiere que la CdMT ancestral del género *Tetrahymena* a partir de la cual surgieron las demás isoformas que actualmente conocemos podría haber tenido también una estructura trimodular.

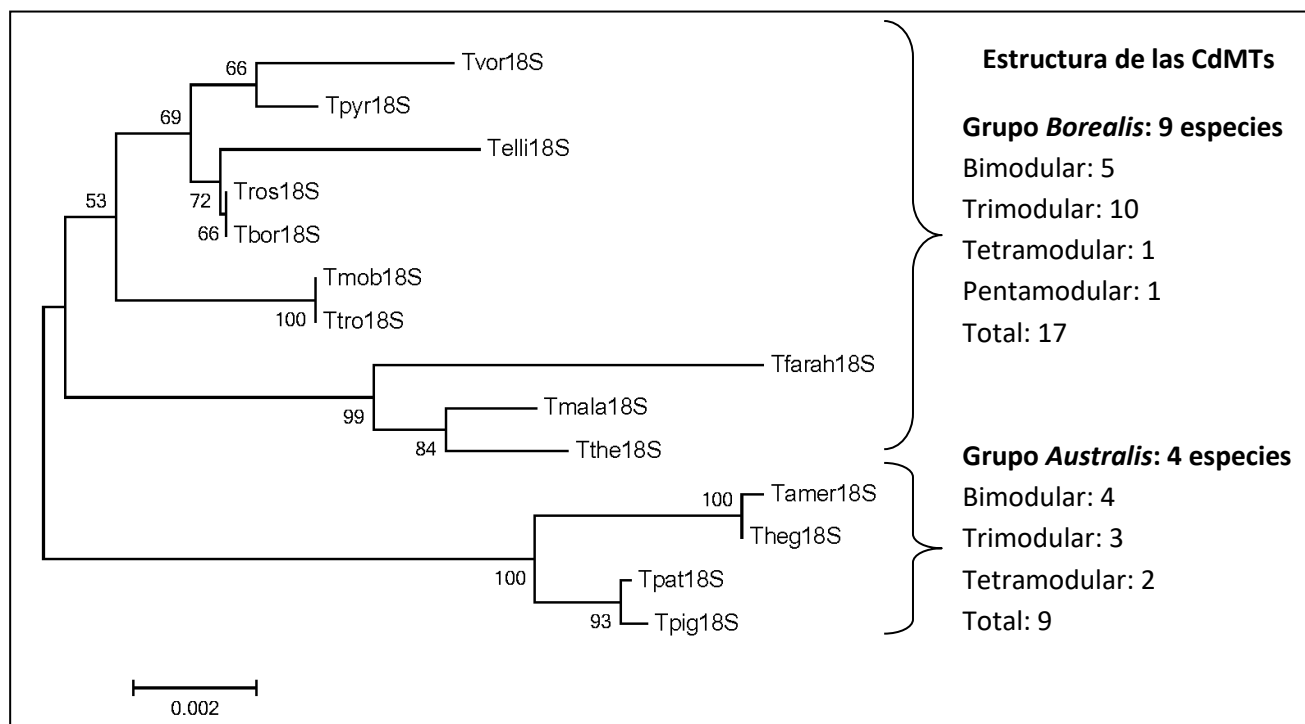


Fig. 71. Árbol filogenético construido con las secuencias de los ARNr 18S de las especies de *Tetrahymena* en las que se ha descrito alguna MT. Se indica a qué grupo (*Borealis* o *Australis*) pertenece cada una de las especies incluidas, así como el número de CdMTs según el número de módulos que contienen. Este árbol filogenético se construyó con el programa MEGA 5.01, utilizando el método Neighbor-Joining. En los nodos del árbol se indican los valores *bootstrap* tras 2.000 repeticiones. La longitud de cada rama se indica mediante la escala establecida. Tvor: *T. vorax*, Tpyr: *T. pyriformis*; Telli: *T. elliotti*, Tros: *T. rostrata*, Tbor: *T. borealis*, Tmob: *T. mobilis*, Tro: *T. tropicalis*, Tfarah: *T. farahensis*, Tmala: *T. malaccensis*, Tthe: *T. thermophila*, Tamer: *T. americanis*, Theg: *T. hegewischi*, Tpat: *T. patula*, Tpig: *T. pigmentosa*.

La duplicación génica es uno de los principales mecanismos evolutivos implicados en la creación de nuevos genes. De hecho, el origen evolutivo de los genes MTs de muy diferentes organismos (que suelen presentar repeticiones periódicas en su secuencia), se ha fundamentado en duplicaciones génicas (Valls *et al.*, 2001; Bargelloni *et al.*, 1999; Maroni *et al.*, 1987). La estructura modular/submodular de las CdMTs junto con la existencia de patrones de cisteína altamente conservados en las CuMTs parecen sugerir que, en el proceso evolutivo de las MTs de *Tetrahymena*, fueron claves los procesos de duplicación génica (con o sin deleciones) y una posterior divergencia. Concretamente, en Gutiérrez *et al.*, 2009 se elaboró un modelo para intentar explicar la historia evolutiva de las MTs de *Tetrahymena*. Según este modelo, ambas familias de MTs podrían haber surgido a partir de un ancestro común que estaría compuesto por un módulo con el motivo C₃X₆ (la mitad de un sm1) más la región de 10 aminoácidos C-terminal (CXCX₂CXCCX). Este módulo ancestral podría haber sufrido repetidas o sucesivas duplicaciones parálogas intragenéticas que se mantuvieron o fijaron en el genoma a lo largo de la evolución dependiendo de las condiciones ambientales (como son los episodios de contaminación metálica gradual), creando así nuevas isoformas de MTs en este ciliado que desarrollaría una mayor y más diversa capacidad funcional.

Discusión

En *T. thermophila*, dos de sus genes codificantes de CdMTs (*MTT1* y *MTT3*) se localizan en el brazo largo del cromosoma 4 micronuclear a sólo 1,7 Kb de distancia entre sí y sus dos isoformas de CuMTs (*MTT2* y *MTT4*) se encuentran una al lado de la otra en el brazo derecho del cromosoma 2 micronuclear (Díaz *et al.*, 2007) (Fig. 72). De esta misma forma, algunas de las nuevas isoformas de MTs descritas en *T. borealis*, *T. elliotti* y *T. malaccensis* también aparecen agrupadas y cercanas en los mismos subfragmentos cromosómicos (Fig. 72). La localización en la misma región cromosómica de estas isoformas corrobora su origen por procesos de duplicación génica y posterior divergencia.

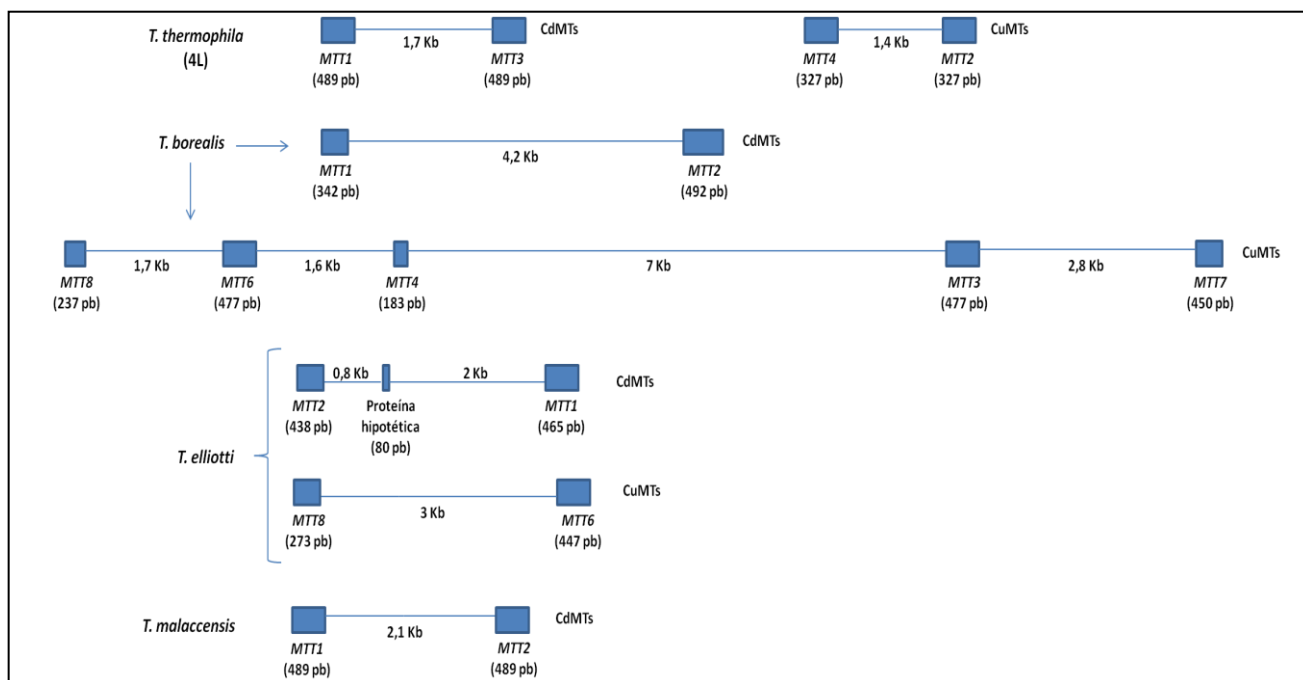


Fig.72. Esquema de la localización en el mismo subfragmento cromosómico de algunas de las nuevas isoformas génicas codificantes de MTs aisladas en *T. borealis*, *T. elliotti* y *T. malaccensis*. *T. thermophila* se utiliza como especie de referencia en la que también aparecen algunas de sus isoformas de MTs cercanas en el mismo subfragmento. Se indica el tamaño (pb) de las ORFs y las distancias (Kb) entre ellas.

Como se muestra en la Fig. 72, las CdMTs *TborMTT1* y *TborMTT2* se localizan en el mismo fragmento cromosómico a una distancia de $\approx 4,2$ Kb. Las cinco isoformas de CuMTs de esta misma especie se encuentran localizadas también en tándem siguiendo este orden: *TborMTT8* - *TborMTT6* - *TborMTT4* - *TborMTT3* - *TborMTT7* (Fig. 72). Según el árbol filogenético mostrado en la Fig. 69A, la isoforma *MTT8* se origina a partir de la *MTT4* y la *MTT7* parece originar la *MTT6* y la *MTT3*, existiendo así una conexión evolutiva entre ellas, corroborada por su localización en el mismo fragmento cromosómico.

En *T. elliotti*, las CuMTs *TelliMTT6* y *TelliMTT8* se localizan en el mismo subfragmento cromosómico a ≈ 3 Kb de distancia entre sí. Según el árbol filogenético (Fig. 69A) la *TelliMTT8* podría haber originado a la *TelliMTT6*. Igualmente, las CdMTs *TelliMTT1* y *TelliMTT2* se

encuentran también muy próximas entre sí (a 2,8 Kb), aunque entre ambas hay un gen denominado EI7_09154.1 que codifica una proteína hipotética aún no identificada (según la web *Tetrahymena Genome Database*). Según el mismo árbol (Fig. 69A) estas dos isoformas de CdMTs (*MTT1* y *MTT2*) son muy similares y tienen un origen común.

Finalmente, en *T. malaccensis* los genes codificantes de las CdMTs *TmalaMTT1* y *TmalaMTT2* se localizan también contiguos en el mismo subfragmento cromosómico a una distancia de $\approx 2,1$ Kb (Fig. 72). También en este caso ambas MTs están cercanas en el árbol filogenético mostrado en la Fig. 69A y la *MTT1* parece haber surgido a partir de la *MTT2*. Estas localizaciones prueban el origen por duplicación paráloga de estas isoformas génicas en cada especie.

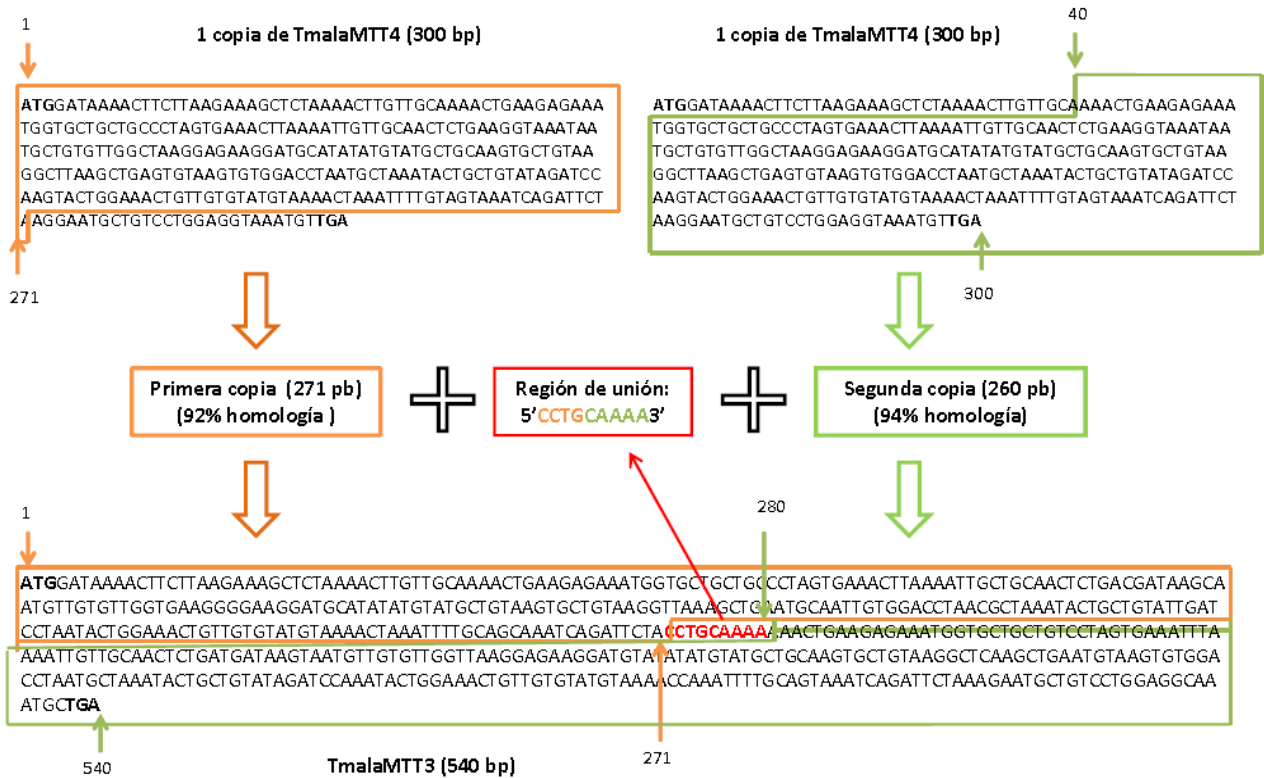
Además, como se muestra en el esquema de la Fig. 73, dos copias del gen *TmalaMTT4* (300 pb) parecen haber participado en la creación del gen *TmalaMTT3* (540 pb) mediante un proceso de recombinación que tendría lugar entre una región de 29 pb del extremo 3' de la primera copia del gen *TmalaMTT4* y una región de 40 pb del extremo 5' de una segunda copia del mismo gen, existiendo la pérdida o eliminación de una región de 60 pb en la zona de unión de ambas copias. Por lo tanto, el gen *TmalaMTT3* está compuesto por una primera copia incompleta del gen *TmalaMTT4* (271 pb), una región de unión originada tras el proceso de recombinación y eliminación (compuesta por 9 pb, de los cuales 4 pertenecen al extremo 3' de la primera copia y 5 al extremo 5' de la segunda copia invertida) y una segunda copia incompleta del gen *TmalaMTT4* (260 pb). A lo largo del tiempo, las dos copias incompletas del gen *TmalaMTT4* que constituyen el gen *TmalaMTT3* han ido diversificándose y ya no son idénticas a la copia original, presentando con ella una homología del 92 y 94%, respectivamente (Fig. 73).

A.2.4. Asimetría en el uso de los codones que codifican el aminoácido glutamina: implicaciones filogenéticas

Otro aspecto que diferencia las Cd- de las CuMTs del género *Tetrahymena* es el uso preferente de diferentes codones para codificar el aminoácido glutamina (Q) (Gutiérrez *et al.*, 2009). Recientemente, se ha comprobado que las glutaminas son residuos importantes en las MTs porque también participan en el mantenimiento de la estabilidad del complejo metal-proteína, aunque no intervienen directamente en la coordinación con el metal (Chiera *et al.*, 2013). Los ciliados presentan un código genético particular donde los codones UAA y UAG, que son codones stop universales, codifican glutamina, siendo el codón UGA es el único codón stop en estos microorganismos eucariotas (Lozupone *et al.*, 2001; Tourancheau *et al.*, 1995). Todas las secuencias aminoacídicas de las MTs de *Tetrahymena* (excepto la TpyrMT-1) contienen algún residuo de Q (desde 2 en TborMTT4 hasta 17 en ThegMT-4) (Tabla 39). En general, las CdMTs tienen más residuos de Q que las CuMTs (un 40% más). Del análisis de secuencias disponibles hasta el año 2009 (Gutiérrez *et al.*, 2009), se infería que en las CuMTs de *Tetrahymena* las Q se codificaban exclusivamente por el codón CAA. Sin embargo, tras introducir 10 nuevas CuMTs de ciliados, vemos que esta afirmación ya no es correcta puesto que en algunas CuMTs aparecen otros codones que también codifican Q (Tabla 39).

Discusión

A



B

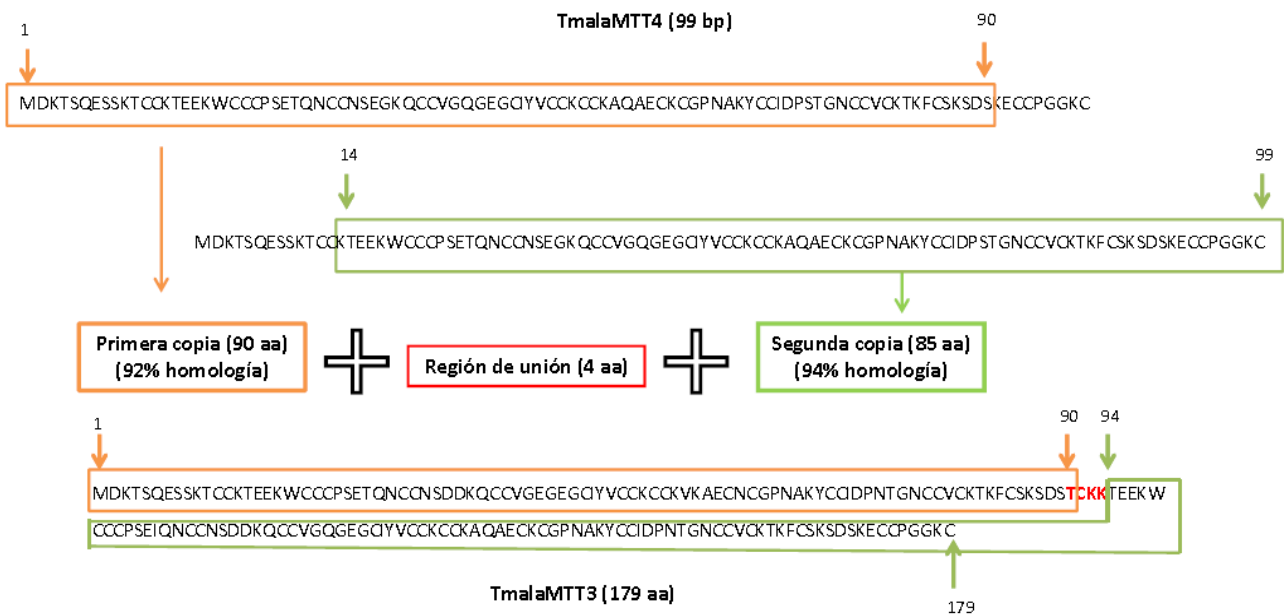


Fig. 73. Representación esquemática del posible origen de la CdMT *TmalaMTT3*, formada a partir de la recombinación de dos copias del gen *TmalaMTT4*. **(A):** Esquema de las secuencias nucleotídicas. **(B):** Esquema de las secuencias aminoacídicas. En los recuadros naranja y verde se identifican las partes de cada una de las copias de la *TmalaMTT4* (primera y segunda, respectivamente) que forman parte de la *TmalaMTT3*. Se indica el nucleótido o aminoácido de inicio y fin de cada una de las copias. En rojo se señala la región de unión entre ambas copias.

Tabla 39. Distribución de los codones de glutamina (Q) en ambas subfamilias de MTs de *Tetrahymena*

CdMT	Codones que codifican glutamina (Q)				Número total de Q en cada especie
	CAA	UAA	UAG	CAG	
TpigMT-1	3	1	0	0	4
TpyrMT-1	0	0	0	0	0
TpyrMT-2	2	10	2	0	14
TtheMTT1	2	4	1	0	7
TtheMTT3	2	5	1	1	9
TtheMTT5	2	1	0	0	3
TrosMTT1	2	2	0	0	4
TtroMTT1	3	1	0	0	4
TmobMT1	4	1	0	0	5
TvorMT1	4	0	0	0	4
ThegMT1	2	2	0	0	4
ThegMT2	2	4	2	0	8
ThegMT3	1	3	0	1	5
ThegMT4	1	10	5	1	17
TborMTT1	2	4	0	0	6
TborMTT2	3	3	1	0	7
TelliMTT1	1	6	2	0	9
TelliMTT2	3	5	3	0	11
TmalaMTT1	1	5	1	0	7
TmalaMTT2	3	3	1	0	7
TmalaMTT3	2	5	0	0	7
TmalaMTT4	0	5	0	0	5
TpatMTT1	2	4	1	0	7
TpatMTT2	2	4	5	0	11
TamerMTT1	1	4	1	0	6
TamerMTT2	2	4	1	0	7
Total (%)*	52 (29,21%)	96 (53,93%)	27 (15,17%)	3 (1,69%)	178 (100%)
CuMT	CAA	UAA	UAG	CAG	Número total de Q en cada especie
TpigMT-2	6	0	0	0	6
TtheMTT2	4	0	0	0	4
TtheMTT4	4	0	0	0	4
TrosMTT2	5	0	0	0	5
TtroMT1	5	0	0	1	6
TtroMT2	2	0	1	1	4
TfarCuMT	3	2	2	0	7
TelliMTT6	5	1	0	0	6
TelliMTT8	3	2	0	0	5
TmalaMTT5	3	1	0	0	4
TborMTT3	4	7	2	0	13
TborMTT4	2	0	0	0	2
TborMTT6	4	7	2	0	13
TborMTT7	5	2	1	0	8
TborMTT8	5	0	0	0	5
TamerMTT3	4	0	0	0	4
ImMTT2	1	9	0	0	10
Total (%)*	65 (61,32%)	31 (29,24%)	8 (7,55%)	2 (1,89%)	106 (100%)

Las nuevas MTs aportadas en este trabajo se indican en naranja. (*): número total de residuos de Q codificados por cada tipo de codón y porcentaje de los mismos.

Discusión

Aunque el codón CAA es el predominante (61,32%) en las CuMTs, también aparecen otros que codifican este aminoácido: UAA (29,24%), UAG (7,55%) y CAG (1,89%). En el caso de las CdMTs predomina el uso del codón UAA (53,93%) para codificar glutamina. También codifican este aminoácido en menor medida los codones CAA (29,21%), UAG (17,17%) y CAG (1,69%) (Tabla 39). Además, los codones UAA en las CdMTs están preferentemente localizados en las regiones denominadas como "*linkers*" o de unión entre módulos (30,3%) y al final de los submódulos tipo 2 (40,5%). En otras palabras, un 70,8% del total de residuos de Q codificados por el codón stop universal UAA se localizan en la región de unión entre módulos y al final de cada región modular. Teniendo en cuenta la estructura estrictamente modular de las CdMTs podríamos establecer la hipótesis de que las duplicaciones génicas que originaron estas MTs se vieron favorecidas o apoyadas por el cambio (mutación) del significado del codón UAA (originariamente codón de stop) a codón codificante de glutamina. Igualmente, la localización en los extremos de cada unidad modular de estas glutaminas pudo facilitar la recombinación necesaria para la duplicación génica.

En resumen, existe una asimetría en el uso de codones de Q entre ambas subfamilias de MTs de *Tetrahymena*: CdMTs: UAA > CAA > UAG > CAG, mientras que en las CuMTs: CAA > UAA > UAG > CAG (Tabla 45). Este hecho nos permite igualmente diferenciar ambas subfamilias y corrobora el hecho de que las CuMTs son más similares a las MTs estándar, tanto por su patrón de Cys (prevaleciendo la agrupación CXC), su longitud (más similar a la de las MTs clásicas) y el uso predominante del codón CAA para codificar Gln.

Desde un punto de vista filogenético, tal y como han indicado varios autores (Tourencheau *et al.*, 1995; Lozupone *et al.*, 2001; Gutiérrez *et al.*, 2011), las desviaciones en el código genético de ciliados han surgido independientemente varias veces a lo largo de la evolución. Además, si asumimos que estos cambios ocurrieron en los genes de los ARNt (Gln) en un ciliado ancestral que utilizaba el código genético universal, podríamos suponer que las CuMTs de *Tetrahymena* son más antiguas que las CdMTs de este ciliado, ya que utilizan preferentemente el codón estándar y universal CAA frente al UAA, codón de stop universal (Tabla 39). Todo esto encaja con la hipótesis de que inicialmente existían dos linajes de MTs (Cu y Zn-tioneínas) que ya estaban presentes en las primeras fases de la evolución eucariota. En esta etapa evolutiva la principal función de las MTs era la unión de metales esenciales como el Cu o el Zn para el mantenimiento de su homeostasis intracelular. Según esta hipótesis, la aparición y evolución de las MTs no estaría directamente relacionada con la presencia de Cd en el medio, aunque con la evolución de formas de vida superiores, las MTs llegaron a ser indispensables para la protección frente a Cd u otros metales tóxicos, hecho que favoreció la diversificación y especialización funcional de las diferentes isoformas de MTs (Penkowa *et al.*, 2000).

En el proceso evolutivo de las MTs podrían haber tenido lugar tanto fenómenos de convergencia como de divergencia. Estos procesos se ponen de manifiesto claramente al llevar a cabo un análisis comparativo entre las MTs de muchos organismos, ya que existe una gran diversidad estructural entre los diferentes grupos taxonómicos, distinguiéndose hasta 7 familias de MTs (evolución divergente) pero, a la vez, se observa un alto grado de conservación funcional (evolución convergente), manifestada en el elevado grado de conservación de las agrupaciones de cisteínas, siendo el dominio CXC el más abundante entre las MTs de todos los

seres vivos (a excepción de las CdMTs de *Tetrahymena*, en las que esta agrupación es minoritaria).

A.3. Características únicas de las MTs de *Tetrahymena*

Al comparar todas las MTs de *Tetrahymena* con las MTs clásicas de vertebrados observamos que presentan algunas características únicas. En la Tabla 40 se muestran estas características actualizadas tras incorporar las nuevas secuencias MT obtenidas.

Tabla 40. Comparación de algunas características generales de las MTs de *Tetrahymena* con las MTs clásicas de vertebrados

Características	MTs clásicas de vertebrados	CdMTs de <i>Tetrahymena</i>	CuMTs de <i>Tetrahymena</i>
Longitud	25-82 aa	99-193 aa	60-158 aa
% Cys	16-32	24-31	26-30
Agrupación de Cys predominante (% promedio)	CXC (50%)	CCC (32%) XCCX (35%)	CXC (92%)
Aminoácidos aromáticos e histidinas	Presentes en algunos organismos	Presentes ocasionalmente	Presentes ocasionalmente
Capacidad teórica de unión a metal	7 átomos de Cd/molécula 12 átomos de Cu/molécula	8-19 átomos de Cd/molécula	10-26 átomos de Cu/molécula

Las MTs de *Tetrahymena* son excepcionalmente largas (60-193 aa) frente a las MTs estándar (25-82 aa). Concretamente, las CdMTs son aproximadamente un 55% más largas y las CuMTs son un 48% mayores con respecto a las MT estándar (Fig. 70, Tabla 40). Entre las CdMTs destaca por su longitud la ThegMT4 (193 aa) y, entre las CuMTs, las más largas son dos de *T. borealis*: TborMTT3 (158 aa) y TborMTT6 (158 aa) y la ImMTT2 del ciliado *I. multifiliis* (167 aa).

Debido a esta mayor longitud, las MTs de *Tetrahymena* contienen un número total de residuos de Cys muy superior al de las MTs clásicas y, aunque el porcentaje de cisteínas con respecto al resto de los aminoácidos está dentro del rango de las MT estándar, su capacidad teórica de quelación de metal es también mayor (Tabla 40). Esta capacidad teórica de unión a metal se calcula considerando que las MTs de *Tetrahymena* actuarían como las MTs de vertebrados, es decir, que todos los residuos de Cys estarían involucrados en la unión con el metal pesado y, por consiguiente, se les aplicarían las siguientes estequiometrías: $Cd_7(Cys)_{20}$ para las CdMTs y $Cu_{12}(Cys)_{20}$ para las CuMTs (Klaassen *et al.*, 1999). Esta estequiometría ha sido corroborada mediante el análisis de la estructura tridimensional de algunas MTs estándar (Peroza *et al.*, 2009), que podrían unir unos 7 átomos de Cd^{2+} /molécula y unos 12 átomos de Cu^+ /molécula (Tabla 40). Las CdMTs más cortas (TtheMTT5 y TmalaMTT4) son capaces de unir 8 ó 9 átomos de Cd^{2+} /molécula, mientras que las CdMTs más largas (como la TpyrMT-2, que presenta una estructura pentamodular y el mayor contenido en residuos de Cys) podrían unir hasta 19 átomos de Cd^{2+} /molécula (Tabla 41). El valor promedio de átomos de Cd^{2+} que las

CdMTs son teóricamente capaces de unir es de 15 átomos/molécula, más del doble de lo calculado para las MTs estándar (7 átomos/molécula) (Tabla 40). Por otro lado, las CuMTs presentan una capacidad teórica de quelación de Cu^+ de entre 10 átomos/molécula (en el caso de TborMTT4, que es la CuMT de menor longitud) y 32 átomos de Cu^+ /molécula, como es el caso de la ImMTT2 de *I. multifiliis*, actualmente la CuMT con mayor potencial de unión de Cu^+ gracias a su gran longitud (167 aa) y a su elevado número de Cys (54 residuos) (Tabla 41). Por lo tanto, y de igual forma que sucede con las CdMTs, la capacidad teórica de unión de metal de las CuMTs (20 átomos de Cu^+ /molécula como promedio) supera considerablemente a la de las MTs estándar (12 átomos de Cu^+ /molécula) (Tabla 40).

Algunos de estos datos han sido corroborados experimentalmente: en la CdMT TpyrMT-1 se ha constatado la unión de 12 Cd^{2+} por mol de proteína u 11 Cd^{2+} por polipéptido en (Domenech *et al.*, 2008). Igualmente, para la TtheMTT1 y la TtheMTT2 se ha confirmado (Wang *et al.*, 2011) la formación *in vitro* de los siguientes complejos estables: $\text{Cd}_{16}(\text{Cys})_{48}$ y $\text{Cd}_{11}(\text{Cys})_{32}$ respectivamente, que corroboran el valor teórico calculado para estas MTs. También se ha constatado que el Cu^{2+} no puede reemplazar al Cd^{2+} en el complejo formado por la TtheMTT1, pero sí es capaz de reemplazarlo en el caso del complejo formado por la TtheMTT2 (Wang *et al.*, 2011). Este dato confirma de nuevo la clasificación de la TtheMTT1 y la TtheMTT2 como Cd- y CuMT, respectivamente.

Recientemente también se han analizado las capacidades y preferencias de unión de las cinco isoformas de MTs de *T. thermophila* mediante espectrometría de masas por electrospray, dicroísmo circular y espectrofotometría UV-vis (Espart *et al.*, 2015). De este estudio se concluyó que las isoformas TtheMTT1 y TtheMTT5 unen de manera óptima 17 y 8 átomos de Cd^{2+} respectivamente, corroborándose así la capacidad teórica calculada de unión al Cd^{2+} de las mismas (Tabla 41). Por otro lado, la CdMT MTT3 mostró una baja afinidad tanto por el Cd^{2+} como por el Cu^+ , obteniéndose una mayor afinidad en los ensayos de quelación de Zn^{2+} . Este resultado se correspondería con los datos obtenidos por RT-PCR cuantitativa por Díaz y colaboradores (2007), en los que se muestra una inducción preferente del gen *MTT3* por el Zn^{2+} . En cuanto a las CuMTs de *T. thermophila* (TtheMTT2 y TtheMTT4), se detectó la formación de complejos homo-metálicos de Cu^+ , principalmente con 20 átomos de Cu^+ /molécula (Espart *et al.*, 2015). Este valor es muy próximo al calculado teóricamente (19 Cu^+ /molécula) (Tabla 41). Sólo se encontraron complejos de Zn en el caso de la TtheMTT4, que únicamente se diferencia de la TtheMTT2 en la posición de un aminoácido (Asn^{89} / Lys^{89}). Es interesante observar como el cambio en un solo aminoácido provoca una mayor afinidad por los iones de Cu^+ en la TtheMTT2 (Asn) frente a la TtheMTT4 (Lys) (Espart *et al.*, 2015). Esta característica también ha sido descrita en MTs del caracol *Cantareus aspersus*, que según presentan el aminoácido Lys o Asn en una determinada posición se inclinan más a actuar como Zn/CdMTs o CuMTs, respectivamente (Pérez-Rafael *et al.*, 2014).

Tabla 41. Capacidad de unión a metal (Cd^{2+} o Cu^{+}) de las Cd- y CuMTs de diferentes especies de *Tetrahymena* y de *I. multifiliis*

CdMTs	Nº átomos de Cd^{2+} /molécula	CuMTs	Nº átomos de Cu^{+} /molécula
TpigMT-1	12 (11-12)	TpigMT-2	17
TpyrMT-1	11	TtheMTT2	19 (20)
TpyrMT-2	19	TtheMTT4	19 (20)
TtheMTT1	17 (17)	TrosMTT2	13
TtheMTT3	15	TtroMT1	17
TtheMTT5	8 (8)	TtroMTT2	19
TrosMTT1	12	TfarCuMT	19
TtroMTT1	16	TelliMTT6	26
TmobMT1	18	TelliMTT8	16
TvorMT1	17	TmalaMTT5	19
ThegMT1	12	TborMTT3	26
ThegMT2	17	TborMTT4	10
ThegMT3	18	TborMTT6	26
ThegMT4	18	TborMTT7	25
TborMTT1	12	TborMTT8	13
TborMTT2	17	TamerMTT3	19
TelliMTT1	16	ImMTT2	32
TelliMTT2	15	PROMEDIO	≈20
TmalaMTT1	17		
TmalaMTT2	15		
TmalaMTT3	16		
TmalaMTT4	9		
TpatMTT1	12		
TpatMTT2	14		
TamerMTT1	11		
TamerMTT2	17		
PROMEDIO	≈15		

Se muestran los datos de la capacidad teórica de unión a metal para cada MT. Entre paréntesis se indican algunos de los valores de la capacidad real de unión al metal, calculados experimentalmente. En naranja se destacan las nuevas MTs obtenidas en este trabajo. Los valores teóricos se calculan a partir de la estequiometría: $Cd_7(Cys)_{20}$ para las CdMTs y $Cu_{12}(Cys)_{20}$ para las CuMTs.

Otra de las peculiaridades de las MTs de *Tetrahymena* es la presencia ocasional de aminoácidos aromáticos e histidinas (His) frente a la menor presencia de este tipo de aminoácidos en las MTs de vertebrados (Tabla 40 y 42). En las CdMTs (subfamilia 7a) sólo está presente la His en dos de las 26 secuencias descritas: TpatMTT2, con un residuo de His y TtheMTT3, que presenta dos His. Las His son más frecuentes en el caso de las CuMTs (subfamilia 7b), donde TtheMTT2, TtheMTT4, TtropMT2, TfarCuMT, TamerMTT3, TelliMTT8 y TmalaMTT5 presentan un residuo de His y TelliMTT6 contiene hasta dos His (Tabla 42). Por lo tanto, del total de las 43 MTs descritas en ciliados, sólo el ≈ 23% contiene algún residuo de His y son las CuMTs las que tienen más secuencias con His (≈ 47%) respecto de las CdMTs (≈ 8%). En cuanto a la cantidad de residuos de His por secuencia de MT, ésta oscila entre 1 ó 2 residuos, al igual que en la mayoría de organismos que presentan His en sus MTs (Tabla 42). Algunas excepciones se observan en las MTs del gusano *Caenorhabditis elegans*, que tiene hasta 4 residuos de His o del hongo filamentoso *Agaricus bisporus*, con 3 His. En contraposición, ninguna de las MTs de mamíferos analizadas contiene un residuo de His y, de

Discusión

entre todas las MTs de vertebrados seleccionadas, sólo la MT-A del anfibio *Xenopus laevis* contiene un único residuo de este aminoácido (Tabla 42).

Tabla 42. Número de residuos de histidina presentes en las MTs de diferentes grupos taxonómicos

MT	Organismo	Grupo taxonómico	Nº Histidinas (%)
PaerMT	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	γ-Proteobacteria	2 (2,53)
TvulMT-NA	<i>Thermosynechococcus vulcanus</i>	Cianobacteria	2 (3,51)
SmtA	<i>Synechococcus</i>	Cianobacteria	3 (13,64)
AbisMT	<i>Agaricus bisporus</i>	Hongo filamentoso	3 (5,08)
Mmt1	<i>Magnaporthe grisea</i>	Hongo filamentoso	1 (4,55)
ScerCuMT	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Levadura	2 (2,90)
Cup1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Levadura	1 (1,64)
YlipMT	<i>Yarrowia (Candida) lipolytica</i>	Levadura	1 (1,82)
MeduMT-10-Ia	<i>Mytilus edulis</i>	Molusco bivalvo	0 (0)
CvirMT-IVB	<i>Crassostrea virginica</i>	Molusco bivalvo	1 (1,2)
HamerMT-1	<i>Homarus americanus</i>	Crustáceo	0 (0)
CsapMT-1	<i>Callinectes sapidus</i>	Crustáceo	0 (0)
CsapMT-2	<i>Callinectes sapidus</i>	Crustáceo	0 (0)
DmelMT-1	<i>Drosophila melanogaster</i>	Insecto	0 (0)
CeleMT-1	<i>Caenorhabditis elegans</i>	Nematodo	4 (5,33)
EfetMT	<i>Eisenia foetida</i>	Anélido	0 (0)
SpurMT-A	<i>Strongylocentrotus purpuratus</i>	Equinoideo	0 (0)
TaesMT-1	<i>Triticum aestivum</i>	Planta	2 (2,47)
ZmaysMT-1	<i>Zea mays</i>	Planta	2 (2,60)
AthaMT-1A	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Planta	0 (0)
NcorMT-A	<i>Notothenia coriiceps neglecta</i>	Pez	0 (0)
DrerMT-1	<i>Danio rerio</i>	Pez	0 (0)
XlaeMT-A	<i>Xenopus laevis</i>	Anfibio	1 (1,61)
HsapMT-1A	<i>Homo sapiens</i>	Mamífero	0 (0)
HsapMT-1F	<i>Homo sapiens</i>	Mamífero	0 (0)
HsapMT-2	<i>Homo sapiens</i>	Mamífero	0 (0)
PtroMT-1X	<i>Pan troglodytes</i>	Mamífero	0 (0)
RratMT-2	<i>Rattus rattus</i>	Mamífero	0 (0)
MmusMT-1	<i>Mus musculus</i>	Mamífero	0 (0)
EcabMT-1A	<i>Equus caballus</i>	Mamífero	0 (0)
OcunMT-2A	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	Mamífero	0 (0)
SscroMT-1C	<i>Sus scrofa</i>	Mamífero	0 (0)
TtheMTT3	<i>Tetrahymena thermophila</i>	Ciliado	2 (1,23)
TpatMTT2	<i>Tetrahymena patula</i>	Ciliado	1 (0,68)
TtheMTT2	<i>Tetrahymena thermophila</i>	Ciliado	1 (0,91)
TtheMTT4	<i>Tetrahymena thermophila</i>	Ciliado	1 (0,91)
TtropMT2	<i>Tetrahymena tropicalis</i>	Ciliado	1 (0,91)
TfarCuMT	<i>Tetrahymena farahensis</i>	Ciliado	1 (0,93)
TelliMTT6	<i>Tetrahymena ellioti</i>	Ciliado	2 (1,35)
TelliMTT8	<i>Tetrahymena ellioti</i>	Ciliado	1 (1,11)
TmalaMTT5	<i>Tetrahymena malaccensis</i>	Ciliado	1 (0,91)
TamerMTT3	<i>Tetrahymena americanis</i>	Ciliado	1 (0,93)
ImMTT2	<i>Ichthyophthirius multifiliis</i>	Ciliado	1 (0,60)

Se muestran exclusivamente las MTs del género *Tetrahymena* que contienen el aminoácido His en su secuencia aminoácídica. En naranja se señalan las nuevas MTs descritas en este estudio.

Inicialmente se creía que, en general, las MTs carecían de aminoácidos aromáticos e histidinas debido a que éstos habían ido perdiendo importancia a lo largo de la evolución de estas proteínas, cada vez más largas y con un mayor contenido en residuos de Cys. Sin embargo, estudios posteriores han demostrado que las His tienen, en las MTs de algunos organismos, un papel muy importante: estabilizar la unión proteína-metal, reduciendo la carga global y favoreciendo la organización estructural del complejo (Blindauer, 2008). También, se suele relacionar la presencia de residuos de His con la capacidad de la MT para unir Zn^{2+} , gracias a los anillos imidazol presentes en este aminoácido. Un ejemplo de ello es la MT Mmt1 del hongo patógeno del arroz *Magnaporthe grisea*, que ha sido caracterizada como una MT de unión a zinc, proceso en el que parecen contribuir sus residuos de His (Tucker *et al.*, 2004). Igualmente, en la MT SmtA de la cianobacteria *Synechococcus spp.*, los residuos de His (H^{40} y H^{49}) parecen ser los responsables de unir dos iones de Zn^{2+} o Cd^{2+} (Daniels *et al.*, 1998). Algo parecido podría ocurrir con la CdMT TtheMTT3 de *T. thermophila*, clasificada dentro de la subfamilia 7a pero con una mayor afinidad por el Zn frente al Cd (Espart *et al.*, 2015), probablemente debido a los dos residuos de His que presenta.

Todos estos datos parecen confirmar que la histidina puede actuar como ligando del zinc, aumentando la afinidad relativa por este metal esencial frente al Cd^{2+} . Por lo tanto, MTs con His podrían relacionarse con el mantenimiento de la homeostasis del Zn^{2+} , liberando este metal esencial cuando la célula lo requiera y regulando la concentración intracelular del mismo. En el año 2001 se introdujo una nueva propuesta de clasificación de las MTs basada en características estequiométricas, espectroscópicas y espectrométricas de estas proteínas cuando se unen a los metales esenciales Zn^{2+} o Cu^+ (Valls *et al.*, 2001). En base a ello se propusieron dos categorías diferentes: las ZnMTs, que mantienen unido el Zn^{2+} cuando se pliegan *in vivo* aún en presencia de altas concentraciones de Cu^+ en el medio y las CuMTs, que son capaces de mantener unido el Cu^+ bajo las mismas condiciones. Se puede establecer un rango de preferencias desde aquellas que son genuinamente ZnMTs y aquellas que son CuMTs, hasta aquellas otras que mantienen posiciones intermedias, no mostrando una clara preferencia por Zn^{2+} o Cu^+ . Un ejemplo de genuina ZnMT es la CeleMT-1 de *C. elegans*, que presenta una clara función en la homeostasis del Zn^{2+} y contiene 4 residuos de His (Tabla 42). Por otro lado, una genuina CuMT podría ser la Cup1 de la levadura *S. cerevisiae*, que tiene sólo un residuo de His (Tabla 42).

Otra característica general de las MTs es la gran asimetría que existe en la proporción de determinados aminoácidos en sus secuencias, como son la lisina (Lys) y la arginina (Arg), ambos con carga positiva a pH fisiológico. Generalmente, los residuos de Lys son mucho más abundantes que los de Arg y esta asimetría ($Lys \gg Arg$) se observa en todas las MTs descritas hasta la actualidad. En las MTs de ciliados los residuos de Arg están prácticamente ausentes: entre las CdMTs, sólo TtheMTT3 y ThegMT2 contienen un residuo de Arg cada una y, en el caso de las CuMTs, sólo TborMTT3 e ImMTT2 contienen 1 ó 2 Arg, respectivamente. En estos casos excepcionales, la localización de los residuos de Arg es la misma que la de los residuos de Lys en el resto de las MTs de ciliados. Estos dos aminoácidos (Lys y Arg), al estar cargados positivamente y mayoritariamente expuestos en la superficie de la proteína, presentan un papel muy importante en el mantenimiento de la estabilidad de la misma mediante la formación de interacciones electrostáticas. La arginina forma un mayor número de interacciones que la lisina. Este hecho se ha comprobado mediante algunos experimentos en

los que se intercambiaron los residuos de Lys por Arg en la superficie de la proteína verde fluorescente (GFP). En ellos se observó que la proteína mantenía su actividad y, además, la variable de la GFP con Arg era mucho más estable que la que tenía Lys en presencia de urea, pH básico o detergentes iónicos. Sin embargo, la estabilidad térmica de la proteína era similar que la de la GFP control (Sokalingam *et al.*, 2012). Por otro lado, se ha observado que las proteínas con elevada solubilidad, altos niveles de expresión y abundantes niveles intracelulares presentan una mayor ratio entre el contenido de Lys vs. Arg (Warwicker *et al.*, 2014). Por consiguiente, las MTs requieren un elevado número de Lys y muy pocas o ninguna Arg por molécula para favorecer su mayor solubilidad, evitando así la formación de agregados de proteínas, y unos mayores niveles intracelulares (mayor expresión) que les permitan responder con rapidez al estrés inducido por la presencia de metal en el medio.

A.4. Análisis de los ADNc de las nuevas MTs aisladas de especies del género *Tetrahymena*

La mayoría de las MTs descritas en el género *Tetrahymena* han sido aisladas como ADNc (las secuencias de las nuevas MTs descritas en este trabajo están recogidas en el Anexo II). Tras comparar los ADNc con las secuencias de ADN genómico correspondientes, se ha podido confirmar la ausencia de intrones en los ORFs de todos los genes que codifican estas MTs (Gutiérrez *et al.*, 2011). En general, lo más habitual es que los genes MTs sí contengan intrones (Leignel *et al.*, 2008). Por ejemplo, los genes MTs de vertebrados presentan una estructura formada por tres exones y dos intrones (Samson and Gedamu, 1998). Sin embargo, aunque no son muy frecuentes, también se han descrito genes MTs sin intrones en algunos bivalvos marinos, en los que se ha propuesto que esta adaptación génica permite una transcripción más rápida en respuesta a la presencia de metales (Leignel *et al.*, 2005). En otros organismos modelo (*Arabidopsis thaliana*, *Mus musculus*, *S. cerevisiae* o *Schizosaccharomyces pombe*) se ha observado que aquellos genes que se expresan rápidamente en respuesta a diferentes tipos de estrés tienen un bajo contenido en intrones. La presencia de intrones parece retrasar la respuesta celular al estrés debido a que éstos tendrían que ser transcritos y posteriormente eliminados (procesamiento postranscripcional), suponiendo además un mayor gasto energético (Jeffares *et al.*, 2008). Quizá por esta razón los genes MTs de *Tetrahymena* carecen de intrones, permitiendo así una expresión más rápida. Por ejemplo, el gen de la CdMT *TpigMT-1* aumenta su expresión diez veces en sólo 30 minutos de exposición a Cd²⁺ (Boldrin *et al.*, 2002), y, con ello, se facilita la supervivencia del microorganismo ante la presencia de metal.

Una excepción a la ausencia general de intrones en los genes MTs de ciliados se observa en el gen *MTT5* de *T. thermophila*, que contiene un intrón en su región no codificante 3' UTR. La existencia de ARN mensajeros del gen *MTT5* con y sin este intrón, dependiendo del estado celular en el que se encuentre este microorganismo, constituye el primer caso de *splicing* alternativo descrito en *T. thermophila* (Díaz *et al.*, 2007). Otro caso de *splicing* alternativo se ha descrito en el ciliado *Euplotes raikovi* (Miceli *et al.*, 1992), en el que este procesamiento determina si la feromona sexual codificada por el gen *Er-1* permanece unida o no a la superficie celular. El intrón presente en la región 3'UTR del transcrito *MTT5* elimina dos posibles motivos de degradación del ARNm, dejando otros dos intactos. La región que es

eliminada contiene una horquilla (estructura secundaria del transcrito) que podría estar involucrada en la localización citoplasmática del ARNm. Un caso similar aparece en una MT de rata (Nury *et al.*, 2005) y es responsable de su localización en la región perinuclear. La localización intracelular de los ARNms es un mecanismo eucariota que facilita la biosíntesis de la proteína cerca del lugar en donde ejercerá su función (Jansen, 2001).

En la base de datos *Tetrahymena Comparative Database* (Broad Institute, Cambridge, USA), la MTT3 de *T. malaccensis* (registrada como proteína hipotética con el número de acceso EIA_07390.2) muestra un posible intrón de 60 pb. Sin embargo, la secuencia de ADNc incorporada en este trabajo [Gene Bank: KU167648] no lo identifica como un intrón, sino como parte codificante de la propia secuencia. Tras un estudio más detallado, confirmamos que lo que en esta base de datos se considera como un intrón realmente se corresponde con la secuencia del sm1 del segundo módulo de la *TmalMTT3*. Esta región mantiene perfectamente la secuencia consenso de todas las CdMTs de *Tetrahymena* y, por lo tanto, no es realmente un intrón. Sin embargo, los autores de la base de datos han debido confundir esta secuencia con un intrón ya que empieza por GT, termina por AG y tiene un elevado porcentaje de A+T (68,3%), al igual que ocurre en la secuencia consenso que define los extremos de un intrón (5' GTAAG/TAG 3'). Por consiguiente, confirmamos que la isoforma *MTT3* de *T. malaccensis* no tiene ningún intrón en su región codificante.

En general, los genes codificantes de MTs se regulan a nivel transcripcional (Wilson *et al.*, 1998; Miles *et al.*, 2000). En vertebrados, plantas y algunos invertebrados como *Drosophila melanogaster* (Zhang *et al.*, 2001), la inducción de la expresión de las MTs por metales implica la unión del factor de transcripción MTF-1 a los motivos MREs (*Metal Responsive Elements*). El factor MTF-1 contiene seis dedos de Zn con los que puede unirse a los elementos MREs del ADN (Carpène *et al.*, 2007), localizados en multicopia a lo largo de los promotores de estos genes MTs (Haq *et al.*, 2003). Sin embargo, a pesar de que el genoma de *T. thermophila* contiene numerosas proteínas con dedos de Zn, ninguna de ellas parece ser un ortólogo del factor MTF-1 ni se han identificado motivos MREs (Díaz *et al.*, 2007). Por el contrario, otros investigadores han identificado *in silico* la presencia de hipotéticos motivos MREs y AREs (*Antioxidant Response Elements*) en los promotores de varios genes MTs de *T. pigmentosa* (Boldrin *et al.*, 2002), aunque ninguno de ellos ha sido identificado experimentalmente.

Ante la ausencia de motivos MREs canónicos en los promotores de los genes MTs del género *Tetrahymena*, creemos que la expresión de estos genes podría estar mediada por otros factores de transcripción distintos a MTF-1 (Díaz *et al.*, 2001). El análisis *in silico* de la región 5' UTR del gen *TtheMTT5* permitió identificar 13 copias de un motivo conservado denominado MTCM1 (*Metallothionein Conserved Motif 1*), que presenta la secuencia consenso: 5' GTGTGAATCATGAGT 3' (Díaz *et al.*, 2007). Este motivo también ha sido descrito en los promotores de las otras dos CdMTs de *T. thermophila*: *TtheMTT1* (en la que se han identificado 6 copias del motivo MTCM1) y *TtheMTT3* (con dos copias de MTCM1). Este mismo motivo también está presente en la región promotora de la *TpyrMT-1* (5 copias) (Díaz *et al.*, 2007) y se ha identificado en la mayoría de las nuevas MTs descritas en este trabajo. Por ello, creemos que podría tener una función importante en la regulación de la expresión de estos genes MTs.

Muchas de las copias del motivo MTCM1 incluyen la secuencia consenso 5' TGANTCA 3', siendo "N" cualquier nucleótido. Esta secuencia consenso es similar a la secuencia: 5' TGA(G/C)TCA 3', a la que se unen los factores de transcripción del tipo AP-1. Los factores AP-1 también se conocen como c-jun y son miembros de la superfamilia bZIP (*basic region leucine zipper*) de factores de transcripción en eucariotas. En *S. cerevisiae* se conoce un factor AP-1 (llamado YAP-1) que está involucrado en la respuesta frente a metales y estrés oxidativo (Wu *et al.*, 1993). También se han descrito factores de transcripción similares a AP-1 en los promotores de los genes MTs de insectos (*D. melanogaster*) y moluscos (*Crassostrea virginica*) (Jenny *et al.*, 2006). Sabemos que en el genoma de *T. thermophila* existen, al menos, cuatro genes homólogos a AP-1, que podrían ser buenos candidatos para interactuar con los motivos MTCM1 (Gutiérrez *et al.*, 2009). En *T. thermophila*, el ranking de los niveles de inducción relativa (definidos por RT-PCR cuantitativa) de los tres genes que codifican CdMTs es: *TtheMTT5* >> *TheMTT1* > *TtheMTT3* (Gutiérrez *et al.*, 2011). Este ranking se corresponde con el número de motivos MTCM1 presentes en cada promotor (P_{MTT5} : 13 copias >> P_{MTT1} : 6 copias > P_{MTT3} : 2 copias), lo que sugiere que este motivo podría tener una importante función en la regulación de la expresión de estos genes.

A.5. Análisis comparativo de la expresión de genes MTs en diferentes especies de *Tetrahymena*, tras el tratamiento con diferentes agentes estresantes

Las MTs de *Tetrahymena*, al igual que las MTs de otros organismos, se consideran proteínas multiestrés porque son capaces de responder frente a diferentes estímulos o agentes estresantes, tales como: metales, estrés oxidativo, choques térmicos, cambios de pH, períodos de inanición, hormonas, citoquinas y muchos otros compuestos químicos o drogas (Díaz *et al.*, 2007; Amaro *et al.*, 2008). Por esta razón, y aunque las MTs no son consideradas como esenciales, parecen aportar una serie de ventajas para la supervivencia de los organismos bajo estas situaciones de estrés (Hughes and Sturzenbaum, 2007; Masters *et al.*, 1994).

Las diferencias existentes tanto en las condiciones experimentales como en los protocolos de RT-PCR cuantitativa complican la comparación entre los niveles de inducción obtenidos por distintos investigadores para los genes codificantes de MTs. Sin embargo, a la vista de todos los resultados publicados hasta el momento, incluidos los aportados en este trabajo (Tabla 43), podemos realizar un análisis comparativo aproximado y obtener algunas conclusiones.

En general, las CdMTs del género *Tetrahymena* presentan mayores niveles de inducción tras la exposición a Cd^{2+} respecto de aquellos obtenidos en presencia de otros metales. Por tanto, el Cd^{2+} se sitúa en la primera o segunda posición del *ranking* de inducción relativa en la mayoría de los casos ($\approx 92\%$). Esto mismo ocurre en el caso de las CuMTs, que principalmente se inducen (el 100% de ellas) en presencia de Cu^{2+} . Este patrón de inducción suele mantenerse (aunque no siempre) independientemente de la duración del tratamiento (0,5, 1 ó 24h) (Tabla 43), y corrobora la división de las MTs de *Tetrahymena* en las dos subfamilias: 7a o CdMTs y 7b o CuMTs (Díaz *et al.*, 2007).

Tabla 43. Ranking de los valores de inducción relativa de los genes MTs del género *Tetrahymena* obtenidos mediante el análisis por RT-PCR cuantitativa, tras el tratamiento con distintos metales pesados

Gen	Subfamilia	Ranking de los niveles de inducción relativa ante diferentes metales	Tratamiento	Referencia bibliográfica
<i>TpyrMT-1</i>	CdMT	Cd>Cu>Zn>Hg	1h	Fu and Miao, 2006
<i>TpyrMT2</i>	CdMT	Cd>Cu>Zn>Hg	1h	Fu and Miao, 2006
<i>TtheMTT1</i>	CdMT	Cd>Hg>Cu>Zn Cd>Zn>Pb>Cu>Ni Cd>Pb>As>Cu>Zn>Ni	30 min 1h 24h	Dondero <i>et al.</i> , 2004 Díaz <i>et al.</i> , 2007
<i>TtheMTT3</i>	CdMT	Zn>Cd>Pb>Ni>Cu Cd>Zn>As>Ni>Cu>Pb	1h 24h	Díaz <i>et al.</i> , 2007
<i>TtheMTT5</i>	CdMT	Pb>Cd>Zn>Cu>Ni Pb>As>Cd>Cu>Zn>Ni	1h 24h	Díaz <i>et al.</i> , 2007
<i>TrosMTT1</i>	CdMT	Cd>Pb>As>Cu>Zn Pb>Cd>As>Zn>Cu>Ni	1h 24h	Amaro <i>et al.</i> , 2008
<i>TpigMT-1</i>	CdMT	Hg>Pb>Cd>Cu>Zn	1h	Guo <i>et al.</i> , 2008
<i>ThegMT1</i>	CdMT	Zn>Pb>Cd>Cu Pb>Cd>Zn>Cu	1h 24h	Chang <i>et al.</i> , 2014
<i>ThegMT-2</i>	CdMT	Zn>Cd>Cu>Pb Pb>Zn>Cd>Cu	1h 24h	Chang <i>et al.</i> , 2014
<i>TmalMT1*</i>	CdMT	Cd>Zn>Cu>Pb Cd>Zn>Cu>Pb	1h 24h	Chang <i>et al.</i> , 2014
<i>TmobMT1</i>	CdMT	Cd>Cu>Pb>Zn Cd>Pb>Cu>Zn	1h 24h	Chang <i>et al.</i> , 2014
<i>TborMTT1</i>	CdMT	As>Cd>Pb>Zn>Cu Cd>Pb>As>Zn>Cu	1h 24h	De Francisco <i>et al.</i> , 2016 (Esta tesis doctoral)
<i>TborMTT2</i>	CdMT	Zn>Cd≈Cu>As>Pb Cu>Cd>Pb>Zn>As	1h 24h	De Francisco <i>et al.</i> , 2016 (Esta tesis doctoral)
<i>TrosMTT2</i>	CuMT	Cu>Pb>Cd>Zn>As Cu>Zn>Cd>Pb>Ni	1h 24h	Amaro <i>et al.</i> , 2008
<i>TborMTT7</i>	CuMT	Zn>Cu>>Pb>Cd>As Cu>Zn>>Cd>As>Pb	1h 24h	De Francisco <i>et al.</i> , 2016 (Esta tesis doctoral)
<i>TelliMTT6</i>	CuMT	Cu>Cd>Zn>Pb≈As Cu>>Pb>Cd≈As≈Zn	1h 24h	De Francisco <i>et al.</i> , 2016 (Esta tesis doctoral)
<i>TamerMTT3</i>	CuMT	Cu>Cd>Zn>Pb>As Cu>Cd>As>Zn≈Pb	1h 24h	De Francisco <i>et al.</i> , 2016 (Esta tesis doctoral)
<i>TmalaMTT5</i>	CuMT	Cu>Cd>Zn>Pb≈As Cu>Cd>Pb≈As>Zn	1h 24h	De Francisco <i>et al.</i> , 2016 (Esta tesis doctoral)

(*): En Chang *et al.* (2014) se describe una CdMT en la especie *T. malaccensis*, denominada *TmalMT1*. Esta MT se corresponde con el gen *TmalaMTT1* descrito en este trabajo. *TmalaMTT1* y *TmalaMTT2* presentan un 84% de homología en sus secuencias nucleotídicas y no es posible diseñar cebadores específicos para cada una de ellas de forma que las podamos distinguir. Por esta razón nosotros no llevamos a cabo el análisis de expresión de este gen por RT-PCR cuantitativa. Los resultados de expresión mostrados en Chang *et al.*, 2014 muy probablemente se correspondan a la suma de las expresiones de ambos genes.

En algunas CdMTs, tales como *TtheMTT5* (1 y 24h), *TrosMTT1* (24h), *TpigMT-1* (1h), *ThegMT1* (1 y 24h) y *ThegMT2* (24h), el plomo (Pb^{2+}) se sitúa por delante del cadmio en el *ranking* de inducción (Tabla 43). Las MTs también son inducidas por plomo en otros organismos como ratas, peces o humanos (Church *et al.*, 1993; Cheung *et al.*, 2005), hecho que podría explicarse por la gran similitud que existe entre las estructuras químicas de ambos metales. El plomo es el segundo metal, después del cadmio, capaz de desplazar al Zn^{2+} de su unión con la MT hepática y puede, a su vez, desplazar al cadmio del complejo Cd-MT (Waalkes *et al.*, 1984; Erk and Raspor, 2001). Igualmente, el análisis del transcriptoma de algunas plantas modelo ha revelado que muchos genes responden de manera similar al plomo y al cadmio (Kovalchuk *et al.*, 2005). Por otro lado, algunas CdMTs también se inducen notablemente tras la exposición a arseniato (As^{5+}), que suele ocupar la segunda o tercera posición del *ranking*. Concretamente, el gen *TborMTT1* es el que más se induce con este metaloide: ≈ 300 veces tras 1h de tratamiento con As^{5+} (Tabla 43). La toxicidad del arsénico depende de su forma química y de su estado de oxidación. Se cree que este metal favorece la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), responsables de procesos de peroxidación lipídica y daño genotóxico (Shi *et al.*, 2004). Las MTs son capaces de reducir la toxicidad del arsénico interaccionando directamente con el metal mediante sus grupos tiólicos y neutralizando las ROS generadas por el mismo, actuando así como defensas antioxidantes (Qu and Waalkes, 2015).

Las CdMTs *TtheMTT3*, *ThegMT1*, *ThegMT2* y *TborMTT2* alcanzan sus mayores niveles de inducción tras el tratamiento con Zn^{2+} (1h de exposición) (Tabla 43). Estas CdMTs podrían tener como función principal la regulación de la homeostasis de metales esenciales como el Zn^{2+} o el Cu^{2+} , al igual que ocurre con las CuMTs, que alcanzan sus mayores niveles de inducción en la mayoría de los casos tras la exposición a Cu^{2+} o Zn^{2+} (Tabla 43).

Los genes MTs también se inducen en presencia de otros metales como el mercurio (Hg), que se encuentra en la primera posición del *ranking* de inducción para el gen *TpigMT1* (Guo *et al.*, 2008), o el lantano (La^{3+}) que induce la expresión de los genes *TtheMTT1* y *TtheMTT2* y se une a ambas MTs de *T. thermophila* tal y como se ha detectado tras un análisis de fluorescencia (Wang *et al.*, 2011).

Las MTs también presentan una importante función antioxidante. Según estudios realizados *in vitro*, las MTs son capaces de unir directamente especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, tales como peróxido de hidrógeno, radicales hidroxilos, radicales superóxido (Kang, 1999; Quesada *et al.*, 1996) u óxido nítrico (Misra *et al.*, 1996). A su vez, las MTs también protegen del estrés oxidativo de manera indirecta, mediante la unión de los cationes metálicos causantes del mismo. Además de muchos metales, existen diversos compuestos que causan estrés oxidativo, como son el agua oxigenada (H_2O_2), el herbicida paraquat (PQ) (Díaz *et al.*, 2016) o la menadiona (MD), que también desencadenan la expresión de algunos de los genes MTs (Klaassen *et al.*, 1999; Amaro *et al.*, 2008; Díaz *et al.*, 2007; Fu and Miao, 2006). Tanto el PQ como la MD son compuestos pro-oxidantes que generan aniones superóxidos mediante el ciclo redox (Kappus and Sies, 1981; Thor *et al.*, 1982) y así activan la transcripción de algunas MTs (Bauman *et al.*, 1992), como es el caso de la CUP1 de *S. cerevisiae* (Liu and Thiele, 1996). También se ha atribuido cierta capacidad antioxidante a las MTs *TtheMTT1* y *TtheMTT2* de *T. thermophila*, que forman puentes bisulfuro tras reaccionar *in vitro* con el monóxido de

nitrógeno (NO) (Wang *et al.*, 2011). Sin embargo, los niveles de inducción obtenidos para los genes de las seis nuevas MTs analizadas por RT-PCR cuantitativa (véase la Fig. 19 tras el tratamiento con PQ o MD no son muy elevados o son negativos (< 2) comparados con los obtenidos tras los tratamientos con metales, al igual que ocurre en estudios previos (Amaro *et al.*, 2008; Fu and Miao, 2006).

Algo similar ocurre tras el tratamiento con camptotecina (CAM). La CAM es un potente inductor de la apoptosis que inhibe la acción de la topoisomerasa I, desencadenando la activación de la caspasa-3 y los cambios en la morfología nuclear típicos de células apoptóticas (Kawai *et al.*, 2000). Aunque se ha atribuido a las MTs funciones antiapoptóticas relacionadas con su efecto antioxidante parece que, en general, estos genes no se inducen significativamente en respuesta a la CAM en las diferentes especies de *Tetrahymena*. Algo similar se ha observado en experimentos llevados a cabo en ratones, en los que se inducía la apoptosis celular mediante el tratamiento con CAM. En estos últimos, la actividad antioxidante de las MTs no era suficiente para frenar los procesos apoptóticos y las células morían igualmente tras exponerlas a CAM a pesar de haber inducido previamente la expresión de las MTs mediante el tratamiento con Zn^{2+} (Kawai *et al.*, 2000).

Las MTs de *Tetrahymena* también responden frente a otros tipos de estrés abiótico, como son los cambios de pH y temperatura o las situaciones de hambre o inanición. En general, los cambios de pH inducen la expresión de los genes MTs en un rango muy amplio de valores, desde niveles nulos hasta un cierto grado de inducción, independientemente de si son Cd- o CuMTs (Amaro *et al.*, 2008). Por otro lado, las elevadas temperaturas (42°C) suelen inducir la expresión génica de la mayoría de las isoformas de MTs de *Tetrahymena*. Amaro y colaboradores (2008) detectaron que las MTs de *T. rostrata* eran bastante sensibles al estrés térmico, pues tras 2h a 42°C tanto *TrosMTT1* (CdMT) como *TrosMTT2* (CuMT) se inducían significativamente. Esta respuesta también se aprecia en las tres nuevas MTs analizadas en *T. borealis* tras mantener las células durante 24h a 42°C. *T. rostrata* y *T. borealis* son especies muy próximas desde un punto de vista filogenético y ambas pertenecen al *riboset* RSA2 del grupo *Borealis* (Strüder-Kypke *et al.*, 2001). También se han descrito otras MTs que responden a este estímulo de temperatura, como la *TtheMTT1* de *T. thermophila*, que se induce 8 veces tras exponer a las células durante 30 minutos a 40°C (Dondero *et al.*, 2004). Por el contrario, y en general, las bajas temperaturas no inducen la expresión de los genes codificantes de MTs (Amaro *et al.*, 2008; Díaz *et al.*, 2007).

La inanición es uno de los factores ambientales estresantes más comunes a los que los microorganismos se encuentran expuestos. En estudios previos, se ha observado que algunos genes MTs de *Tetrahymena* responden frente a este tipo de estrés, principalmente tras mantener las células durante 24h en condiciones de hambre (Amaro *et al.*, 2008; Díaz *et al.*, 2007). Además, el gen *TtheMTT5* se expresa durante los procesos de conjugación o reproducción sexual, que son inducidos ante la ausencia prolongada de nutrientes en el medio (Díaz *et al.*, 2007). En *S. cerevisiae*, el gen codificante de la MT CUP1 también se induce en condiciones de inanición ante la falta de glucosa (Mager and Kruijft, 1995). Entre las nuevas MTs de *Tetrahymena* descritas en este trabajo, destaca la *TborMTT1* como aquella en la que se obtienen mayores niveles de inducción ante situaciones de inanición. Los otros cinco genes

analizados no se inducen significativamente o presentan valores de inducción muy bajos ante este tipo de estrés.

En definitiva, podemos concluir que la mayoría de las MTs de *Tetrahymena* muestran su condición de proteínas multi-estrés (Yang *et al.*, 2015a; Russo *et al.*, 2014). Es por este motivo que los genes codificantes de MTs se expresan ante condiciones de estrés muy diferentes, protegiendo a la célula ante muy variadas circunstancias. Esta "protección cruzada" se ha descrito en algunos organismos y parece indicar la existencia de una superposición en la expresión genómica entre genes de respuesta frente a un estrés general, como son los genes codificantes de MTs, y otros genes que responden a un choque térmico (Amaro *et al.*, 2014).

Independientemente del carácter multi-estrés de las MTs, la existencia de diferentes isoformas de MTs en un mismo organismo junto con las marcadas diferencias entre los patrones de expresión de las mismas parecen indicar que cada isoforma podría tener una función celular específica (Miles *et al.*, 2000; Coyle *et al.*, 2002). Un ejemplo nos lo ofrece el ciliado *T. thermophila*, que presenta tres isoformas de CdMTs que responden de manera muy diferente frente a una misma situación de estrés. Dos de las CdMTs de este ciliado (TtheMTT1 y TtheMTT5) se comportan como proteínas de estrés general y son piezas claves en procesos de detoxificación de metales. Concretamente, el gen *TtheMTT5* alcanza los mayores valores de inducción y responde preferiblemente a Pb²⁺. El gen *TtheMTT1* se induce principalmente por Cd²⁺ (Díaz *et al.*, 2007) y codifica la MT con mayor afinidad de unión a este metal según los resultados obtenidos por Espart y colaboradores (2015) del análisis físico-químico de los complejos metal-proteína. Por otro lado, la tercera isoforma de CdMTs (TtheMTT3) presenta una mayor afinidad por Zn²⁺ (Espart *et al.*, 2015) y podría estar implicada en el mantenimiento de la homeostasis de este metal esencial (Díaz *et al.*, 2007). Las dos isoformas de CdMTs de *T. hegewischi* (*ThegMT1* y *ThegMT2*) (Chang *et al.*, 2014) y las dos CdMTs descritas en *T. borealis* (*TborMTT1* y *TborMTT2*) presentan, igualmente, diferentes patrones de inducción (Tabla 43) y se les podrían atribuir funciones diferentes dentro de la misma célula, considerándose como isoformas génicas ecoparálogas (Sánchez-Pérez *et al.* 2008). Este concepto se puede aplicar a genes con pocas diferencias en sus secuencias que, a su vez, originan proteínas similares (como el par *TtheMTT1* y *TtheMTT3*, que presentan un 76% de identidad entre sus secuencias aminoacídicas) (Díaz *et al.*, 2007), pero que su expresión responde a diferentes condiciones de estrés ambiental. El origen de estos genes ecoparálogos se podría deber a duplicaciones génicas que posteriormente sufrirían cierta divergencia. Se considera que la redundancia génica confiere cierto grado de robustez al organismo, ya que puede mantener un metabolismo estable bajo cambios hereditarios y/o ambientales. La redundancia genética se da tanto en microorganismos procariotas como en eucariotas, siendo los protozoos ciliados un ejemplo paradigmático de este fenómeno como se ha comprobado tras la secuenciación de los genomas macronucleares de *T. thermophila* (Eisen *et al.*, 2006) y *Paramecium tetraurelia* (Aury *et al.*, 2006). La redundancia genética puede explicarse como la consecuencia de alguno de los siguientes procesos selectivos: una elevada dosis proteica (soportada por genes duplicados idénticos), una diversificación de proteínas (originada por parálogos divergentes) y/o la adaptación a cambios ambientales (fundamentada en ecoparálogos de divergencia intermedia).

A.6. Análisis *in silico* de la estructura tridimensional de las MTs de *Tetrahymena*

Actualmente se conocen muy pocas estructuras tridimensionales (3D) de MTs obtenidas experimentalmente mediante difracción de rayos X o mediante resonancia magnética nuclear, y, entre ellas, ninguna perteneciente al género *Tetrahymena*. Por esta razón, es interesante llevar a cabo una primera aproximación mediante el análisis *in silico* de las estructuras 3D de las 26 CdMTs y las 16 CuMTs descritas hasta hoy dentro del género *Tetrahymena* (incluyendo las nuevas secuencias aportadas en este trabajo) así como de la CuMT ImMTT2 del ciliado *I. multifiliis*.

Mediante el programa *Phyre2* también pudimos conocer con qué tipos de proteínas presentan similitud estructural las MTs de ciliados. De las 26 CdMTs analizadas, 18 (el 69,3% de las secuencias) no encontraban ninguna analogía estructural con MTs pero sí con otras proteínas de muy diferente naturaleza (proteínas de señalización, proteínas de adhesión celular, factores de coagulación y ciertas proteínas estructurales), 6 de las secuencias (23%) (TpyrMT1, TtheMTT5, TrosMTT1, TborMTT1, TamerMTT1 y TmalaMTT4) muestran cierta similitud con MTs de otros organismos (la MT-1 de *Homarus americanus*, la MT-A de *Strongylocentrotus purpuratus* y la MT-I de *Callinectes sapidus*) y, por último, 2 de ellas (7,7%) (TpigMT-1 y ThegMT1) no presentaban similitud estructural con ninguna proteína de estructura conocida (véase Tabla A6 del Anexo I). Por otro lado, las 17 CuMTs analizadas encontraron cierta similitud estructural con alguna proteína: 12 de ellas (el 70,6% de las secuencias) mostraron analogía con proteínas muy diferentes a las MTs (factores de coagulación, hidrolasas/inhibidores de hidrolasas, proteínas de adhesión celular, etc.) mientras que sólo 5 de ellas (29,4%) (TpigMT-2, TrosMTT2, TborMTT4, TborMTT8 y TelliMTT8) encontraron cierta similitud estructural con MTs de otros organismos, tales como: la MT-1 de *Triticum aestivum*, la MT-1 de *Mus musculus*, la MT-2 de *Rattus rattus*, la MT-2 de *Homo sapiens*, la MT-2A de *Oryctolagus cuniculus*, la MT-A de *Notothenia coriiceps*, la MT-1 de *Homarus americanus*, la MT-I de *Callinectes sapidus* o la MT-A de *Strongylocentrotus purpuratus* (véase Tabla A7 del Anexo I). Casualmente, las seis CdMTs que muestran cierta similitud estructural con MTs de invertebrados son las que tienen longitudes menores (inferiores a 115 aa), más próximas a las longitudes habituales de las MTs de invertebrados (58-64 aa). Algo similar ocurre con las CuMTs: aquellas que encuentran similitud estructural con otras MTs son las más cortas (60-96 aa) y, por tanto, las que se parecen más en su longitud a las MTs de invertebrados (58-64 aa) y vertebrados (60-62 aa). La mayor longitud que en general presentan las MTs de ciliados frente a las MTs estándar hace que el programa *Phyre2* sólo sea capaz de modelar una parte de la secuencia aminoacídica de éstas; concretamente, el programa es capaz de modelar, como promedio, el 54% de los aminoácidos de las CdMTs y hasta el 67% de los aminoácidos de las CuMTs, que son más similares en longitud y patrón de residuos de Cys a las MTs de vertebrados.

A partir de estos resultados nos preguntamos por qué algunas MTs de *Tetrahymena* se asemejaban estructuralmente a proteínas tan distintas como son los factores de coagulación o las proteínas de señalización humanas. La respuesta la encontramos en su marcada estructura modular. Los factores de coagulación son glucoproteínas solubles de estructura modular que son sintetizadas por los hepatocitos y segregadas al plasma. Generalmente son proteínas proteolíticas o proteasas que están formadas por un número limitado de dominios diferentes

que se unen siguiendo un patrón modular. Probablemente, el conjunto de factores de coagulación se originó mediante una serie de duplicaciones y recombinaciones genéticas a partir de unos pocos motivos, evolutivamente probados como “eficaces”. Los genes o secciones de genes correspondientes pudieron, en el transcurso de la evolución, combinarse en un proceso denominado redistribución de exones o de dominos (“shuffling”) generándose así funciones similares. De este modo, los dominos catalíticos de todas estas proteasas de coagulación son similares estructuralmente a los de las proteasas pancreáticas (filogenéticamente más antiguas), como son: la tripsina, la quimiotripsina y la elastasa.

Las proteínas de señalización forman parte de los sistemas de transducción de señal y de los mecanismos de comunicación intercelular, que se asemejan a complejas redes o circuitos. Al igual que los factores de coagulación, las vías de comunicación celular son sistemas en cascada. La transferencia de la señal desde el exterior celular al citoplasma o genoma de la célula presenta una serie de propiedades o estrategias esenciales, siendo una de ellas la existencia de módulos o dominios funcionales en las proteínas transductoras. Esto permite su ensamblaje y desensamblaje transitorio junto con la formación de complejos multimoleculares encargados de transmitir la señal. Una de las proteínas de señalización que aparece más frecuentemente entre las proteínas que muestran similitud estructural con algunas CdMTs de *Tetrahymena* es el factor de inhibición 1 de Wnt del *Homo sapiens*. Estas proteínas de señalización constituyen la familia WNT o proteínas “Wingless” (“sin alas”), que aparecen en vertebrados e invertebrados pero están ausentes en plantas, eucariotas unicelulares y procariotas. Se trata de proteínas insolubles en agua que presentan 23 ó 24 residuos de Cys muy conservados, de los que ≈ 12 residuos ($\approx 50\%$) se concentran en el extremo carboxilo terminal, responsable de la especificidad de respuesta. En resumen, los factores de coagulación y las proteínas de señalización se asemejan estructuralmente a las MTs de *Tetrahymena* y, probablemente a las MTs de otros organismos, debido a su estructura modular (más acentuada en las CdMTs de *Tetrahymena*) y/o a su riqueza en residuos de Cys.

Las estructuras 3D inferidas con el programa *Phyre2* de las MTs de ciliados muestran una amplia diversidad, distinguiéndose: estructuras globulares más o menos compactas formadas por un único dominio, estructuras en “yo-yo” con dos regiones globulares conectadas entre sí mediante una región más lineal y estructuras más alargadas compuestas por uno, dos o hasta tres dominios diferenciados. Igualmente llama la atención que en muchas de las proteínas modeladas por el programa *Phyre2* existe un elevado porcentaje de aminoácidos que no es modelado con una alta fiabilidad. Esto ocurre también en aquellas MTs que encuentran cierta similitud estructural con MTs de otros organismos, en las que ninguno de sus aminoácidos modelados presenta una elevada confianza. Quizá esto se deba a que, a pesar de que aquellas MT que se asemejan a otras MTs de vertebrados son las MT de *Tetrahymena* más cortas, aún son demasiado largas y el programa no es capaz de llevar a cabo una modelación con una alta fiabilidad. Por otro lado, aquellas MTs que tienen un mayor porcentaje de residuos modelados con una elevada fiabilidad y, por tanto, con mayor probabilidad de presentar una estructura 3D teórica similar a la real, son las que, en general, presentan una estructura en “yo-yo” o una estructura más alargada con dos regiones diferenciadas.

Finalmente, es importante tener en cuenta que habría que conocer si las secuencias aminoácidas inferidas de las secuencias nucleotídicas de las MTs de ciliados son las proteínas

funcionales definitivas, ya que podrían experimentar cierto procesamiento post-traducciona, eliminándose una parte de las mismas y originándose proteínas funcionales más pequeñas. Esta posibilidad fue propuesta por Dondero y colaboradores (2004) para la CdMT TtheMTT1, en la que los autores detectaron un procesamiento post-traducciona en el extremo amino terminal que afectaba a los dos primeros aminoácidos de la apo-metalotioneína (Dondero *et al.*, 2004).

B.- CARACTERIZACIÓN DE LAS NUEVAS CEPAS DE *T. thermophila*: cepas adaptadas a elevadas concentraciones de metal, cepas *knockout* y/o *knockdown*

B.1. Caracterización morfológica-estructural y fisiológica de las cepas adaptadas a metales

En los experimentos de "evolución dirigida" se pretende obtener organismos con determinadas capacidades fisiológicas de una manera relativamente rápida y controlada. Para ello, se somete a los organismos a determinadas condiciones de estrés (presencia de drogas, temperatura extrema, salinidad, etc.), que se incrementan a lo largo del tiempo y de forma continuada con el fin de obtener y seleccionar cepas adaptadas capaces de sobrevivir en estas condiciones extremas. Los organismos adaptados potencian todos los mecanismos de defensa necesarios para contrarrestar esta situación crítica, facilitando su estudio. En general, estos procesos de adaptación suponen cambios en el genoma de los organismos a varios niveles: cambios en los niveles de la expresión de determinados genes, la aparición de mutaciones puntuales o los procesos de reorganización intragenómica. Todos estos cambios dan lugar a nuevos fenotipos, adaptados frente a un determinado tipo de estrés (Huang and Agrawal, 2016).

Durante más de dos años se ha llevado a cabo un proceso de adaptación de diferentes cultivos de *T. thermophila* a continuas y crecientes concentraciones de un determinado metal (Cd^{2+} , Cu^{2+} o Pb^{2+}), hasta alcanzarse las máximas concentraciones toleradas (MCTs) por encima de las cuales las células no pueden sobrevivir. Estos valores MCT son: 115 μM de Cd^{2+} para la cepa Cd-ADAP, 4 mM de Cu^{2+} para la cepa Cu-ADAP y 5,5 mM de Pb^{2+} para la cepa Pb-ADAP. Estos valores MCT son muy superiores a los valores de CL_{50} previamente calculados para cada metal en esta misma especie: 44,5 μM de Cd^{2+} , 315 μM de Cu^{2+} y 965 μM de Pb^{2+} , respectivamente (Díaz *et al.*, 2007). El número de veces que estos valores MCT exceden su correspondiente CL_{50} presenta el siguiente ranking: Cu^{2+} ($\approx 12,7x$) > Pb^{2+} ($\approx 5,7x$) > Cd^{2+} ($\approx 2,5x$), que está inversamente correlacionado con la toxicidad de cada metal. Según los resultados previamente expuestos, se observan grandes diferencias entre las tres cepas adaptadas, por lo que el ciliado ha podido adaptarse utilizando estrategias celulares muy diferentes para cada uno de los metales a los que ha sido expuesto.

✓ **La adaptación al cadmio: caracterización de la cepa Cd-ADAP**

El cadmio es un metal no esencial altamente tóxico que favorece la formación de especies reactivas de oxígeno y que está relacionado con daños genotóxicos entre otras alteraciones celulares. Además, este metal puede sustituir a otros iones metálicos esenciales (Zn^{2+} , Cu^{2+} y Ca^{2+} principalmente) en las metalo-enzimas, mostrando una gran afinidad por estructuras biológicas que contienen grupos -SH (Waalkes, 2004).

La adaptación a cadmio de cultivos de *T. thermophila* conlleva un crecimiento más lento para este microorganismo, cuyo tiempo de generación es muy superior al obtenido en la cepa control ($\approx 2,3x$) e incluso a aquel calculado para la cepa Pb-ADAP ($\approx 2x$). La presencia continuada de Cd^{2+} ha sido relacionada por varios autores con una disminución de la tasa específica de crecimiento. Por ejemplo, Costa y colaboradores (2017) han detectado recientemente una reducción considerable en la tasa específica de crecimiento del alga marrón *Sargassum cymosum* tras mantenerla durante 7 ó 14 días en presencia constante de Cd^{2+} . Igualmente, este crecimiento más lento también se ha asociado con cambios en el metabolismo y la organización celular.

A pesar de que la adaptación al cadmio conlleva menores tasas específicas de crecimiento, la cepa Cd-ADAP de *T. thermophila* muestra un fenómeno de adaptación cruzada que le permite no sólo crecer en presencia de elevadas concentraciones de Cd^{2+} sino también ante elevadas concentraciones de otros metales (Cu^{2+} o Pb^{2+}). En estos experimentos de resistencias cruzadas, la cepa Cd-ADAP tiene tiempos de generación ligeramente más elevados ($\approx 1,2x$ y $\approx 1,4x$ frente a tratamientos con Cu^{2+} (4mM) o Pb^{2+} (5,5 mM), respectivamente) con respecto a los mostrados al exponerse solo al Cd^{2+} . Sin embargo, es capaz de crecer también en estas condiciones siguiendo cinéticas de crecimiento bastante similares a las obtenidas frente al cadmio. Finalmente, cuando se expone a la cepa Cd-ADAP a una mezcla de dos metales ($Cd^{2+} + Cu^{2+}$ o $Cd^{2+} + Pb^{2+}$), se observa un comportamiento muy similar al que mostraba en presencia de estos dos metales por separado y se obtienen tiempos de generación ligeramente superiores a los descritos para esta cepa Cd-ADAP en presencia de Cd^{2+} . El cadmio es, de los tres metales utilizados en este estudio de adaptación, el más tóxico y, probablemente, la constante exposición al mismo favorece el desarrollo de mecanismos de adaptación más intensos o potentes que hacen que la célula pueda tolerar simultáneamente a otros agentes tóxicos.

Al observar las células Cd-ADAP bajo el microscopio óptico vemos que éstas presentan una forma y tamaño normales, similares a los de la cepa control. Sin embargo, a nivel ultraestructural se han detectado mediante microscopía electrónica de transmisión (MET) y microscopía de fluorescencia toda una serie de alteraciones o cambios con respecto a lo observado en la cepa control. Los principales cambios ultraestructurales que experimenta *T. thermophila* como consecuencia de su adaptación al Cd^{2+} se resumen en la Fig. 74.

Una de las alteraciones que muestra la cepa Cd-ADAP es la aparición de material granuloso electrodenso en la región posterior de las células, especialmente dedicada a la excreción de productos celulares de desecho. Este material granuloso se localiza tanto en el interior de las vacuolas como en el citoplasma celular y podría relacionarse con la formación de depósitos

metálicos o complejos proteína-metal como consecuencia del proceso de adaptación. El fluorocromo Leadmium Green (Life Technologies) es una molécula pequeña y sintética que permite la detección intracelular de los cationes de cadmio y plomo de manera selectiva (Malaiyandi *et al.*, 2016). De hecho, las imágenes obtenidas por microscopía de fluorescencia utilizando este fluorocromo en las células Cd-ADAP muestran claramente la presencia de unos depósitos irregulares con fluorescencia verde, localizados igualmente en la parte posterior de la célula. Estos depósitos podrían asociarse con el material electrodenso detectado mediante MET y, por tanto, con los supuestos complejos proteína-Cd²⁺ (Fig. 74). Presumiblemente, estos complejos de metal serían expulsados por la célula una vez que el Cd²⁺ hubiese sido quelado o inmovilizado por las metalotioneínas (principalmente por la MTT1 y la MTT5).

El Leadmium Green ha sido ampliamente utilizado en diferentes estudios permitiendo, por ejemplo, detectar el cadmio acumulado por el tripanosomátido *Leishmania* (Manzano *et al.*, 2013) o la planta hiper-acumuladora *Sedum alfredii* (Lu *et al.*, 2008). Igualmente, en estudios previos en que se trataron cultivos celulares de *Tetrahymena* con Cd²⁺ (Nilsson, 1989), se observaron mediante MET pequeños gránulos electrodenso en el interior de vacuolas, que se asociaron con un proceso de bioacumulación del metal como un mecanismo de defensa. Estas observaciones corroboran lo detectado en la cepa Cd-ADAP de este mismo ciliado.

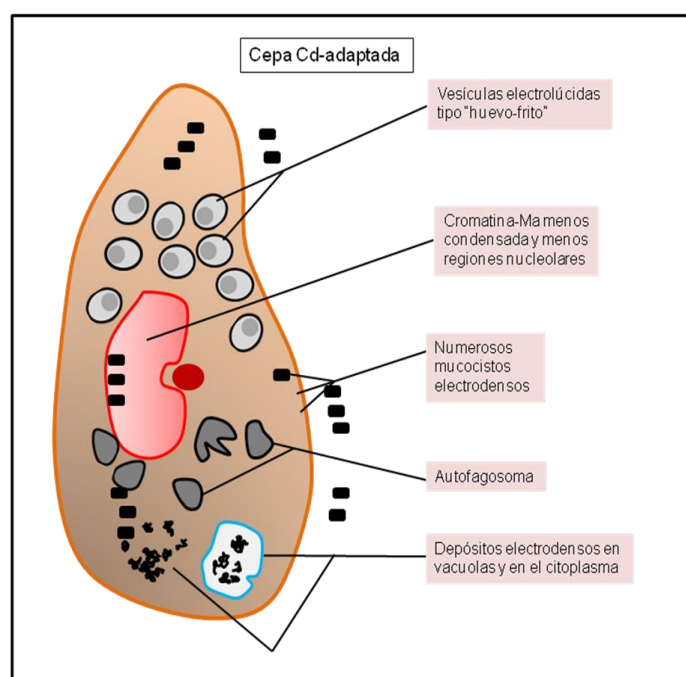


Fig. 74. Esquema que recoge los principales cambios ultraestructurales que experimenta *T. thermophila* durante su adaptación al Cd²⁺.

Por otro lado, una de las estructuras más llamativas que aparece en el citoplasma de la cepa Cd-ADAP son unas vesículas de aspecto electrolúcido que están rodeadas por una membrana. Además, aunque algunas de estas vesículas parecen vacías, la mayoría de ellas tienen un contenido ligeramente electrodenso y uniforme localizado en la parte central del orgánulo, recordándonos su aspecto a un "huevo frito" (Fig. 74). Estos orgánulos son muy

abundantes en la célula y se localizan indistintamente en la región anterior, media o posterior celular. Actualmente desconocemos la naturaleza bioquímica de estas vesículas y, aunque en un futuro próximo pretendemos realizar los análisis citoquímicos necesarios, de momento podemos especular sobre la naturaleza y significado de estos orgánulos.

El aspecto electrolúcido de los gránulos citoplasmáticos descritos en la cepa Cd-ADAP nos recuerda a los acúmulos adiposos típicos de las células animales. Estudios recientes han establecido una relación entre la citotoxicidad inducida por la presencia de cadmio y la formación de gotitas lipídicas (*lipid droplets*) de triacilgliceroles (TAG) y ésteres de esteroides (SE) (Rajakumar and Nachiappan, 2017). Las gotas lipídicas son consideradas como organelas independientes rodeadas por una membrana en monocapa derivada del retículo endoplasmático. En cultivos de *Saccharomyces cerevisiae*, la exposición a cadmio parece aumentar los niveles de fosfolípidos (principalmente de fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina) y, así mismo, los niveles de TAG y SE, favoreciendo la formación de un mayor número de gotas lipídicas. Igualmente, la presencia de Cd²⁺ induce la expresión de los genes responsables de la síntesis de estos acúmulos lipídicos, mejorando los niveles de ácidos grasos libres y favoreciendo la reducción de los niveles de ROS (Rajakumar and Nachiappan, 2017). Por otro lado, Khatchadourian y Maysiger (2009) afirman que la presencia de pequeñas nanopartículas metálicas compuestas por un núcleo de cadmio y telurio (CdTe) también induce la formación de gotas lipídicas en células de rata. Estos autores consideran las gotas lipídicas como organelas dinámicas que responden a situaciones de estrés oxidativo e interaccionan con otros orgánulos como los lisosomas (Khatchadourian and Maysiger, 2009). Todas estas observaciones parecen corroborar la posible relación existente entre la formación de gotas lipídicas y la exposición a Cd²⁺. Además, estas gotas lipídicas también pueden contener proteínas, denominadas como proteínas asociadas a gotas lipídicas (Brown, 2001).

A modo de análisis comparativo, en la Fig. 75 se muestran tanto las gotas lipídicas descritas en las células animales como las supuestas gotas lipídicas descritas en nuestras células Cd-ADAP. Concretamente, en los paneles A-C se muestran las gotas lipídicas presentes en macrófagos (micrografía tomada de Robenek *et al.*, 2006), en el panel D se muestra una micrografía de gotas lipídicas de células luteínicas (del cuerpo luteo) (Blanchette, 1966) y, finalmente, en el panel E aparecen las supuestas gotas lipídicas de la cepa Cd-ADAP de *T. thermophila* (Fig. 75). En la Fig. 72A, en algunas de las gotas lipídicas también se detecta un contenido granuloso un poco más electrodensito que nos recuerda a la configuración en "huevo frito".

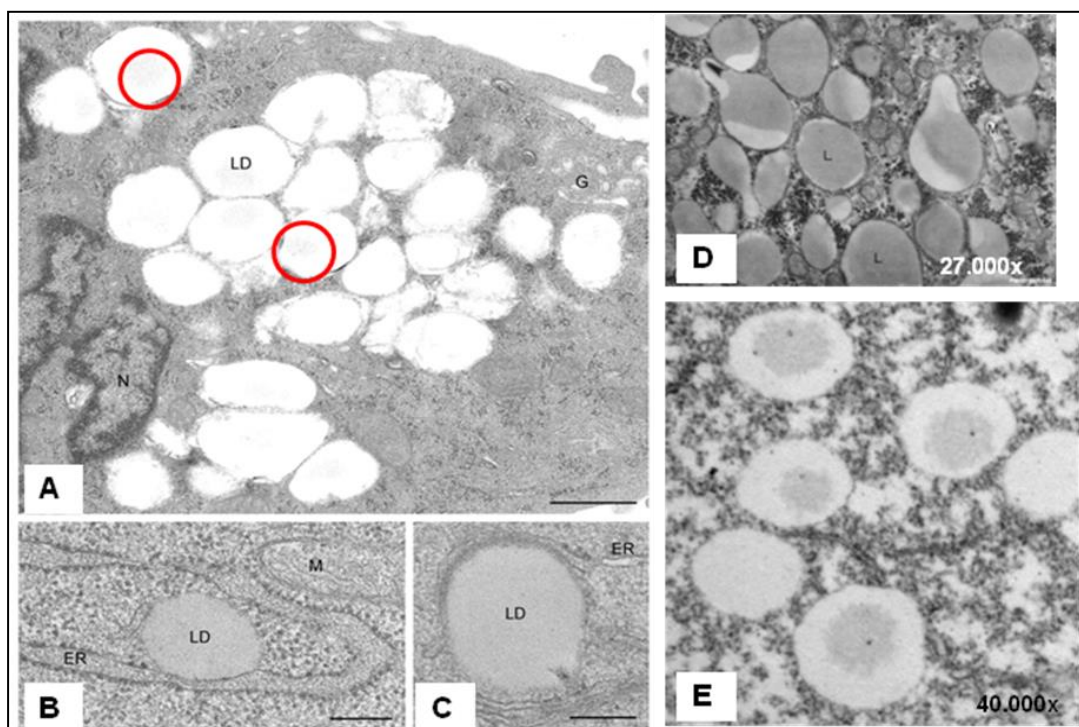


Fig. 75. Análisis comparativo estructural de los gránulos electrolúcidos detectados en las células Cd-ADAP con las gotas lipídicas presentes en las células animales. **A, B y C:** gotas lipídicas observadas en macrófagos (Robeneck *et al.*, 2006); los círculos rojos encierran un contenido irregular más electrodenso que recuerda a la configuración que hemos denominado "huevo frito", presente en la cepa Cd-ADAP de *T. thermophila* (panel **E**). **D:** gotas lipídicas observadas en células luteínicas (Blanchette, 1966). LD o L: *lipid droplet* o gota lipídica. ER: retículo endoplasmático. M: mitocondria. G: Golgi. N: núcleo. Barra en panel **A** (1 μm) y en paneles **B** y **C** (0,2 μm).

Tras mantener a la cepa Cd-ADAP durante un mes sin el Cd^{2+} aparecen numerosas vesículas llenas con un contenido ligeramente electrodenso (Figs. 31C y D), cuyo aspecto nos recuerda a algunas gotas lipídicas de células animales (compárese con las Figs. 75B y C). Una posible interpretación de estas imágenes podría darse al suponer que el contenido de estas vesículas se incrementa paulatinamente durante el proceso de adaptación y, una vez que se llenan, las vesículas excretan su contenido al exterior celular mediante la fusión de su membrana con la película del ciliado. Además, si a esta cepa Cd-ADAP tras mantenerla un mes sin metal se la somete de nuevo a la MCT de Cd^{2+} durante 24h, aparecen una vez más gran cantidad de vesículas electrolúcidas que carecen, en general, de algún contenido electrodenso (Figs. 32B y C) y que son muy parecidas a las gotas lipídicas presentes en células animales. De esta forma, tras la comparación de todas las imágenes obtenidas, podemos plantear la siguiente hipótesis (resumida en el esquema mostrado en la Fig. 76). En las células Cd-ADAP predominarían las vesículas de tipo B ("huevo frito") aunque también existen las de tipo A y C en menor medida (Fig. 76). Tras mantener a las células Cd-ADAP durante un mes sin el metal, el número de vesículas de tipo A y B (fases iniciales) iría disminuyendo y predominarían las vesículas características de las fases finales (C y D en Fig. 76). Por lo tanto, al cesar la presencia de Cd^{2+} en el medio ya no se formarían más vesículas nuevas (tipo A y B) sino que se acumularían en el citoplasma las vesículas características de las últimas fases (vesículas C y D), que excretarían su

contenido al exterior celular. Al volver a exponer a esta cepa a la MCT de Cd^{2+} (tras un mes sin el metal), se volverían a originar estas vesículas desde el estado A, que irían acumulando en su interior el material ligeramente electrodenso de composición desconocida (Fig. 76). En conclusión, se puede decir que la presencia del Cd^{2+} induce la formación de estas vesículas citoplasmáticas, que son estructuralmente similares a gotas lipídicas.

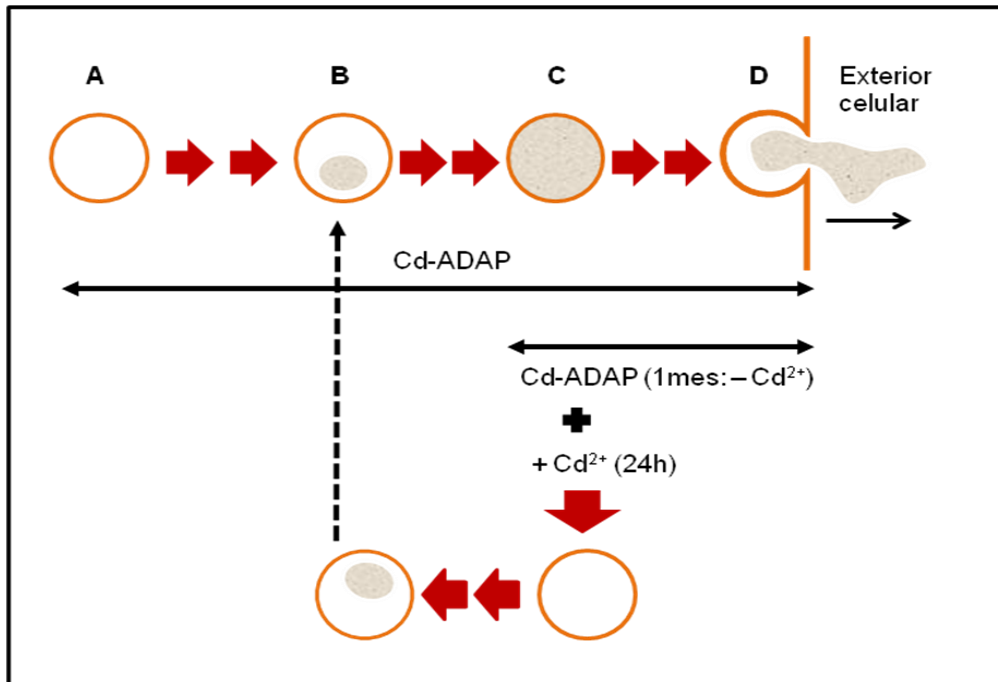


Fig. 76. Esquema que resume la hipótesis sobre el comportamiento de las vesículas similares a gotas lipídicas descritas en la cepa Cd-ADAP. A: vesícula electrolúcida. B: vesícula (con configuración de "huevo frito"). C: vesícula llena del contenido granular ligeramente electrodenso. D: excreción del contenido vesicular al exterior celular.

Por otro lado, a nivel macronuclear se aprecia que las células Cd-ADAP presentan una cromatina ligeramente menos condensada que la observada en los macronúcleos de las células control (comparar Figs. 27D y 28B). Sin embargo, la mayor diferencia se detecta en los nucleolos que, aunque presentan un aspecto similar a los de las células control, son mucho menos abundantes en la cepa Cd-ADAP (Figs. 27D y 28B). Uno de los motivos que podría explicar el cambio en la estructura nucleolar de una célula es la respuesta a condiciones de estrés o a factores externos (Raikov, 1995). Este orgánulo nuclear también puede ser un indicador del nivel biosintético de la célula e, incluso, en protozoos ciliados los nucleolos experimentan cambios drásticos durante el proceso de enquistamiento (Gutiérrez *et al.*, 1998).

En aquellas células Cd-ADAP que fueron mantenidas durante un mes sin la presencia del metal, la cromatina macronuclear volvía a tener un aspecto similar al de las células control; sin embargo, en algunas de las células, los nucleolos aparecían con una estructura poco usual, más alargados y fusionados entre sí (véase Figs. 32A y B). La fusión nucleolar en agregados mayores ocurre en *Tetrahymena* cuando la célula está en fase estacionaria de crecimiento y también se

asocia a una disminución de la síntesis de ARNr (Raikov, 1982). Esto podría significar que en aquellas células en donde se ha retirado el Cd^{2+} no se requiere una síntesis de ARNr tan elevada como la requerida por las mismas células bajo el estrés por Cd^{2+} . No obstante, la mera observación al MET no es suficiente para dilucidar qué está ocurriendo realmente en los nucleolos y su mayor o menor capacidad biosintética de ARNr.

Igualmente, las observaciones realizadas por microscopía de fluorescencia usando el fluorocromo DAPI muestran macronúcleos de mayor tamaño y con una cromatina con un menor grado de condensación en las células Cd-ADAP con respecto a los observados en la cepa control. Esto corrobora lo detectado por MET y se puede relacionar con unos mayores niveles de expresión génica en la cepa Cd-ADAP. De hecho, al observar el perfil de proteínas ricas en residuos tiol (previamente marcadas con el compuesto fluorogénico monobromobimano) obtenido de la cepa Cd-ADAP, destaca claramente la presencia de tres bandas ($\approx 20,6$ kDa, ≈ 35 kDa y ≈ 49 kDa) que tienen una mayor intensidad, muy superior a la observada para el resto de bandas del patrón descrito en esta cepa e igualmente muy superior con respecto al patrón descrito para el resto de las cepas analizadas (Fig. 45). El monobromobimano (mBrB) se caracteriza por unirse de manera específica a los residuos tiol reducidos (no unidos a metal) de las proteínas que presentan residuos cisteína (O'Keefe, 1994). Entre estas tres bandas previamente mencionadas destaca la de 20,6 kDa, cuya mayor intensidad es exclusiva de la cepa Cd-ADAP (Fig. 45). Las masas moleculares inferidas de las apo-MTs (MT sin unir al metal) de *T. thermophila* presentan los siguientes valores: 16,7 kDa (MTT1), 11,1 kDa (MTT2 o MTT4), 17,3 kDa (MTT3) y 10,9 kDa (MTT5).

En una electroforesis de proteínas, el cálculo de la masa o peso molecular es una estimación aproximada. Además, en este caso concreto, al estar las proteínas marcadas o unidas mediante sus grupos -SH libres al compuesto fluorogénico mBrB, éste ralentiza la migración de la proteína a través del gel y probablemente el cálculo de $\approx 20,6$ kDa para esta banda esté sobreestimado, siendo su masa molecular real inferior a este dato. De esta forma, la menor condensación de la cromatina macronuclear, detectada tanto por MET como con DAPI, se corresponde con mayores niveles de transcripción. La sobreproducción de determinadas proteínas (entre ellas la MTT1) aseguran la viabilidad celular de la cepa Cd-ADAP ante el estrés extremo al que se encuentra constantemente expuesta, ya que el Cd^{2+} es uno de los metales más tóxicos. Así mismo, la sobre-expresión del gen *MTT1* (junto con el gen *MTT3*, que se localiza en el mismo subfragmento cromosómico) está asegurada mediante un incremento o amplificación selectiva del número de copias génicas de éstos, tal y como se ha observado para la cepa Cd-ADAP (Fig. 52). En conclusión, esta banda predominante de $\approx 20,6$ kDa podría corresponder tanto a la metalotioneína MTT1 (16,7 kDa) como a la MTT3 (17,3 kDa). La cantidad que se origina de ambas isoformas es tan elevada que se mantienen unos niveles citoplasmáticos de las formas apo-MTs realmente altos y que se traducen en esta banda muy marcada con el mBrB en la cepa Cd-ADAP.

Otro aspecto a destacar del análisis realizado por MET en la cepa Cd-ADAP es la abundancia de autofagosomas (Figs. 28aH, 28bI). De hecho, es bastante común encontrar un elevado nivel de autofagia en células estresadas, ya que diferentes elementos estructurales y orgánulos dañados por dicho estrés (como pueden ser las mitocondrias) se destruyen mediante esta actividad autofagocítica. De esta manera, la célula retira elementos dañados y recicla el

material celular. En protozoos ciliados, la autofagia es un proceso muy habitual durante el enquistamiento (formación del quiste de resistencia), tanto para reducir orgánulos como para reciclar moléculas (Gutiérrez *et al.*, 2001).

Por último, en la cepa Cd-ADAP también destaca la presencia de un gran número de mucocistos (muy superior al observado en la cepa control) y de contenido muy electrodenso si los comparamos con los mucocistos de la cepa control (compárese la Fig. 27E con la 28b paneles J, K y M). Mediante microscopía de fluorescencia con Leadmium Green se detecta en la periferia celular de las células Cd-ADAP una tenue acumulación de cadmio o región fluorescente verde (Fig. 41C), que aparece alrededor de toda la célula y que coincide con la localización habitual de los mucocistos. Esta localización de cadmio se correspondería con la intensa electrodensidad detectada en el interior de los mucocistos. Los mucocistos de *Tetrahymena* son un tipo de extrusomas, es decir, pequeños orgánulos elipsoidales rodeados por una bicapa lipídica y con contenido paracrystalino. Los mucocistos se forman a partir del retículo endoplasmático y el aparato de Golgi y son muy similares a los gránulos secretores descritos en las células neuroendocrinas animales. Los mucocistos maduros se sitúan bajo la película de *Tetrahymena* disponiéndose, al igual que los cilios, en hileras (Tokuyasu and Scherbaum, 1965). Los mucocistos (llamados tricocistos en *Paramecium tetraurelia*) permiten almacenar proteínas recién sintetizadas o procedentes de la ruta lisosomal en forma de cristales mayoritariamente, que serán liberados al medio extracelular ante diferentes estímulos (Kumar *et al.*, 2015). Bajo determinadas condiciones, el proceso de secreción mucocística permite la formación de una película mucosa que encapsula la célula y la protege temporalmente (Gutiérrez and Orias, 1992; Madinger *et al.*, 2010). El moco o "mucus" excretado por los mucocistos también favorece la alimentación del ciliado, ya que las potenciales presas (bacterias) pueden quedar atrapadas en esta "nube mucosa", facilitando así la captura de las mismas por el ciliado.

El material pegajoso de los mucocistos está formado fundamentalmente por glucoproteínas (Maihle and Satir, 1986). Uno de los posibles mecanismos de protección contra metales tóxicos que presentan los microorganismos con pared celular (bacterias, hongos y microalgas) es la biosorción o secuestro extracelular. Este proceso consiste en la captación pasiva de los cationes metálicos por adsorción con moléculas (principalmente carbohidratos) presentes en las paredes o envolturas celulares que rodean a muchos microorganismos. De esta forma, las paredes celulares actúan como verdaderos muros de contención para muchos metales y dificultan la penetración de éstos al interior celular, impidiendo su acción tóxica. Los protozoos ciliados en su forma vegetativa no tienen pared, pero hay muchos que forman quistes de resistencia. En nuestro grupo de investigación hemos comprobado que las paredes quísticas de ciliados (constituidas principalmente por glucoproteínas) pueden adsorber metales (Gutiérrez *et al.*, 2008). De una manera similar, la parte glucídica (con abundantes cargas negativas) de las glucoproteínas mucocísticas podrían adsorber cationes divalentes metálicos (como el Cd^{2+}), reduciendo así la toxicidad del estrés provocado por este metal. Igualmente, un incremento del número de mucocistos por célula incrementaría la protección de la misma. En consecuencia, un estrés por exceso de Cd^{2+} podría inducir la formación de mucocistos en *T. thermophila*.

✓ La adaptación al cobre: caracterización de la cepa Cu-ADAP

El cobre es un micronutriente esencial que se requiere en pequeñas concentraciones para múltiples procesos celulares. Sin embargo, la presencia de elevadas concentraciones de este metal también resulta tóxica para la célula, ya que puede generar gran cantidad de especies reactivas de oxígeno (ROS) que podrían causar la peroxidación de los lípidos de membrana o la oxidación de las proteínas y los ácidos nucleicos e, incluso, este metal podría sustituir a cofactores metálicos de proteínas señalizadoras y enzimas (Adamo *et al.*, 2012a). Por ello, la célula ha desarrollado complejos mecanismos que regulan y mantienen la homeostasis intracelular del cobre en condiciones normales y, bajo estrés por cobre, al igual que sucede para otros metales, la célula tiene mecanismos específicos para contrarrestar esta situación de estrés.

En la cepa Cu-ADAP, la presencia continuada de una elevada concentración de Cu^{2+} causa una disminución en su tasa específica de crecimiento; sus tiempos de generación son muy superiores a los calculados para la cepa control SB1969 ($\approx 2,2x$) e, incluso, a los obtenidos en la cepa Pb-ADAP ($\approx 1,9x$). Esta disminución de la tasa de crecimiento también ha sido descrita previamente por otros autores en células de *Tetrahymena* expuestas a elevadas concentraciones de cobre (1,2 ó 1,8 mM) (Nilsson, 1989). Adamo y colaboradores (2012a) han observado que cepas de levaduras adaptadas a crecer en medios con elevadas concentraciones de cobre eran capaces de alcanzar densidades celulares próximas a las obtenidas en la situación control (en el medio YPD sin cobre) pero su tasa de crecimiento era menor.

A diferencia de lo que ocurre en la cepa Cd-ADAP, que también es resistente a los otros dos metales seleccionados (Cu^{2+} y Pb^{2+}), en la cepa Cu-ADAP se han obtenido tiempos de generación (Tg) muy superiores tras los tratamientos con Cd^{2+} ($\approx 2,5x$) o con Pb^{2+} ($\approx 1,8x$) con respecto a los Tg obtenidos con el cobre. Así, aunque las células Cu-ADAP son capaces de crecer en presencia de las MCT de Cd^{2+} o Pb^{2+} , sus mecanismos de adaptación son más efectivos frente al cobre, que es el metal menos tóxico de los tres utilizados. Finalmente, tras la exposición de la cepa Cu-ADAP a una mezcla de dos metales ($\text{Cu}^{2+} + \text{Cd}^{2+}$ ó $\text{Cu}^{2+} + \text{Pb}^{2+}$), se obtienen comportamientos muy diferentes en cada uno de los casos. La cepa Cu-ADAP no es capaz de sobrevivir en presencia de la mezcla $\text{Cu}^{2+} + \text{Cd}^{2+}$, por lo que estos dos metales presentan una sinergia del tipo potenciación, es decir, la toxicidad de la mezcla es superior a la de los dos metales por separado, incrementándose considerablemente la mortalidad de la población. Otros autores han detectado la existencia de interacciones aditivas o sinérgicas (potenciación) entre el cadmio y el cobre al exponer a la planta *Cucumis sativus* a una mezcla de estos dos metales y, aunque es difícil establecer los mecanismos implicados en esta interacción, parece ser que tanto el patrón de bioacumulación de cada uno de los cationes metálicos como los procesos de entrada de éstos a la célula son afectados por la combinación binaria de los dos metales (An *et al.*, 2004). Por otro lado, la cepa Cu-ADAP sí que es capaz de crecer en presencia de la mezcla $\text{Cu}^{2+} + \text{Pb}^{2+}$, con una tasa específica de crecimiento muy similar a la obtenida por esta cepa en presencia de Cu^{2+} exclusivamente. La presencia de Pb^{2+} parece no afectar demasiado al nivel de toxicidad obtenido sólo por el cobre, por lo que la interacción entre los dos metales se puede considerar como un efecto aditivo (la toxicidad de la mezcla es similar a la toxicidad de uno de los dos metales por separado). En estos casos, nosotros hemos

medido la toxicidad exclusivamente en base a la tasa de crecimiento y no al porcentaje de mortalidad o a los valores de CL_{50} , que son los parámetros habituales para considerar el tipo de interacciones entre contaminantes.

La adaptación al cobre también conlleva una serie de alteraciones morfológicas y ultraestructurales; las más importantes se esquematizan en la Fig. 77. Las células Cu-ADAP presentan una morfología celular algo alterada, con un contorno muy irregular o festoneado, con múltiples entrantes y salientes (Fig. 29a, paneles B y C). Esta alteración de la película del ciliado se puede deber a dos motivos no excluyentes: a)- a una mayor actividad de las bombas transmembrana, que favorecerían la liberación al medio extracelular de los cationes de cobre y disminuirían sus niveles intracelulares, minimizando sus efectos tóxicos sobre biomoléculas esenciales, y/o b)- a una acumulación periférica de un gran número de mitocondrias. En células de la levadura *Candida humilis* adaptadas a crecer en medios con elevadas concentraciones de cobre se han detectado unos niveles de bioacumulación menores con respecto a los de las células no adaptadas. Probablemente, esto se deba a una reducción en la incorporación de metal o a una mayor liberación de éste a través de bombas de expulsión o de eflujo de cationes (Adamo *et al.*, 2012a). En la cepa Cu-ADAP no se detectan depósitos intracelulares electrodensos (atribuibles a metales), por lo que se podría suponer que existe un intenso eflujo de cationes Cu^{2+} (mediado por bombas transmembrana) que los desaloja del citoplasma, independientemente de la función importante de determinadas MTs. Después de secuenciar el genoma-macronuclear de *T. thermophila* (Eisen *et al.*, 2006), se sabe que este ciliado es el ser vivo con el mayor número de transportadores de membrana para cationes inorgánicos: dispone de 485 transportadores registrados frente a los 261 que presenta *Homo sapiens*, los 142 de *D. melanogaster* o los 59 de *S. cerevisiae* (Eisen *et al.*, 2006). De los 485, 161 (33%) son transportadores del tipo ABC y 91 (18%) son ATPasas de tipo P, lo que nos da pie a pensar en la gran capacidad de este microorganismo eucariota para bombear multitud de moléculas orgánicas e inorgánicas (como cationes metálicos) al medio extracelular.

Las mitocondrias parecen ser el principal orgánulo-diana del Cu^{2+} ya que en la cepa Cu-ADAP se observan alteraciones en el número, tamaño y morfología de sus mitocondrias, junto con una distribución intracitoplasmática de las mismas poco habitual (Figs. 29a y 29b). El cobre es un agente oxidante que favorece la formación de ROS, originando un gran daño en las membranas mitocondriales. En cepas de levaduras adaptadas al cobre se observa una reducción considerable en la producción de ROS como consecuencia de una mayor actividad de enzimas antioxidantes como la superóxido-dismutasa, las peroxidasas o las catalasas (Adamo *et al.*, 2012a). En la cepa Cu-ADAP de *T. thermophila* no se han analizado la expresión de genes codificantes de enzimas antioxidantes (aunque se podría llevar a cabo en un próximo futuro); no obstante, sabemos que el Cu^{2+} (400 μ M) induce la expresión de un gen de glutationilperimidina sintetasa (*TtGspS4*) y de varias tiorredoxina reductasas en este ciliado (datos de nuestro grupo no publicados).

Las mitocondrias son orgánulos que forman una red dinámica que varía en su estructura según la fase del ciclo biológico y las condiciones fisiológicas de la célula. Estos cambios se fundamentan principalmente en fusiones, biogénesis o divisiones mitocondriales, mitofagia (destrucción por autofagia) y/o su diferente localización en la célula. En la cepa Cu-ADAP no hemos detectado por MET procesos de fusión mitocondrial ni fenómenos de mitofagia. Sin

embargo, la observación en esta cepa Cu-ADAP de mitocondrias de mayor tamaño y más alargadas nos da pie a pensar que podrían derivar de fusiones previas a partir de otras de menor tamaño. El número de mitocondrias en la cepa Cu-ADAP parece ser superior (aunque no se ha llevado a cabo un recuento de las mismas) que en la cepa control. Un incremento de los niveles intracelulares de ROS causado por condiciones de hiperglucemia estimula la división mitocondrial en células renales (Roy *et al.*, 2015). La biogénesis mitocondrial puede estimularse por ROS y por situaciones de hipoxia (Diaz and Moraes, 2008). En general, la aparición de enfermedades y desórdenes celulares ligados a las mitocondrias conlleva la biogénesis mitocondrial. Por ejemplo, una disfunción en la fosforilación oxidativa desencadena una proliferación mitocondrial como un mecanismo compensatorio para paliar la deficiencia funcional (Diaz and Moraes, 2008). En la cepa Cu-ADAP, el acercamiento o compactación de las mitocondrias en la periferia del ciliado así como la aparición de mitocondrias más alargadas (con mayor superficie) podrían relacionarse con un intento del microorganismo para favorecer una mayor captación de oxígeno.

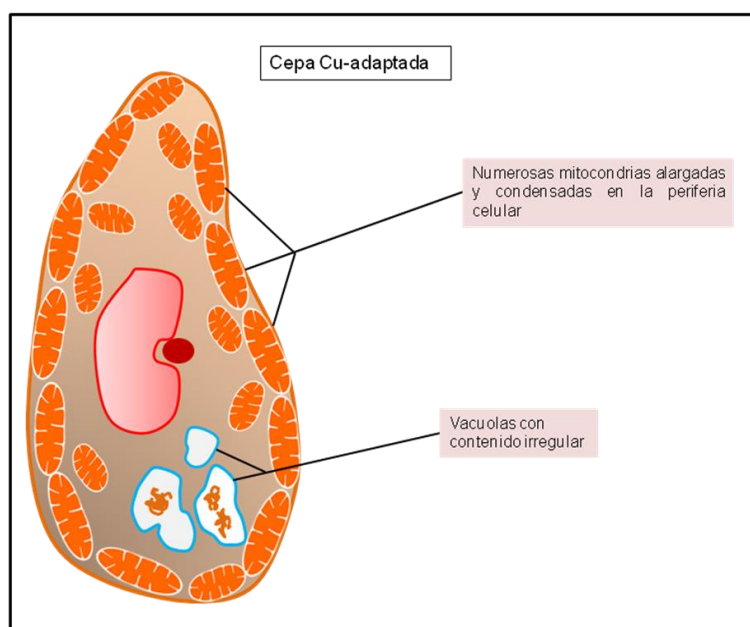


Fig. 77. Esquema que recoge los principales cambios ultraestructurales que experimenta *T. thermophila* durante su adaptación al Cu^{2+} .

Tras mantener esta cepa Cu-ADP durante un mes sin metal, se observan sus mitocondrias más disgregadas y parecidas a las de la cepa control (Fig. 33). Esta misma cepa, tras mantenerse un mes sin cobre y exponerse de nuevo a la MCT de este mismo metal durante 24h, continúa siendo capaz de crecer bajo estas condiciones y, por tanto, mantiene su adaptación después de un mes. En las micrografías obtenidas por MET, de nuevo observamos mitocondrias más alargadas y un inicio de compactación en su periferia (Fig. 34), volviendo así a la configuración típica detectada en la cepa Cu-ADAP original (mantenida con la MCT de Cu^{2+}).

En la cepa Cu-ADAP también se observan numerosas vacuolas con un contenido irregular poco electrodenso (Fig. 29E). En las células de esta misma cepa mantenidas durante un mes sin el metal también se detectan numerosas vacuolas, algunas de las cuales presentan un contenido irregular granuloso muy electrodenso (Fig. 33). Por su fuerte electrodensidad podríamos sugerir que este contenido fuese metálico (complejos proteína-metal) y que al estar en una vacuola podría expulsarse al exterior celular. La interpretación que hacemos de estas imágenes es que, una vez retirado el metal del medio, el exceso intracelular del mismo (unido a las MTs) se acumularía en vacuolas y eventualmente sería expulsado de la célula.

✓ La adaptación al plomo: caracterización de la cepa Pb-ADAP

El plomo es uno de los metales más tóxicos y abundantes del planeta, cuyos niveles han aumentado considerablemente en diversos ecosistemas en los últimos años por diferentes fuentes de origen antropogénico. La toxicidad de este metal se asocia con su acción pro-oxidante, su posible interacción con los grupos funcionales de diversas enzimas y su papel antagonista del calcio, al que es capaz de desplazar y por el que activa gran cantidad de reacciones dependientes de calmodulina (Fernández Leborans *et al.*, 1998).

Sorprendentemente, la cepa Pb-ADAP presenta una tasa específica de crecimiento y un tiempo de generación muy similares a los de la cepa control SB1969, por lo que la adaptación a plomo no supone un retardo en el crecimiento (al contrario de lo que ocurre en las adaptaciones a cadmio y cobre). De esta forma, los mecanismos de defensa implicados en la neutralización de la toxicidad por Pb^{2+} deben de ser muy eficaces para mantener casi intacta su tasa de división. Sin embargo, y por lo general, la cepa Pb-ADAP no alcanza las densidades celulares que se detectan en las demás cepas adaptadas a metales o en la cepa control, obteniéndose un rendimiento celular final más bajo. La adaptación a plomo conlleva a su vez una adaptación cruzada a otros metales como el cobre, con el que es capaz de crecer describiendo una cinética de crecimiento muy similar a la de la cepa control y a la descrita para la cepa Pb-ADAP en presencia de Pb^{2+} . Sin embargo, esta resistencia cruzada no se observa para el cadmio, ya que ante su MCT la cepa Pb-ADAP no es capaz de crecer. Ambos metales (Cd^{2+} y Pb^{2+}) son los más tóxicos utilizados en este estudio de adaptación; de ahí probablemente la incapacidad de la célula para mantener una resistencia cruzada con un segundo metal, independientemente de que los mecanismos de adaptación frente a estos dos metales parecen ser muy diferentes entre sí.

Igual de sorprendente es la capacidad de la cepa Pb-ADAP de crecer en presencia de la mezcla $Pb^{2+} + Cd^{2+}$ aunque su tasa de crecimiento disminuye considerablemente (sus tiempos de generación son aproximadamente 3 veces superiores a los presentados por la misma cepa en la sola presencia de Pb^{2+}). Sin embargo, en el caso de la mezcla $Pb^{2+} + Cu^{2+}$, la cepa Pb-ADAP no es capaz de crecer; en esta situación, la presencia del Cu^{2+} (el menos tóxico de los metales ensayados) incrementa la mortalidad celular describiendo un efecto de potenciación de la toxicidad.

En la Fig. 78 se esquematizan las principales alteraciones observadas en las células Pb-ADAP. En el análisis ultraestructural de la cepa Pb-ADAP lo que más destaca es la presencia de numerosas inclusiones esféricas u ovaladas con un contenido granuloso muy electrodenso (Figs. 30a y 30b). Estos acúmulos presentan un aspecto compacto y están rodeados por una membrana (probablemente de origen vacuolar) (Fig. 30b panel I). Además, estos acúmulos se excretan al exterior celular, en donde precipitan (Fig. 30b, paneles F y H).

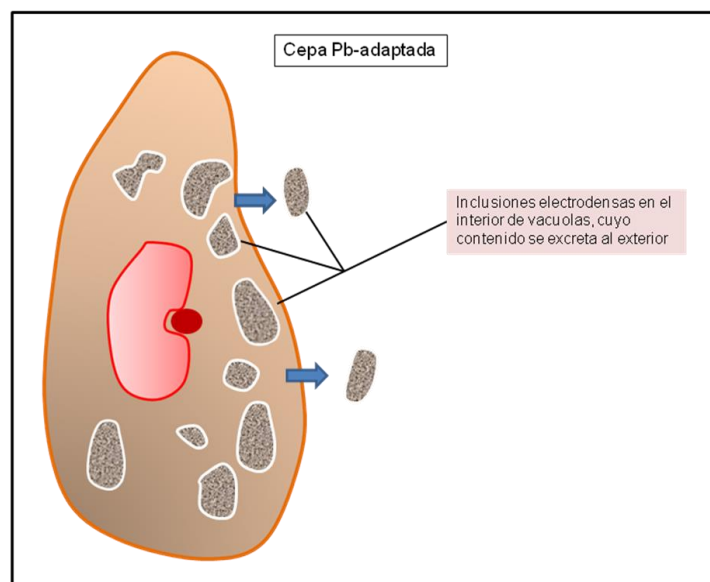


Fig. 78. Esquema que recoge los principales cambios ultraestructurales que experimenta *T. thermophila* durante su adaptación al Pb^{2+} .

El análisis realizado por microscopía de fluorescencia utilizando el fluorocromo Leadmium Green, pone de manifiesto que estos acúmulos electrodenensos contienen Pb^{2+} . Por lo tanto, la formación de estos gránulos se relaciona con un mecanismo de eliminación de este metal, que mantiene la célula durante todo su período de adaptación siempre que haya Pb^{2+} en el medio. De esta forma, las células van acumulando en vacuolas los complejos metal-MT hasta que se llenan y, posteriormente, los expulsan al exterior celular como forma no tóxica, pues el metal ya no está biodisponible. La presencia de Pb^{2+} en estos acúmulos también ha sido corroborada por el microanálisis realizado al MET de este material granuloso, detectándose entre 6 y 8 picos correspondientes al Pb^{2+} en los espectros obtenidos (Fig. 37A). Este material granuloso-particulado electrodenso tiene un diámetro de entre 100 y 200 nm y, a su vez, se compone de pequeños granos o nanopartículas de un tamaño muy inferior ($\approx 10-15$ nm) (Fig. 38). Nilsson describió en 1989 la capacidad de *Tetrahymena* de acumular intracelularmente el Pb^{2+} , dando lugar a la formación de gránulos densos o pequeñas vesículas en el citoplasma, en los axonemas de los cilios, la película alveolar, el núcleo, las mitocondrias, los peroxisomas o en pequeñas vacuolas (Nilsson, 1989). Otros autores también han descrito la gran capacidad de algunos protozoos marinos de bioacumular grandes cantidades de este metal en vacuolas digestivas, reduciendo así notablemente la cantidad de metal libre en el medio (Fernández Leborans *et al.*, 1998). Igualmente, Burgos y colaboradores (2013) han descrito la capacidad de acumular plomo en inclusiones citoplasmáticas en cuatro cianobacterias. Dichas inclusiones se

caracterizaron como gránulos de polifosfato al analizarlos mediante microanálisis y observar picos correspondientes al plomo y al fósforo, entre otros. En los espectros obtenidos mediante microanálisis en la cepa Pb-ADAP de *T. thermophila* también se muestra un pequeño pico de fósforo, muy inferior a los picos de Pb^{2+} observados y, por tanto, es difícil relacionarlo con la presencia de polifosfatos en estos gránulos electrodensos (principalmente constituidos por los complejos metalotioneína-metal). En un futuro próximo, el análisis químico de estas nanopartículas nos revelará con mayor precisión su composición y estructura.

Después de mantener la cepa Pb-ADAP durante un mes sin metal, se observa que estos acúmulos electrodensos se mantienen durante bastante tiempo en el interior celular, pero son menos abundantes y muestran un menor grado de compactación en el interior de las vacuolas (Fig. 35). Este hecho nos confirma que dichos acúmulos intracelulares electrodensos se forman por la presencia de plomo en el medio y, cuando este metal desaparece, el número de gránulos decrece y éstos se van deshaciendo. Sin embargo, la abundancia y la morfología características de estos acúmulos en la cepa Pb-ADAP se recupera rápidamente tras 24h de re-exposición a la MCT de Pb^{2+} (Fig. 36).

Finalmente, tanto en la cepa Cu-ADAP como en la Pb-ADAP se observan macronúcleos de mayor tamaño y con una cromatina más difusa, que se podrían corresponder con menores niveles de condensación de la cromatina-macronuclear (Fig. 39). Estos cambios favorecerían la expresión de un mayor número de genes como estrategia adaptativa a las condiciones de estrés extremo a las que se encuentran constantemente expuestas.

En *T. thermophila* los procesos de adaptación a metales son reversibles, volviendo la célula a sus características ultraestructurales normales si se le retira el metal del medio de cultivo. Además, las cepas adaptadas resisten de nuevo sus correspondientes MCTs cuando se las vuelve a exponer al metal al que fueron adaptadas, volviendo otra vez a reproducir las alteraciones ultraestructurales que caracterizan al estado adaptado.

B.2. Caracterización de las cepas *knockout* y/o *knockdown* en genes MT de *T. thermophila*

Las cepas *knockout* (KO) son herramientas muy útiles que nos permiten conocer la relevancia de un determinado gen, sus posibles funciones y los procesos biológicos en los que se encuentra implicado. Inicialmente nos propusimos obtener dos cepas KO en dos genes MT (*MTT1* y *MTT5*) y un doble KO que afectara a ambos genes en el ciliado *T. thermophila*, pero como se ha explicado en el apartado de resultados, el KO del gen *MTT5* no se pudo conseguir ya que dicho gen resultó ser esencial para el microorganismo y, aquellas células que perdían todas las copias de este gen, morían. Por lo tanto, en el caso del gen *MTT5*, sólo se pudo obtener una cepa *knockdown* (KD) en la que se había reducido considerablemente la dosis génica original de este gen (de 45n en la cepa silvestre a 1-3n en la cepa MTT5KD). Igualmente, el doble mutante obtenido era KO para el gen *MTT1* y KD para el gen *MTT5*.

Actualmente no se conoce en ningún ser vivo un gen codificante de metalotioneína (MT) que se haya descrito como un gen esencial. De hecho, podemos encontrar tanto mutantes sencillos como múltiples en los que se ha suprimido por completo la expresión de uno o varios

genes MT y, aún así, los organismos son totalmente viables. Por ejemplo, en el nematodo *Caenorhabditis elegans*, que es un organismo muy adecuado para la obtención de mutantes *knockdown* y/o *knockout* utilizando ARNs de interferencia o deleciones cromosómicas, respectivamente, se obtuvieron dos cepas *knockout* para cada uno de sus dos genes codificantes de MTs (*CeMT-1* y *CeMT-2*) y un doble *knockout* para estos dos genes. En ningún caso hubo problemas de letalidad o la aparición de fenotipos deletéreos (Höckner *et al.*, 2011), por lo que la desaparición de estos genes MT no alteraba la viabilidad del organismo.

La comparación de los valores CL_{50} obtenidos para cada metal en las diferentes cepas KO y/o KD con aquellos obtenidos en la cepa control CU428 muestra que la cepa MTT1KO es considerablemente más sensible a la presencia de cada uno de los tres metales. La ausencia del gen *MTT1* lleva consigo una mayor susceptibilidad de la cepa MTT1KO frente al Cd^{2+} (cuyo valor de CL_{50} es $\approx 1,7$ veces inferior al calculado para la cepa control), el Cu^{2+} (cuya CL_{50} es $\approx 1,8$ veces inferior a la de la cepa control) y el Pb^{2+} (cuya CL_{50} es $\approx 1,2$ veces inferior a la de la cepa control). Por consiguiente, aunque el gen *MTT1* no es un gen esencial para la célula, sí que tiene un papel clave en la respuesta frente al estrés originado por cada uno de estos metales. De hecho, en estudios previos este gen ha sido definido como un gen relacionado directamente con los procesos de detoxificación de metales (Gutiérrez *et al.*, 2009). El principal inductor de la expresión del gen *MTT1* es el Cd^{2+} y, de las cinco isoformas de MTs descritas en *T. thermophila*, la MTT1 es la que muestra una mayor afinidad por este metal (Espart *et al.*, 2015). Por ello, no es de extrañar que sea la cepa MTT1KO la que presente los menores valores de CL_{50} tras el tratamiento con Cd^{2+} y, por ello, sea considerada como la más susceptible a la presencia de este metal en el medio. La cepa MTT5KD sólo parece ser más susceptible que la cepa control ante los tratamientos con Cd^{2+} ya que, ante la presencia de Cu^{2+} o Pb^{2+} , sus valores de CL_{50} son muy similares a los obtenidos para la cepa control. Además debemos de tener en cuenta que, aunque en esta cepa se ha reducido considerablemente el número de copias del gen *MTT5*, ésta aún mantiene algunas de las copias de este gen y éstas responden con una mayor tasa de transcripción frente a la presencia de metal en el medio (Fig. 48). Finalmente, la cepa MTT1KO+MTT5KD muestra valores de CL_{50} inferiores a los detectados en la cepa control para los tres metales ensayados, sobre todo en el caso del Pb^{2+} y el Cd^{2+} . De hecho, este doble mutante es el más susceptible a la presencia de Pb^{2+} en el medio. Por lo tanto, la ausencia del gen *MTT1* junto con la disminución del número de copias del gen *MTT5* incrementan la susceptibilidad al Pb^{2+} , fenómeno que no se apreciaba en la cepa MTT5KD.

Generalmente, las cepas *knockout* suelen presentar menores tasas de crecimiento y el rendimiento celular obtenido suele ser también inferior, independientemente de la presencia o no de metal en el medio. Además, los dobles *knockout* son frecuentemente los más afectados en sus cinéticas de crecimiento (Höckner *et al.*, 2011). Esto también se cumple en *T. thermophila* ya que, en ausencia de metal, todas las cepas KO y/o KD obtenidas muestran mayores tiempos de generación que la cepa control, destacándose el caso de la cepa MTT1KO+MTT5KD, cuyo tiempo de generación (8,77 h) es $\approx 1,6$ veces mayor que el Tg de la cepa control (5,37 h). Igualmente, las cepas MTT5KD y MTT1KO+MTT5KD no alcanzan en ninguno de los ensayos realizados la densidad celular final que consiguen la cepa control o la MTT1KO. Estos resultados refuerzan el carácter esencial del gen *MTT5* ya que la disminución de su número de copias en el genoma macronuclear también afecta a la proliferación celular

en condiciones normales (sin estrés por metal). En general, las cepas *knockout* que afectan a genes MT suelen ser más sensibles a la presencia de metales tóxicos en el medio. Ratones KO para los genes de metalotioneínas I y II son más sensibles a la presencia de cadmio, mercurio y arsénico, así como a fenómenos de estrés oxidativo, compuestos carcinogénicos y neurodegenerativos (Fujiwara and Satoh, 2013). En las cepas KO y/o KD de *T. thermophila* se observa que los tratamientos con Cd^{2+} son los que tienen un mayor efecto sobre sus parámetros de crecimiento. Concretamente, la cepa MTT1KO sufre un gran retraso en su crecimiento ante la presencia de este metal en el medio, obteniéndose tiempos de generación de casi tres veces superiores a los obtenidos en ausencia de metal. La cepa MTT1KO+MTT5KD muestra una larga fase de latencia (≈ 50 h) tras el tratamiento con Cd^{2+} y, sólo tras esta fase de aclimatación, comienza a crecer. Estos resultados corroboran una vez más la gran relevancia del gen *MTT1* en la respuesta frente al Cd^{2+} . Por otro lado, los tratamientos con Cu^{2+} o Pb^{2+} tienen un efecto menor sobre las cinéticas de crecimiento de las cepas KO y/o KD. Estos metales no causan una disminución relevante de la tasa específica de crecimiento en ninguna de las tres cepas, aunque se detectan pequeñas fases de latencia en el caso de las cepas MTT5KD y MTT1KO+MTT5KD. De nuevo, la relevancia del gen esencial *MTT5* (elemento común en ambas cepas) se ve corroborada por el retardo del inicio de la curva de crecimiento de las poblaciones de *T. thermophila* en presencia de uno de estos dos metales.

C.- ANÁLISIS DEL COMPORTAMIENTO DE LOS GENES CODIFICANTES DE METALOTIONEÍNAS (MTs) EN EL CILIADO *Tetrahymena thermophila* FRENTE A SITUACIONES DE ESTRÉS POR METALES (Cd^{2+} , Cu^{2+} o Pb^{2+})

C.1. Análisis comparativo de la expresión de los genes MTs en *T. thermophila*: hacia una mejor comprensión de las funciones de cada una de las isoformas génicas

Las MTs constituyen una superfamilia de proteínas queladoras de cationes metálicos que están implicadas de manera principal (pero no exclusiva) en los procesos de detoxificación de metales (Sakulsak, 2012). La mayoría de los organismos poseen varias isoformas de MTs, que se diferencian por su afinidad o preferencia de unión a distintos metales. Concretamente, en el ciliado *T. thermophila* se conocen cinco isoformas de MTs: tres CdMTs (MTT1, MTT3 y MTT5) y dos CuMTs (MTT2 y MTT4) (Gutiérrez *et al.*, 2009; 2011). La regulación de la expresión de los genes MTs ocurre principalmente a nivel transcripcional (Coyle *et al.*, 2002; Miles *et al.*, 2000) y, aunque existen numerosos estudios sobre la expresión de estos genes MT en *Tetrahymena* bajo diversas condiciones de estrés (Amaro *et al.*, 2008; de Francisco *et al.*, 2016; Díaz *et al.*, 2007; Dondero *et al.*, 2004; Leignel *et al.*, 2008), aún no se conoce cómo tiene lugar la regulación de la expresión de las diferentes isoformas génicas en este microorganismo. Para tener una visión más completa del comportamiento de estos isogenes se ha llevado a cabo un análisis comparativo de sus patrones de expresión bajo el estrés por metales, utilizando diferentes cepas de *T. thermophila*: la cepa control SB1969, las tres cepas adaptadas a elevadas concentraciones de metal (Cd-ADAP, Cu-ADAP y Pb-ADAP), las tres cepas *knockout*

y/o *knockdown* para los genes *MTT1* y/o *MTT5* (*MTT1KO*, *MTT5KD*, *MTT1KO+MTT5KD*) y las dos cepas que sobre-expresan los genes *MTT1* o *MTT5* (*GFPMTT1* y *GFPMTT5*).

✓ **El gen *MTT1*: un gen con una relevante función constitutiva aún desconocida**

El gen *MTT1* se induce preferiblemente por Cd^{2+} en todas las cepas utilizadas en este trabajo, tal y como se había descrito previamente en la cepa silvestre (Díaz *et al.*, 2007). Además, la *MTT1* ha sido considerada como la MT que presenta una mayor afinidad por Cd^{2+} entre todas las isoformas de *T. thermophila* (Espart *et al.*, 2015). Sin embargo, este gen también responde a la presencia de los otros dos metales ensayados, destacándose dos perfiles de expresión diferentes según el tipo de metal. Tras los tratamientos con Cd^{2+} o Pb^{2+} , el gen *MTT1* responde considerablemente en 1h, pero los mayores niveles de inducción se detectan tras los tratamientos de 24h. En cuanto a las exposiciones con Cu^{2+} , los mayores niveles de inducción se alcanzan tras los tratamientos de 1h. Esta diferencia entre los perfiles de expresión del gen *MTT1* para los metales $\text{Cd}^{2+}/\text{Pb}^{2+}$ y Cu^{2+} también se observa al comparar los niveles de inducción de este gen en las cepas adaptadas. Las cepas Cd-ADAP y Pb-ADAP muestran sus mayores niveles de inducción para el gen *MTT1* al permanecer de manera continuada bajo sus valores MCT correspondientes, corroborándose así la importancia de la presencia del metal para el mantenimiento de los elevados niveles de expresión de este gen. Por otro lado, en la cepa Cu-ADAP, los mayores niveles de inducción del gen *MTT1* se muestran tras mantenerla durante 24h sin metal y volverla a tratar con Cu^{2+} durante 1h.

La *MTT1* es la isoforma que presenta una menor afinidad por Cu^{2+} de entre las cinco MTs de *T. thermophila* (Espart *et al.*, 2015) y su gen es el que menos se induce en presencia de este metal (Fig. 46). Además, el cobre, a diferencia del cadmio o el plomo, es un metal esencial que presenta una menor toxicidad y, quizá por esta razón, el gen *MTT1* muestra un patrón transcripcional totalmente distinto para este metal con respecto al observado para los otros dos metales. El gen *MTT1* se ha de expresar pronto para responder a la toxicidad del Cu^{2+} , que decae a lo largo del tiempo. Sin embargo, la toxicidad de metales más tóxicos como el Cd^{2+} o el Pb^{2+} parece persistir durante más tiempo, requiriéndose niveles de inducción del gen *MTT1* más elevados por más tiempo. Un comportamiento similar (el antagonismo entre Cd^{2+} y Cu^{2+}) se ha observado al comparar los patrones transcripcionales de los demás genes MTs de *T. thermophila* (*MTT3*, *MTT5* y *MTT2/4*) así como los genes MTs de otras especies de *Tetrahymena* (de Francisco *et al.*, 2016). En general, se pueden distinguir dos tipos de patrones de expresión para los genes MTs de *T. thermophila*: uno caracterizado por una mayor respuesta temprana que se va reduciendo a lo largo del tiempo y que está asociado con la inducción por Cu^{2+} , y otro con un efecto más acumulativo en el que los niveles de inducción aumentan a lo largo del tiempo y que está asociado con la exposición al Cd^{2+} o al Pb^{2+} . Actualmente desconocemos los mecanismos moleculares o fisiológicos que podrían explicar este diferente comportamiento, quizá únicamente relacionado con el carácter esencial o no esencial del metal y con su menor o mayor toxicidad. Desde luego este comportamiento no se puede asociar con la mayor o menor afinidad de una isoforma concreta de MT por un metal concreto ya que las isoformas *MTT2/4*, que son las que presentan una mayor afinidad por el

Discusión

Cu²⁺, muestran un patrón de inducción de sus genes (*MTT2/4*) similar al previamente comentado (Fig. 49).

El análisis comparativo de los niveles de expresión basal o constitutiva para el gen *MTT1* muestra el siguiente ranking: Cd-ADAP > GFPMTT5 > GFPMTT1 > Control SB1969 > Cu-ADAP ≈ Pb-ADAP > MTT5KD. En la cepa Cd-ADAP, los niveles de expresión basal del gen *MTT1* son 28 veces más elevados que en la cepa control, mientras que en el caso de las cepas GFPMTT5 y GFPMTT1, estos niveles son 5 y 2 veces mayores respectivamente a los calculados en la cepa control. A la vista de estos resultados podemos concluir los siguientes puntos:

- La adaptación al cadmio conlleva un aumento en los niveles de expresión basal del gen *MTT1*. Otros autores han apoyado esta idea al sugerir un aumento de los niveles de expresión basal de los genes de respuesta a estrés en individuos expuestos de manera continuada a un agente estresante. Por ejemplo, en poblaciones del artrópodo *Orchesella cineta* expuestas de manera crónica a Cd²⁺ se detectaron mayores niveles de expresión constitutiva de sus genes MT (Timmermans *et al.*, 2005). Así mismo, en la mosca doméstica (*Musca domestica*) el gen de resistencia a insecticida (isoforma del citocromo P450) se expresa de manera constitutiva más de 9 veces en la cepa resistente con respecto a la cepa no resistente (Liu and Scott, 1998).
- La cepa GFPMTT1 contiene múltiples copias del plásmido recombinante pVGFMTT1. Este plásmido porta la construcción *P_{MTT1}::GFP::MTT1* (Amaro *et al.*, 2014) y, por lo tanto, sobre-expresa el gen *MTT1*, aumentando sus niveles de expresión basal en esta cepa.
- La cepa GFPMTT5 contiene el plásmido recombinante pVGFMTT5 con la construcción *P_{MTT1}::GFP::MTT5*, donde el ORF completo del gen *MTT5* está regulado por el promotor del gen *MTT1*. En esta cepa el gen *MTT5* está sobre-expresado y sus niveles de expresión constitutiva son muy superiores a los de la cepa control (≈ 49x). De alguna manera, la sola presencia del promotor del gen *MTT1* en la construcción heteróloga (más abierto en condiciones basales que el *P_{MTT5}*) incrementa la expresión basal del gen *MTT5*. Además, esta cepa también presenta mayores niveles de expresión basal para el gen *MTT1*, ≈ 5x con respecto a la cepa control y ≈ 2x con respecto a la cepa GFPMTT1.

En estas tres cepas (Cd-ADAP, GFPMTT1 y GFPMTT5), los mayores niveles de expresión basal del gen *MTT1* con respecto a la cepa control probablemente se deban a un mayor número de copias del gen *MTT1* (en el caso de las cepas Cd-ADAP y GFPMTT1) o a los mayores niveles de expresión basal del gen *MTT5*, regulados por el promotor del gen *MTT1* (como se aprecia en la cepa GFPMTT5). En resumen, en estas cepas los mayores niveles basales del gen *MTT1* se pueden atribuir tanto al mayor número de copias del gen *MTT1* en la célula (ya sean plasmídicas o cromosómicas) como al mayor número de copias del promotor *MTT1*.

Además, a la vista de los últimos resultados comentados para la cepa GFPMTT5, parece que podría existir una regulación coordinada entre los niveles de expresión basal de los genes MT, al menos entre los genes *MTT1* y *MTT5*. Van Straalen y colaboradores (2011) señalaron que los mecanismos de regulación en *cis* y *trans* actúan de manera combinada durante los procesos de adaptación evolutiva a un determinado tóxico. Esta coordinación también se aprecia en las

cepas *knockout* (KO) y/o *knockdown* (KD). En el caso de las cepas MTT1KO y MTT1KO+MTT5KD, que han perdido todas las copias del gen *MTT1*, se observa un aumento de los niveles de expresión basal del gen *MTT5* con respecto a la cepa control ($\approx 8,5x$ en el caso del MTT1KO y $\approx 59x$ en el MTT1KO+MTT5KD). Parece que el gen *MTT5* intenta llevar a cabo la función del gen *MTT1* cuando éste está ausente. Así, aunque el gen *MTT1* no es un gen esencial y se puede obtener un KO completo, su función celular parece ser muy importante y parece estar relacionada tanto con situaciones de estrés general como con el mantenimiento de los niveles homeostáticos celulares correctos, ya que sus niveles de expresión basal son muy elevados independientemente de la cepa analizada o del tratamiento aplicado.

En todas las cepas analizadas (a excepción de la cepa Cu-ADAP), el gen *MTT1* es el que muestra los mayores niveles de expresión basal (independientemente del número de copias génicas que presente la cepa) frente a las demás isoformas génicas de MTs en *T. thermophila* (Fig. 62). En la cepa GFPMTT1, el ranking de los niveles de expresión basal de los genes MT es el siguiente: $MTT1 > MTT2/4 > MTT3 > MTT5$, muy similar al definido para la cepa control ($MTT1 > MTT3 > MTT2/4 > MTT5$). En la cepa GFPMTT5, el gen *MTT5* pasa a la segunda posición del ranking ($MTT1 > MTT5 > MTT2/4 > MTT3$) tal y como se podría esperar al presentar esta cepa un mayor número de copias del gen *MTT5*. Igualmente, la cepa Pb-ADAP presenta este mismo ranking de expresión basal (Fig. 79).

✓ El gen *MTT5*: un gen "de alarma" frente al estrés y esencial para la célula

La metalotioneína MTT5 ha sido considerada como la principal isoforma en los procesos de detoxificación de metales (Gutiérrez *et al.*, 2009; 2011). Esta proteína forma complejos estables con Cd^{2+} o Zn^{2+} y ha sido identificada como la segunda mejor Zn/Cd-tioneína tras la MTT1, debido a su gran afinidad por estos dos cationes metálicos (Espart *et al.*, 2015). Todas estas afirmaciones y resultados previos son igualmente corroborados con nuestros resultados. El gen *MTT5* es el que presenta los mayores niveles de inducción independientemente del tratamiento metálico aplicado o de la cepa analizada. El patrón de inducción consenso de los genes MT para el Cd^{2+} o el Pb^{2+} en todas las cepas de *T. thermophila* analizadas es el siguiente: $MTT5 > MTT1 / MTT3 > MTT2/4$. Incluso, en la cepa MTT5KD, que tiene un número de copias del gen *MTT5* muy reducido en su macronúcleo, se cumple este patrón. Tras los tratamientos con Cu^{2+} , metal por el que la proteína MTT5 muestra la más baja afinidad (Espart *et al.*, 2015), en tres de las cepas analizadas (Cu-ADAP, Pb-ADAP y MTT5KD) es el gen *MTT5* el que se encuentra en la primera posición en sus rankings de inducción (Fig. 79). Estos elevados niveles de inducción podrían explicarse gracias a la existencia de una duplicación en tándem en su región promotora, que afecta a una región de 416 pb e incluye el mayor número de motivos de reconocimiento para factores de transcripción de la familia AP-1 si la comparamos con las regiones promotoras del resto de las isoformas de genes MT de *T. thermophila* (Díaz *et al.*, 2007; de Francisco *et al.*, 2016; Gutiérrez *et al.*, 2009; 2011).

Discusión

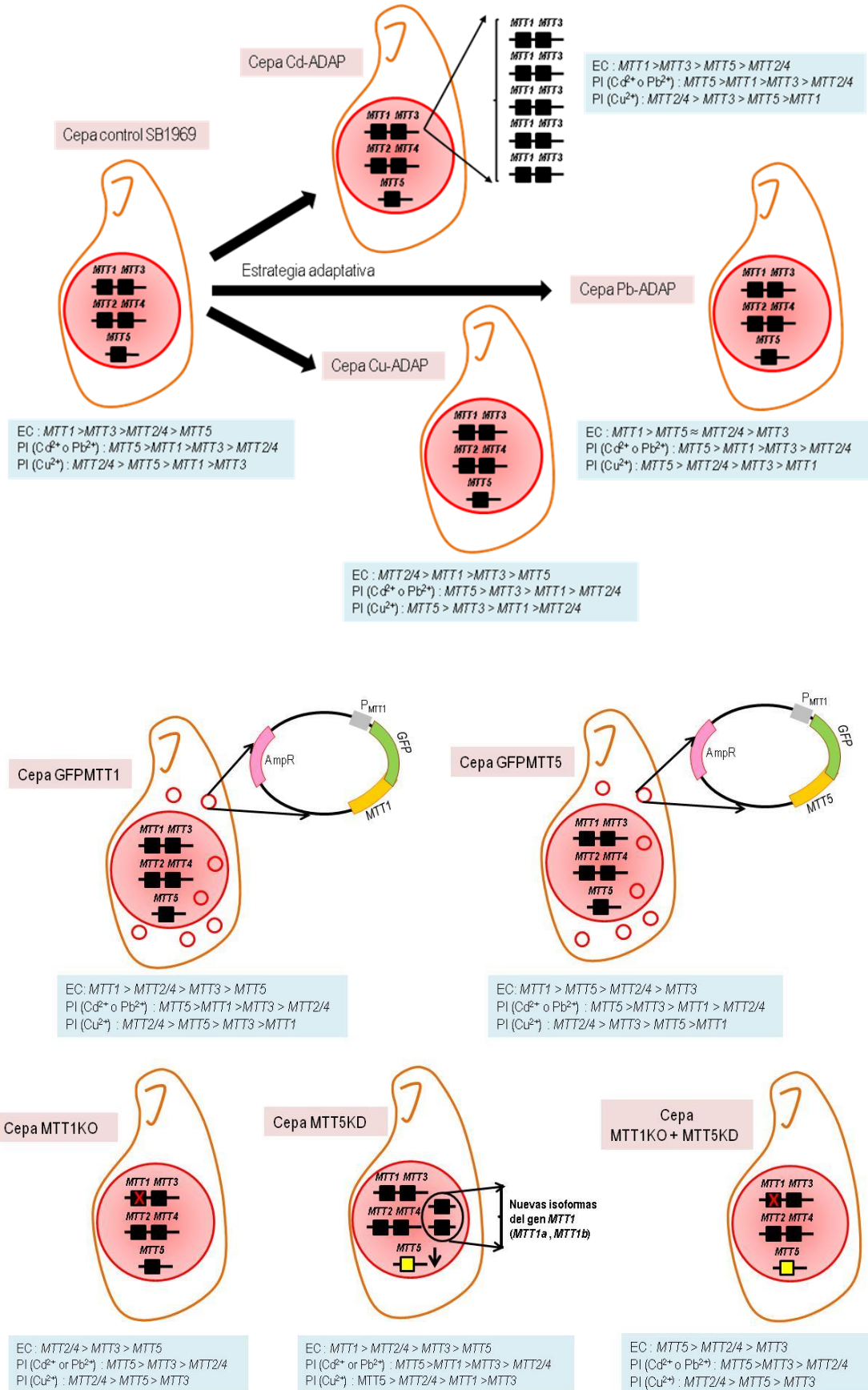


Fig 79. Representación esquemática de las características genómicas y de los niveles de expresión de las cinco isoformas de MTs en las diferentes cepas de *T. thermophila* utilizadas en este trabajo. En cada cepa se muestran los rankings de los niveles de expresión constitutiva (CE) y de los patrones de inducción (PI) de los genes MT, tras los tratamientos con Cd^{2+} , Pb^{2+} o Cu^{2+} .

Sin embargo, a pesar de que el gen *MTT5* es, en general, el que presenta los mayores niveles de inducción frente al estrés por metales, sus niveles de expresión basal o constitutiva son los más bajos registrados en algunas de las cepas analizadas (cepa control SB1969, Cu-ADAP, GFPMTT1, MTT1KO y MTT5KD), existiendo grandes diferencias entre los niveles de expresión constitutiva del gen *MTT5* con respecto a los de las demás isoformas de MT. Por ejemplo, en el caso de la cepa control, en ausencia de metal el gen *MTT1* se expresa ≈ 36 veces más que el gen *MTT5*, el gen *MTT3* $\approx 23x$ *MTT5* y los genes *MTT2/4* $\approx 4x$ *MTT5*. En las cepas Cd-ADAP y Pb-ADAP, el gen *MTT5* se sitúa en la tercera o segunda posición del ranking de expresión basal, respectivamente (Fig. 79). Sin embargo, este gen pasa a ocupar la primera posición del ranking en la cepa MTT1KO+MTT5KD, donde el gen *MTT1* está ausente y el número de copias del gen *MTT5* está muy reducido (Fig. 79). Además, si comparamos los niveles de expresión basal del gen *MTT5* entre las cepas MTT1KO y MTT5KD observamos que la cepa MTT1KO expresa 1.024 veces más dicho gen en condiciones de ausencia de metal con respecto a la cepa MTT5KD. Esto se podría deber a la reducción del número de copias del gen *MTT5* en la cepa MTT5KD, pero también a la total pérdida del gen *MTT1* en la cepa MTT1KO, por lo que en esta última cepa el gen *MTT5* sustituiría la función basal del gen *MTT1*. Por todo ello, se podría establecer la hipótesis de que el balance intracelular de ambas MTs (*MTT1* y *MTT5*) podría estar regulando, a su vez, la expresión de ambos genes.

A diferencia del gen *MTT1* que generalmente muestra elevados niveles de expresión basal, el gen *MTT5* no parece ser requerido en condiciones normales o de ausencia de estrés. Por ello, sus niveles de expresión basal suelen ser bastante bajos en condiciones celulares normales y éstos aumentan enormemente y de forma rápida bajo condiciones de estrés (Fig. 80). En este sentido, el gen *MTT5* podría ser considerado como un gen “de alarma” y, al mismo tiempo, esencial para la célula. Esta MT podría actuar como una “alarma” intracelular y, simultáneamente, inducir la expresión de otras isoformas (como la *MTT1* o las *MTT2/4*) que pueden ser necesarias en función del *pool* total de MTs requeridas para la respuesta celular y según el tipo de agente estresante. De este modo, la cepa GFPMTT5 (que sobre-expresa de manera artificial el gen *MTT5*) tiene niveles de expresión basal anormalmente altos para este gen “de alarma” (≈ 49 veces superiores a los detectados en la cepa control) y, por lo tanto, esto podría ser interpretado por la célula como una situación de estrés, favoreciéndose a su vez el aumento de los niveles de expresión basal de las otras isoformas de MTs: *MTT1* (cuyo gen se expresa 5 veces más en la cepa GFPMTT5 que en la cepa control) y *MTT2/4* (cuyos genes se expresan 6,5 veces más que en la cepa control). Por otro lado, la cepa MTT1KO+MTT5KD presenta otra situación de estrés diferente ya que carece del gen *MTT1* y tiene muy reducido el número de copias del gen *MTT5*. Ante esta situación, esta cepa sobre-expresa su gen *MTT5* ($\approx 59x$ con respecto a la cepa control) y este aumento también parece inducir la sobre-expresión de los genes *MTT2/4* ($\approx 10x$) con respecto a la cepa control. Todos estos datos parecen apoyar la hipótesis de que existe una regulación coordinada de la expresión de algunos genes MT en el ciliado *T. thermophila* como respuesta a una situación de estrés (Fig. 80).

Independientemente del carácter esencial del gen *MTT5* así como de su posible condición de “alarma celular”, este gen parece tener un papel clave en los procesos de destoxificación del Pb^{2+} y en la adaptación a este metal. Aunque, actualmente, no conocemos el grado de

afinidad de esta isoforma de metalotioneína con los cationes de plomo, podemos observar que el gen *MTT5* es el que presenta los mayores niveles de inducción, en la mayoría de las cepas estudiadas, tras la exposición con Pb^{2+} durante 24h. Además, la cepa Pb-ADAP presenta elevados niveles de expresión basal para este gen ($\approx 7x$ con respecto a la cepa control) y, tras mantenerla durante 6 meses sin metal y volverla a exponer de nuevo a Pb^{2+} (24h) se registran elevados niveles de inducción para este gen.

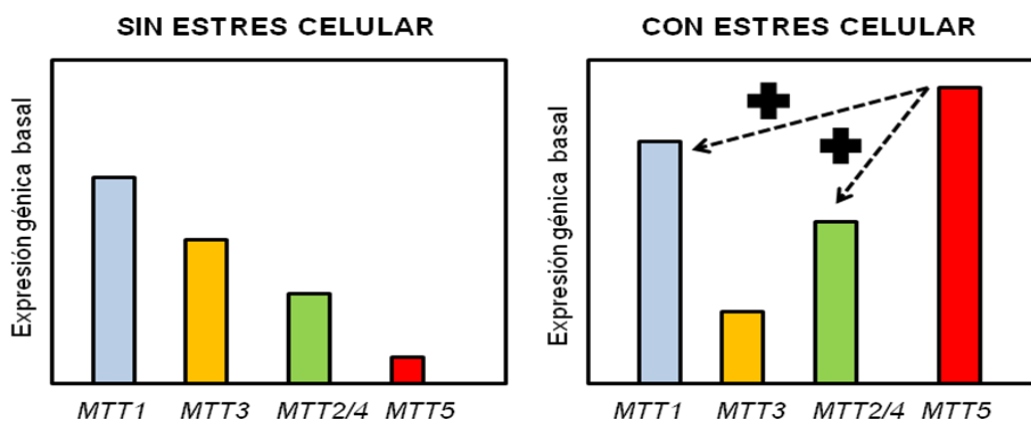


Fig. 80. Representación esquemática del comportamiento de la expresión basal del gen *MTT5* y de los demás genes MT bajo condiciones de estrés, en comparación con el observado en la cepa control en situaciones normales (sin estrés celular).

✓ **El gen *MTT3*: una isoforma poco definida**

El gen *MTT3* se localiza en el mismo subfragmento cromosómico que el gen *MTT1*, concretamente a una distancia de 1,7 Kb, presentando ambos la misma orientación dentro de este subfragmento (Díaz *et al.*, 2007). Ambos genes (de 486 pb de longitud y con una identidad del 85% entre sus secuencias nucleotídicas) codifican isoformas de MTs muy similares entre sí (de 162 aa cada una de ellas y con un 76% de identidad) y se piensa que estos dos genes surgieron probablemente por una duplicación génica a partir de un gen ancestral común (Díaz *et al.*, 2007; Gutiérrez *et al.*, 2009; 2011). Sin embargo, a pesar de la similitud entre ambos genes y las proteínas que originan, cambios mínimos en la secuencia de una de ellas pueden suponer cambios drásticos en su capacidad de unión a metal y la aparición de nuevas capacidades funcionales. Además, existen variaciones en sus regiones promotoras y en sus motivos reguladores en *cis*, que están correlacionados de manera positiva con los diferentes niveles y patrones de expresión de estos dos genes. De hecho, éste es el primer paso para que exista una divergencia funcional de genes obtenidos por duplicación (Li *et al.*, 2005). Posiblemente los genes *MTT1* y *MTT3* fueron diversificándose tanto en sus regiones promotoras como en sus secuencias codificantes hasta presentar diferentes niveles y patrones de expresión y, finalmente, funciones diferentes. Una de las diferencias detectadas en sus regiones promotoras afecta al número de motivos de unión a factores de transcripción del tipo

AP-1, de los que existen 6 en el promotor del gen *MTT1* y sólo 2 en el promotor del gen *MTT3* (Díaz *et al.*, 2007). Esta diferencia podría explicar los menores niveles de inducción de la expresión que alcanza el gen *MTT3* con respecto a los genes *MTT1* y *MTT5* (este último con 13 posibles motivos de unión a factores AP-1) (Gutiérrez *et al.*, 2009).

El gen *MTT3* se induce principalmente en presencia de Cd^{2+} (tras exposiciones de 24h) en la mayoría de las cepas analizadas. De hecho, se la considera una CdMT por su similitud en los patrones de residuos de Cys con otras CdMTs del género *Tetrahymena* (de Francisco *et al.*, 2016; Gutiérrez *et al.*, 2009; 2011). Sin embargo, en las cepas adaptadas a metal también se induce de manera excepcional tras los tratamientos con Cu^{2+} (1 ó 24h), destacándose el caso de la cepa Cu-ADAP tras mantenerla durante 1 ó 6 meses sin metal y volverla a exponer a la MCT de Cu^{2+} durante 1h. Igualmente, los niveles de expresión basal del gen *MTT3* son bastante bajos, situándose en la segunda o tercera posición del ranking según la cepa analizada. En la cepa MTT5KD, los niveles de expresión constitutiva del gen *MTT3* son mucho más bajos con respecto al resto de cepas estudiadas (≈ 42 veces menores a los de la cepa control). Por todas estas razones, aunque la *MTT3* ha sido considerada como una CdMT y se ha incluido dentro de la subfamilia 7a (Díaz *et al.*, 2007; de Francisco *et al.*, 2016), esta isoforma no parece ser particularmente adecuada para la unión preferente con el cadmio, presentando una afinidad intermedia tanto para el Cd^{2+} como para el Cu^{2+} ya que ocupa la tercera posición en el ranking de afinidad por estos dos metales con respecto al resto de las 4 isoformas MT de *T. thermophila* (Espart *et al.*, 2015) (Fig. 81). Esta isoforma es considerada por algunos autores como una "MT indefinida" (Espart *et al.*, 2015) y se cree que la pérdida de una preferencia concreta por un metal puede responder a la necesidad de plasticidad por parte de la célula, permitiendo así el desarrollo de diversas funciones y la unión a distintos metales (Cd^{2+} , Cu^{2+} o Zn^{2+}) según los requerimientos ambientales.

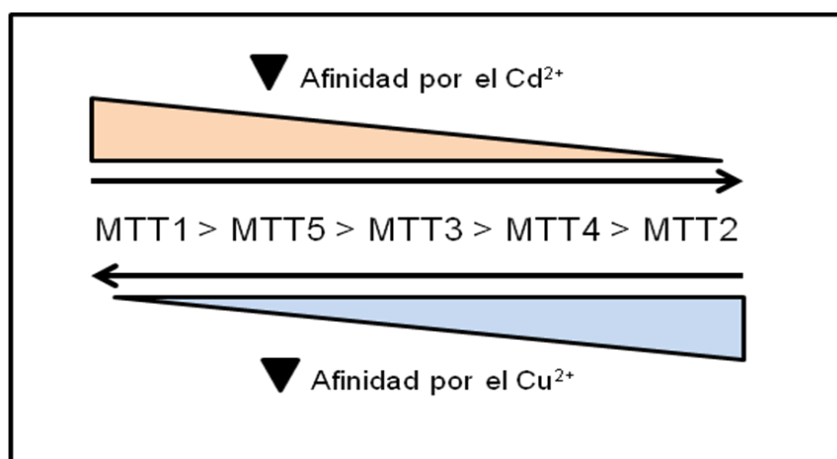


Fig. 81. Esquema-resumen del grado de afinidad de las diferentes isoformas MT de *T. thermophila* frente al Cd^{2+} o al Cu^{2+} (basado en los datos experimentales mostrados en Espart *et al.*, 2015).

Igualmente, la *MTT3* contiene dos residuos de histidina en su secuencia aminoacídica y, junto con una MT de *T. patula* que contiene una His en su secuencia, es la única CdMT descrita en el género *Tetrahymena* con este tipo de residuos (de Francisco *et al.*, 2016). Las histidinas, a través de sus anillos imidazol, potencian la afinidad relativa por el Zn^{2+} frente al Cd^{2+} y son los

ligandos más frecuentes para el Zn^{2+} en muchas metaloenzimas (Daniels *et al.*, 1998), permitiendo la estabilización de los complejos metal-proteína (Blindauer, 2008). Además, como ha sido descrito en estudios previos, el gen *MTT3* alcanza sus mayores niveles de inducción con Zn^{2+} (1h) y podría tener un papel importante en el mantenimiento de la homeostasis de metales esenciales (Zn^{2+} y/o Cu^{2+}) (Díaz *et al.*, 2007).

✓ **Los genes *MTT2* y *MTT4*: dos mejor que uno**

Los genes *MTT2* y *MTT4* son isoformas génicas casi idénticas (con un 98% de identidad entre sus secuencias nucleotídicas) que se disponen en tándem en el brazo derecho del cromosoma 4 micronuclear de *T. thermophila*. Sus regiones promotoras son también bastante similares (con un 76% de identidad) y cada una de ellas presenta dos posibles motivos de unión a factores de transcripción AP-1 (de Francisco *et al.*, 2016). Igualmente, las proteínas codificadas por estos dos genes son prácticamente idénticas entre sí, con un 99% de identidad entre sus secuencias aminoacídicas. Muy probablemente, estas dos isoformas génicas se originaron por procesos de duplicación y, posteriormente, no han sufrido una diversificación muy marcada. Actualmente no conocemos si ambos genes se expresan de manera diferencial o si ambas copias se expresan de manera conjunta para aumentar así la respuesta celular frente a un estrés determinado, actuando como la suma de ambos productos (*MTT2* + *MTT4*). Ninguno de los dos genes parece tratarse de un pseudogen y al menos el gen *MTT2* es funcionalmente activo ya que su promotor ha sido utilizado en construcciones genéticas como un promotor inducible por Cu^{2+} (Boldrin *et al.*, 2006).

Las isoformas *MTT2* y *MTT4* son claramente CuMTs ya que son incapaces de formar complejos estables con Cd^{2+} en un entorno intracelular y son las que presentan la mayor afinidad por cobre (*MTT2* > *MTT4*) de entre todas las MTs de *T. thermophila* (Espart *et al.*, 2015) (Fig. 81). En la mayoría de las cepas analizadas en este trabajo, los genes *MTT2/4* se expresan preferiblemente en presencia de Cu^{2+} y sobre todo tras los tratamientos de 1h. Tras el tratamiento con este metal, los genes *MTT2/4* suelen ocupar la primera o segunda posición en los rankings de inducción en todas las cepas analizadas, siendo el ranking consenso: *MTT2/4* > *MTT5* ≈ *MTT3* > *MTT1*. Sólo encontramos una excepción en la cepa Cu-ADAP, en la que los genes *MTT2/4* se encuentran en la última posición del ranking de inducción (Fig. 79). Esto se puede explicar al detectar que en la cepa Cu-ADAP los niveles de expresión basal de los genes *MTT2/4* son muy elevados: ≈ 4 veces superiores a los niveles de expresión basal del gen *MTT1*, ≈ 16 veces superiores a los del gen *MTT3* y ≈ 27 veces mayores que los del gen *MTT5* en esta misma cepa. Comparándola con la cepa control, los niveles de expresión basal de los genes *MTT2/4* son ≈ 18 veces superiores en la cepa Cu-ADAP. Todos estos datos nos sugieren que en la cepa Cu-ADAP los niveles de expresión basal para los genes *MTT2/4* son tan elevados que son suficientes para responder a la presencia del metal sin necesidad de inducirse más. Por todo ello, los genes *MTT2/4* parecen tener un papel clave en el proceso de adaptación al cobre.

En las cepas KO y/o KD, los niveles de expresión basal de los genes *MTT2/4* aumentan cuando algún otro gen MT importante se ha eliminado por completo o se ha reducido su

número de copias. Así, en el MTT1KO, los niveles de expresión basal de los genes *MTT2/4* son ≈ 8 veces superiores a los observados en la cepa control y en la cepa MTT1KO+MTT5KD estos niveles de expresión basal son ≈ 10 veces superiores a los detectados en la cepa control y ≈ 5 veces mayores a los de la cepa MTT5KD. Estos resultados apoyan nuestra hipótesis sobre una posible co-regulación de los niveles de expresión de los genes MT entre sí, que afectaría no sólo a los genes *MTT1* y *MTT5* sino también al par *MTT2/4*. El aumento de los niveles de expresión basal del gen *MTT1* en la cepa GFPMTT1 ($\approx 2x$) supone a su vez un aumento de los niveles de expresión basal de los genes *MTT2/4* ($\approx 7x$ con respecto a la cepa control). Igualmente, en la cepa GFPMTT5, el aumento de los niveles de expresión basal de gen *MTT5* ($\approx 49x$) supone también un aumento de los niveles de expresión basal de los genes *MTT1* y *MTT2/4* ($\approx 5x$ y $\approx 6x$ respectivamente con respecto a la cepa control).

Como el cobre es un metal esencial, otros mecanismos diferentes a la quelación por metalotioneínas podrían estar implicados en los procesos celulares de detoxificación, como podría ser la expulsión activa del metal a través de bombas de membrana de eflujo. Actualmente se han descrito en el genoma macronuclear de *T. thermophila* 485 genes potencialmente codificantes de transportadores de membrana para cationes metálicos (Eisen *et al.*, 2006) y muy probablemente algunos de ellos participen en procesos de detoxificación de metales.

En conclusión, y a la vista de todos los resultados obtenidos con las diferentes cepas de *T. thermophila* y más concretamente con las cepas adaptadas a elevadas concentraciones de metal, hemos podido distinguir diferentes funciones entre estas cinco isoformas de MTs en el ciliado *T. thermophila*. También se han descrito diferencias entre las MTs de otros organismos, como en el caso de las cuatro isoformas que presenta *Drosophila melanogaster*, las cuales no participan por igual en los procesos de detoxificación de metal (Egli *et al.*, 2006). Estas diferentes funciones que pueden presentar las MTs vienen definidas, al menos, por su distinta capacidad de unión al metal y por el diferente patrón de inducción de los genes MT en respuesta a éste. En este trabajo también hemos encontrado pruebas experimentales de la posible co-regulación en los procesos transcripcionales entre los genes MT de *T. thermophila*, destacando la interacción existente entre los niveles de expresión de los genes *MTT1*, *MTT5* y el par *MTT2/4*. Se puede plantear la posibilidad de que existan elementos reguladores en *trans* comunes para los diferentes genes MT que podrían ser controlados, a su vez, de manera indirecta por las propias MTs, que activarían o reprimirían la expresión de otros genes MT. Todas estas ideas se engloban dentro de la nueva visión que se ha dado de las MTs en los últimos años, que han pasado de ser consideradas como proteínas exclusivamente implicadas en los procesos de detoxificación de metal a elementos celulares dinámicos relacionados con los procesos de regulación de la expresión génica y que pueden afectar (en vertebrados) a la neurotransmisión o al control de enfermedades neurodegenerativas o neoplásicas (Atrian and Capdevila, 2013). Hasta el momento no se han descrito interacciones MT-MT pero sí se conoce que las MTs son capaces de interactuar con otras proteínas. Por ejemplo, las MTs de mamíferos pueden interactuar con proteínas como la GTPasa Rab3A (Knipp *et al.*, 2005), receptores LPR (Ambjørn *et al.*, 2008), la albúmina de suero bovino (Quiming *et al.*, 2005) o los factores de transcripción p53 y NF-kB (Ostrakhovitch *et al.*, 2006). Además, las MTs también

pueden interactuar de manera indirecta con otras proteínas mediante el intercambio de iones esenciales (zinc, cobre o hierro) como por ejemplo con la ferritina (Orihuela *et al.*, 2011), con diferentes enzimas dependientes de zinc (Maret *et al.*, 1999) o con factores de transcripción con dedos de zinc (Huang *et al.*, 2004). Las MTs parecen tener un papel clave en la regulación de otras proteínas así como en diferentes procesos celulares como el transporte celular, la señalización, la neuroprotección, el almacenamiento de metales esenciales, la regulación enzimática y transcripcional, la detoxificación de metales y la progresión tumoral (Atrian and Capdevila, 2013).

C.2. Aumento reversible y específico del número de copias de los genes MT como estrategia adaptativa de la cepa Cd-ADAP de *T. thermophila*

Las variaciones en el número de cromosomas completos (aneuploidía) o regiones subcromosómicas (aneuploidía parcial) así como en el número de copias de determinados genes pueden causar un drástico impacto sobre el ciclo biológico de cualquier organismo y suelen conllevar efectos fenotípicos como consecuencia de las importantes alteraciones en los patrones de expresión génica. Las variaciones en el número de copias de un gen concreto pueden causar efectos específicos sobre un gen (cambios en la dosis génica o inestabilidad genómica) o efectos más generalizados asociados a una respuesta celular de estrés (Tang and Amon, 2013). Algunos estudios realizados en bacterias, levaduras o mamíferos indican que los cambios en el número de copias de un gen pueden deberse a procesos de selección frente a una situación de estrés ambiental, que favorecen la aparición de células con mayores ventajas adaptativas (Berman, 2016; Mishra and Whetstone, 2016). Por ejemplo, en *Salmonella enterica* procesos de amplificación génica están ligados con el desarrollo de resistencias a antibióticos (Sun *et al.*, 2009). Variaciones en el número de copias de un gen también se han asociado con procesos adaptativos de resistencias a antifúngicos (Ford *et al.*, 2015). En el ser humano, el número de copias del gen de la amilasa salivar aumenta en poblaciones que presentan dietas con un elevado contenido en almidón (Perry *et al.*, 2007). Estos y otros ejemplos nos indican que, en general, los incrementos en el número de copias de un gen parecen constituir una estrategia adaptativa universal que permite responder a una gran variedad de agentes estresantes ambientales.

En la cepa Cd-ADAP de *T. thermophila* hemos detectado un aumento significativo (de aproximadamente 5 veces) del número de copias de los genes *MTT1*, *MTT3* y *CYCLIC*, todos ellos localizados muy próximos entre sí en el mismo subfragmento cromosómico, siguiendo el orden: 5'-*CYCLIC-MTT1-MTT3*-3'. Concretamente, los genes *MTT1* y *MTT3* se encuentran localizados a una distancia de 1,7 Kb, mientras que la distancia entre los genes *CYCLIC* y *MTT1* es de 2,7 Kb. Debido a que el genoma macronuclear de *Tetrahymena* está compuesto por unas 200 moléculas de ADN subcromosómico con un tamaño de entre 100 - 1.500 Kpb (Prescott, 1994), deducimos que la amplificación génica diferencial que nosotros detectamos en esta cepa afecta a todo el subfragmento cromosómico en el que se localizan estos tres genes. Esta amplificación supone un incremento desde valores de 1 copia/ μ l (que se corresponden con la dosis cromosómica (45n) de un macronúcleo normal) hasta \approx 5 copias/ μ l (\approx 225n) en la cepa Cd-ADAP.

Esta amplificación génica selectiva de un subfragmento cromosómico que incluye dos genes MT parece exclusiva de la cepa Cd-ADAP y no se han detectado fenómenos similares que afecten a genes MT en las otras cepas adaptadas a metal. En la cepa Cd-ADAP, los niveles de expresión basal del gen *MTT1* son muy superiores a los observados en la cepa control ($\approx 28x$) o en la cepa GFPMTT1 ($\approx 14x$), a pesar de que esta última presenta un mayor número de copias del gen *MTT1* gracias al plásmido que se ha introducido en ella. Sin embargo, en la cepa Cd-ADAP, el gen *MTT3* muestra niveles de expresión basal normales, muy similares a los calculados para la cepa control ($\approx 1,5x$). De hecho, si comparamos los niveles de expresión basal de los genes *MTT1* y *MTT3* en la cepa Cd-ADAP observamos que el gen *MTT1* se expresa ≈ 30 veces más que el gen *MTT3*, mientras que esta relación en la cepa control es de $\approx 1,6x$. Esto parece indicarnos que el aumento en el número de copias de este fragmento cromosómico solamente supone un incremento de los niveles de expresión basal del gen *MTT1* pero no del gen *MTT3*, ni probablemente de los otros genes localizados en este mismo subfragmento. Por lo tanto, y al igual que ocurre en otros organismos (bacterias, levaduras, plantas o mamíferos), el aumento del número de copias del gen *MTT1* afecta de manera proporcional a sus niveles de expresión basal, que también aumentan de manera considerable. Sin embargo, y a pesar de que el número de copias del gen *MTT3* también está incrementado, sus niveles de expresión basal se mantienen similares a los de la cepa control. Este mecanismo de regulación negativa de la expresión génica de un gen con un mayor número de copias podría equipararse al denominado "compensación de la dosis génica", que ha sido observado en los cromosomas sexuales de *Drosophila*, *Caenorhabditis* y mamíferos donde, a pesar del incremento del número de copias de un gen, existe una regulación negativa (represión) de la expresión del mismo, eliminándose así el efecto del aumento de su dosis génica (Farslow *et al.*, 2015; Nguyen and Disteche, 2006; Stenberg and Larsson, 2011).

El aumento en el número de copias de estos genes es uno de los elementos, a nivel genómico, de la estrategia celular de adaptación a las elevadas concentraciones de Cd^{2+} , ya que las mismas células reducen progresivamente los números de copias de este subfragmento macronuclear (recuperando los valores normales de la cepa control) al eliminarse la presión selectiva ejercida por el metal. Así, tras mantener la cepa Cd-ADAP durante un mes sin la presencia del metal, el número de copias de los genes *MTT1*, *MTT3* y *CYCLIC* se reduce de ≈ 5 copias/ μl (225n) a ≈ 3 copias/ μl (165n) (Fig. 82). Tras 7 meses sin metal se recupera el número normal de copias de estos genes (≈ 1 copias/ μl ; 45n) en el macronúcleo de la cepa Cd-ADAP de *T. thermophila* (Fig. 82). Finalmente, tras mantener la cepa Cd-ADAP durante 10 meses sin metal y volverla a exponer a la MCT de Cd^{2+} durante una semana, se observa que el número de copias de estos genes vuelve a incrementarse hasta ≈ 3 copias/ μl (165n) (Fig. 82). En sólo una semana (que supone unas 10 divisiones celulares teniendo en cuenta el tiempo de generación ($\approx 17h$) de la cepa Cd-ADAP) se aumenta en 2 copias/ μl el número de copias de este subfragmento macronuclear e, igualmente, podemos hacer la estimación de que para detectar un aumento de 1 copia/ μl son necesarias unas 5 generaciones celulares. Además, la tolerancia a la MCT de Cd^{2+} se mantiene durante varios meses a pesar de eliminar la presión selectiva ejercida por el metal. Adamo y colaboradores (2012b) corroboran estos resultados al afirmar que cepas de levaduras tolerantes a cobre son capaces de proliferar bajo estas condiciones de estrés tras mantenerlas durante 10 ciclos de crecimiento/re-inoculación en un medio sin cobre. Nuestros resultados también corroboran las conclusiones obtenidas por Chang y

colaboradores (2013), que indican que los procesos de reorganización cromosómica suelen ser muy dinámicos y reversibles ya que las duplicaciones son inestables cuando no aportan ninguna ventaja selectiva al individuo.

La estrategia genómica de adaptación al Cd^{2+} en la cepa Cd-ADAP de *T. thermophila* se fundamenta en una amplificación diferencial o específica de un fragmento subcromosómico macronuclear que contiene el gen *MTT1* (que consideramos como el principal gen involucrado en la resistencia al Cd^{2+}). Esta amplificación, a su vez, se corresponde con una sobre-expresión del gen *MTT1* en respuesta a la presencia continuada del metal. Igualmente, este mecanismo de adaptación genómica es reversible y se mantiene mientras existe la situación de estrés y desaparece al retirar el metal del medio (Fig. 82).

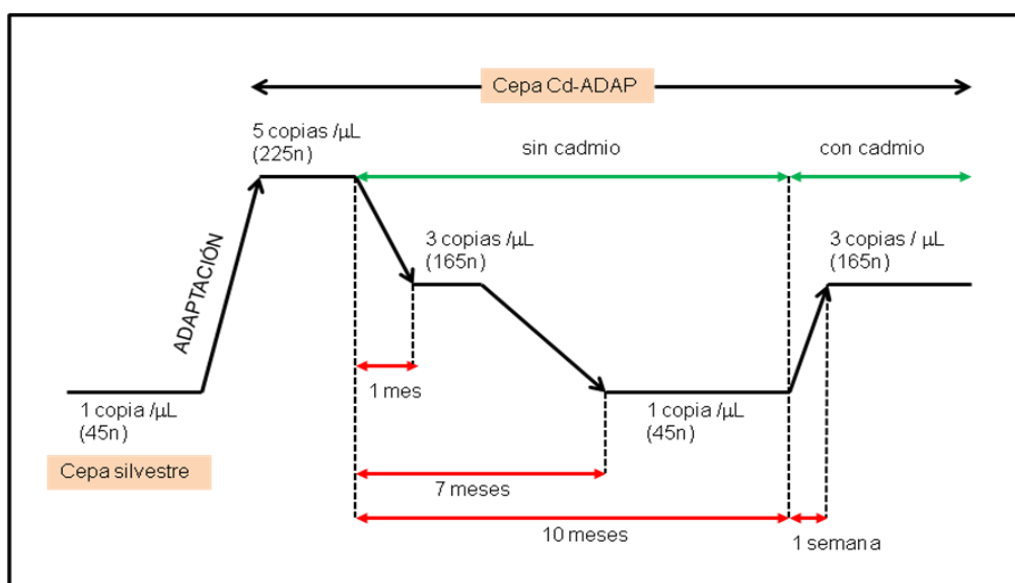


Fig. 82. Esquema-resumen de la variación reversible del número de copias del subfragmento macronuclear que contiene los genes *MTT1* y *MTT3* en la cepa Cd-ADAP de *T. thermophila*.

También debemos tener en cuenta que este aumento específico del número de copias de estos genes MT probablemente no sea el único cambio genético ligado a la evolución adaptativa de la cepa Cd-ADAP, ya que podrían existir otros genes implicados en otros mecanismos que también podrían sufrir cambios en su dosis génica, constituyendo un escenario mucho más complejo del que podríamos haber imaginado. Este tipo de mecanismo de adaptación genómica (el incremento del número de copias de los genes MT) parece ser exclusivo de la cepa Cd-ADAP, ya que no se han detectado cambios de este tipo en las otras dos cepas adaptadas a metal (Cu-ADAP y Pb-ADAP), en las que la adaptación parece estar exclusivamente relacionada con la sobre-expresión de los genes *MTT2/4* o *MTT5*, respectivamente. En estas cepas no descartamos la posibilidad de que también estén implicados otros mecanismos diferentes, como el aumento del número de bombas de eflujo para el Cu^{2+} en la cepa Cu-ADAP o el desarrollo de sistemas más eficientes para la bioacumulación y expulsión del Pb^{2+} en la cepa Pb-ADAP.

Ésta es la primera vez que se describe en protozoos ciliados la existencia de mecanismos de adaptación a estrés por metales basados en un incremento en el número de copias de genes que codifican metalotioneínas. Sin embargo, mecanismos similares a éstos en respuesta a diferentes agentes químicos tóxicos ambientales han sido descritos en otros organismos. En cepas de *S. cerevisiae* tolerantes a cobre, el gen *CUP1* (codificante de una CuMT) se encuentra hasta 7 veces amplificado, favoreciendo así la protección celular frente a las elevadas concentraciones de metal presentes en el medio (Adamo *et al.*, 2012b). En *Candida albicans*, el aumento del número de copias de los genes *ERG11* y *TAC1* confiere a este organismo la resistencia frente a un antifúngico (Selmecki *et al.*, 2008). En definitiva, este tipo de mecanismos permiten a las células adaptarse rápidamente a situaciones de estrés mediante amplificaciones de determinadas regiones cromosómicas que contienen genes críticos para llevar a cabo la respuesta celular.

Somos conscientes de la existencia de algunas preguntas que aún están por responder, como son: ¿Cómo es capaz la ADN polimerasa de distinguir entre los 200 fragmentos subcromosómicos del macronúcleo de *T. thermophila* aquellos que contienen los genes críticos (metalotioneínas) para responder a esta situación de estrés y selectivamente sobre-amplificarlos? ¿Podría estar implicado algún mecanismo epigenético en este proceso de reconocimiento molecular? Como somos optimistas, queremos pensar que estas cuestiones podrían ser resueltas en un futuro próximo, ya sea en nuestro grupo de investigación o en otro interesado en el tema.

C.3. Consideraciones sobre las cepas *knockout* y/o *knockdown* en genes MT de *T. thermophila*: la creación de nuevas isoformas de genes MT frente a la reducción del número de copias de un gen MT esencial para la célula

Se ha conseguido aislar una cepa *knockout* (KO) estable en el ciliado *T. thermophila* que afecta al gen *MTT1* (cepa MTT1KO) pero, en el caso del gen *MTT5*, no fue posible eliminar todas sus copias sin afectar a la viabilidad celular y, en este caso, se obtuvo una cepa *knockdown* (KD) (cepa MTT5KD) que mantenía un número muy reducido de copias del gen *MTT5* en su macronúcleo. Por esta razón, el gen *MTT5* ha sido considerado como un gen esencial para la viabilidad celular del ciliado *T. thermophila*. Tras consultar los trabajos publicados sobre cepas KO y/o KD que afectan a genes MT obtenidas en diferentes organismos, podemos concluir que hasta ahora no se conoce ningún caso en que un gen MT haya sido considerado como un gen esencial para la viabilidad celular. Por consiguiente, ésta es la primera vez que un gen MT es descrito como un gen esencial. Además, el gen *MTT5* de *T. thermophila* muestra características muy peculiares frente a los demás genes MT de ciliados, ya que sus moléculas de ADNc contienen hasta siete potenciales sitios de poliadenilación, presentan un intrón en su región 3'UTR que podría tener un papel clave en la regulación de la vida media del transcrito y tienen regiones promotoras con una duplicación en tándem que podría estar relacionada con los elevados niveles de expresión de este gen en respuesta a situaciones de estrés (Díaz *et al.*, 2007). Por otro lado, según los datos del *microarray* mostrados en la base de datos TetraFGD (<http://tfgd.inb.ac>) (consultada en octubre de 2014), el gen *MTT5* presenta dos picos de sobre-expresión durante el proceso sexual de la

conjugación: el primero alrededor de las 8h después de que se inicie la conjugación (período I del desarrollo del nuevo macronúcleo) y el segundo tras 18h (mitosis micronuclear y división de las células exconjugantes o período final de la conjugación). Este gen también se sobreexpresa en una etapa inicial de la respuesta celular al estrés por inanición. Además, durante la conjugación de este ciliado se pueden aislar moléculas de ARNm correspondientes al gen *MTT5* que pueden contener o no el intrón previamente mencionado en su región 3'UTR, lo que constituye el primer caso de *splicing* alternativo descrito en ciliados (Díaz *et al.*, 2007) e, igualmente, muestra la relevancia de este gen en el ciclo celular de este protozoo (proceso sexual) y avala su carácter esencial.

Independientemente de que hasta ahora ningún gen MT haya sido considerado como esencial en ninguno de los organismos estudiados, se ha constatado que todas las cepas KO y/o KD obtenidas son más sensibles al estrés por metales. Cepas *knockout* que afectan a uno (KO simples) o dos (KO dobles) genes MT aisladas del nematodo *Caenorhabditis elegans* son viables, pero más sensibles a la presencia de cadmio (Hughes and Stürzenbaum, 2007). Igualmente, las cepas *knockout* de los genes MT de *Drosophila* son viables pero estériles y altamente sensibles a la presencia de cadmio, cobre o zinc (Egli *et al.*, 2006). Las cepas *knockout* de genes MT aisladas de ratón son también más sensibles a la presencia de cadmio o zinc (Klaassen and Liu, 1998).

El número de copias del gen *MTT5* se mantiene considerablemente reducido en las cepas MTT5KD y MTT1KO+MTT5KD mientras éstas se encuentran constantemente expuestas a elevadas dosis de paromomicina o cicloheximida, respectivamente. Sin embargo, esta situación puede revertir, recuperándose de nuevo el número de copias normal para el gen *MTT5* si se retira el antibiótico correspondiente del medio de cultivo durante una semana. Este hecho también corrobora el carácter esencial del gen *MTT5*, capaz de recuperar rápidamente su número de copias normal al eliminar la presión selectiva del medio ejercida por el antibiótico.

En la cepa MTT5KD se detectó (mediante PCR cuantitativa) un aumento del número de copias del gen *MTT1* ($\approx 2,5$ copias/ μ l) con respecto a la cepa control (≈ 1 copias/ μ l). Inicialmente se pensó que, al igual que en la cepa Cd-ADAP, este aumento podía deberse a la amplificación diferencial del subfragmento cromosómico que contiene los genes *MTT1*, *MTT3* y *CYCLIC*. Sin embargo, en el MTT5KD se detectó un aumento exclusivamente del número de copias del gen *MTT1* y no de los genes *MTT3* o *CYCLIC*, es decir, la amplificación parecía afectar sólo al gen *MTT1* y no a todo el subfragmento cromosómico. Por ello, nos planteamos una hipótesis totalmente diferente a la originalmente considerada para la cepa Cd-ADAP: la existencia de duplicaciones en tándem en el mismo cromosoma del gen *MTT1*. Para dilucidar esta hipótesis llevamos a cabo una PCR estándar utilizando cebadores específicos para el ORF del gen *MTT1*. Tras el análisis electroforético de los productos amplificados pudimos detectar varias bandas que se aislaron y secuenciaron. Además del ORF del gen *MTT1* original (489 pb, incluyendo el codón stop), se pudieron identificar otras dos nuevas isoformas génicas surgidas probablemente por procesos de recombinación homóloga entre dos copias del gen *MTT1* (Fig. 83). Estas dos nuevas isoformas, denominadas *MTT1a* (321 pb) y *MTT1b* (150 pb, incluyendo el codón stop), fueron aisladas tanto a partir de muestras de ADN genómico como de ADNc (extraído de una muestra tratada con Cd²⁺). Por consiguiente, estas dos nuevas isoformas no

sólo están presentes en el genoma macronuclear de la cepa MTT5KD sino que también son transcripcionalmente activas.

Estas dos nuevas isoformas son más cortas que el gen *MTT1* original y también son bastante menos abundantes. Igualmente, estos nuevos genes codifican para MTs más cortas que la *MTT1* original: la *MTT1a* presenta una longitud de 106 aa ($\approx 34,5\%$ menos que la *MTT1* original) y la *MTT1b* tiene una longitud de 49 aa ($\approx 70\%$ menos que la *MTT1* original). La *MTT5* presenta una longitud de 99 aminoácidos (Díaz *et al.*, 2007), que es bastante similar a la de la *MTT1a* (106 aa). Sin embargo, la *MTT1b* (49 aa) tiene una longitud de casi la mitad con respecto a la *MTT5*. El número total de residuos de cisteína también es más similar entre la *MTT1a* (30 Cys) y la *MTT5* (24 Cys), con respecto a la *MTT1* original (48 Cys), mientras que la *MTT1b* (14 Cys) se separa bastante de la *MTT5*. Igualmente, su capacidad teórica de unión a metal ($\approx 10 \text{ Cd}^{2+}$ para la *MTT1a* y $\approx 5 \text{ Cd}^{2+}$ para la *MTT1b*) es más parecida a la capacidad teórica de unión a metal de la *MTT5* (8 Cd^{2+}) que a la de la *MTT1* original (17 Cd^{2+}) (Espart *et al.*, 2015). El alineamiento múltiple de las secuencias aminoacídicas de las isoformas *MTT1*, *MTT1a* y *MTT1b* muestra una completa identidad entre las tres (100%). Sin embargo, la identidad entre las nuevas isoformas *MTT1a* o *MTT1b* con la *MTT5* es sólo del 48% y del 53%, respectivamente.

Actualmente no conocemos la función real de estas dos nuevas isoformas de MTs en la cepa MTT5KD, pero podemos especular sobre ello. Quizá, y a pesar de que estas dos nuevas isoformas (*MTT1a* y *MTT1b*) presentan una baja identidad en sus secuencias aminoacídicas con la *MTT5*, éstas tienen un tamaño y un número total de residuos de cisteínas similar a la *MTT5* porque intentan reemplazarla al haberse reducido considerablemente su número de copias génicas en esta cepa MTT5KD. La producción de *novo* de estas dos nuevas isoformas génicas tiene lugar mediante la recombinación homóloga de dos copias del gen *MTT1*, concretamente entre cuatro secuencias idénticas (dos a dos) de 12 pb que están repetidas en la ORF de la *MTT1* original (Fig. 83). La secuencia 5'GGATGCAAATGT3' está implicada en el proceso de recombinación que da lugar a la *MTT1a*, mientras que la secuencia 5'GGATGTTGCTGC3' lo está en la formación de la isoforma *MTT1b* (Fig. 83).

El proceso de recombinación no parece afectar a los genes *MTT3* o *CYCLIC* (ambos muy próximos y a ambos lados del gen *MTT1*), ya que su número de copias permanece inalterado e igual que en la cepa control. Por esta razón, suponemos que deben existir otros dos sobrecruzamientos cromosómicos para que se puedan liberar las nuevas isoformas del gen *MTT1* y queden así separadas de los genes colindantes. Presumiblemente, estos nuevos fragmentos macronucleares se auto-repican en el macronúcleo como el resto de los subcromosomas, ya que estos genes se mantienen a lo largo de las sucesivas generaciones celulares. Sin embargo, no conocemos si estas dos isoformas nuevas se mantienen en el macronúcleo cuando se retira la presión selectiva que mantiene a la cepa MTT5KD con un bajo número de copias del gen esencial *MTT5*.

MTT1 original (489 pb)

5'ATGGATAAAGTTAATAGCTGTTGCTGTTGGTGTAAATGCTAAGCCATGCTGCACAGACCCCTAACAGCGGATGTTGCTGCGTAAGTAAGACTGATAATTGCTGCAAATCTGACACAAAGGAATGTTGCACTGGTACAGGAGAGGGATGCAAAATGTTGCTGTTGCTGTTAGTAAACTAATAACTGTTGTAATCTGATACTAAAGAATGCTGTACTGGTACTGGAGAAAGGATGCAAAATGTTGCTGTTGCTGTTAGTAAACTAATAACTGTTGTAATCTGATACTAAAGAATGCTGTACTGGTACTGGAGAAAGGATGCAAAATGTTGCTGTTGCTGTTAGTAAAGTATGTTGTTGGTGATAAAGCTAAGCTTGTCTGATCTACTGATCCAAACAGTGGATGTTGCTGCTCAAATAAGGCAAAATAATGCTGTGATGCTACTTCAAAGCAAGAGTGTAGACTGTTAATGTTGTAATGA3'

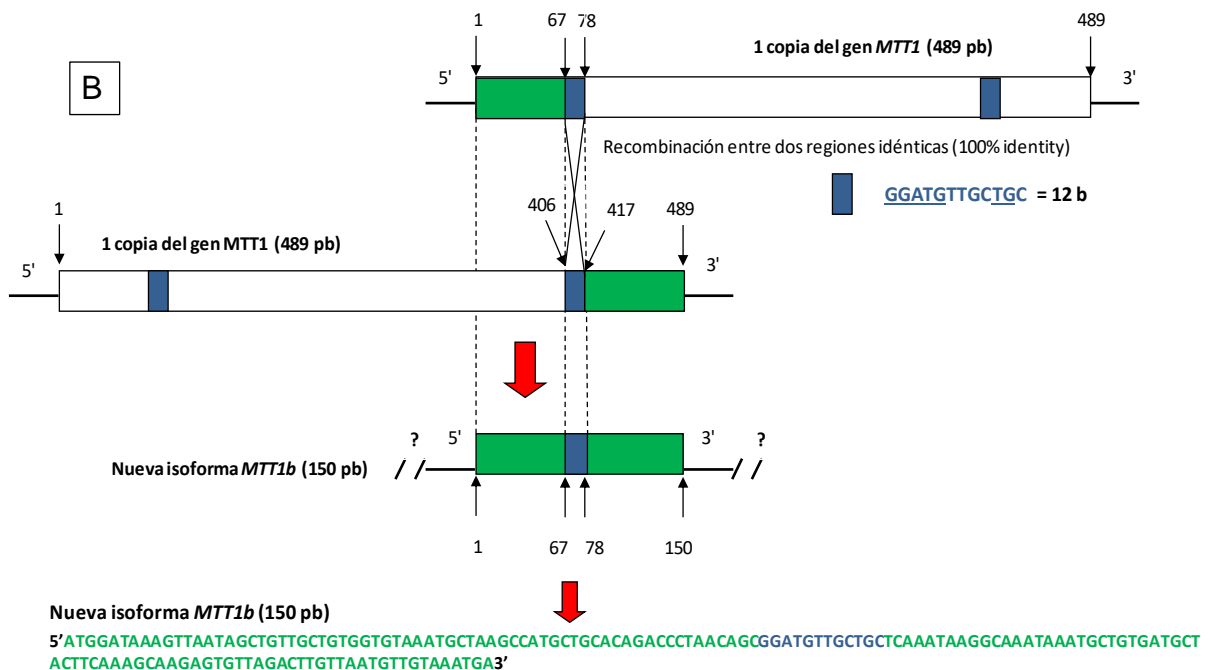
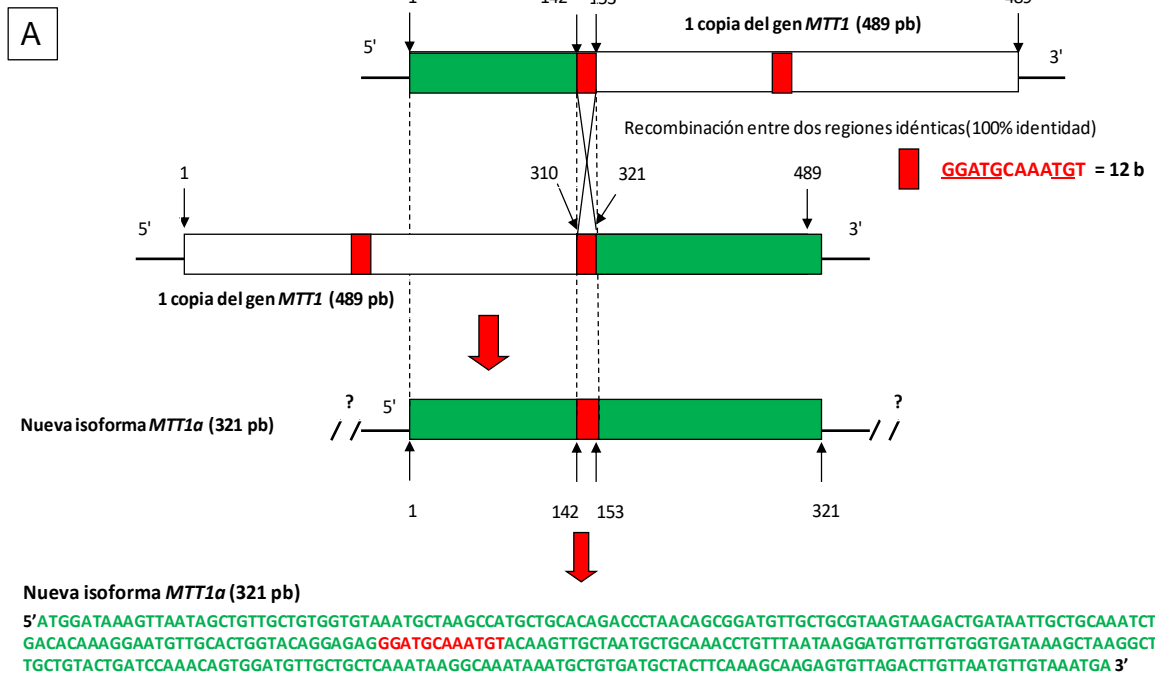


Fig. 83. Representación esquemática de los procesos de recombinación que han podido tener lugar entre las dos copias del gen *MTT1* original para dar lugar a las dos nuevas isoformas génicas *MTT1a* (A) y *MTT1b* (B) en la cepa MTT5KD. Las regiones conservadas entre las que tienen lugar las recombinaciones se indican en rojo y azul respectivamente.

Las dos nuevas isoformas génicas *MTT1a* y *MTT1b* parecen ser funcionales, ya que ambos genes se expresan en la cepa MTT5KD tras el tratamiento con Cd²⁺ (1h). Además, ambos ADNc han sido aislados y secuenciados. Sin embargo, parece que estos dos nuevos genes sólo se expresan ante determinadas condiciones de estrés y de forma minoritaria con respecto al gen *MTT1* original. Debido al 100% de identidad que presentan las tres isoformas *MTT1*, no es posible distinguirlos mediante estudios de RT-PCR cuantitativa y no podemos conocer los niveles de expresión de cada de ellas por separado. Los ADNc de los genes *MTT1a* y *MTT1b* presentan idénticas secuencias en sus regiones 3'UTR, que a su vez son exactas a las regiones 3'UTR del ADNc del gen *MTT1* original (Díaz *et al.*, 2007). Todas ellas presentan tres potenciales motivos de poliadenilación y un único motivo de degradación del ARNm.

Las CdMTs de las diferentes especies de *Tetrahymena* se caracterizan por presentar un marcado patrón modular/submodular en sus secuencias aminoacídicas. Éste surge como consecuencia de la existencia de múltiples repeticiones internas, que a su vez tienen entre sí una elevada identidad (> 70%). Estas regiones repetidas internas surgen por duplicaciones intragenéticas o parálogas, fruto de sucesivas recombinaciones. Por ello, los procesos de recombinación intra- e intergenéticos en el macronúcleo de ciliados probablemente son muy frecuentes y evolutivamente favorecen la creación de nuevas isoformas de genes MT. Un ejemplo de ello lo hemos descrito en la especie *T. malaccensis*, cuyo gen *TmalaMTT3* probablemente surgió a partir de la recombinación de dos copias del gen *TmalaMTT4* (de Francisco *et al.*, 2016). Aunque nos encontramos ante un mecanismo que podría haber sido bastante habitual en la evolución del genoma de *Tetrahymena*, la creación de estas dos nuevas isoformas génicas parece responder exclusivamente a la situación de estrés que experimenta la cepa MTT5KD, en la que se ha reducido al mínimo el número de copias de su gen esencial *MTT5*.

Se han descrito diversos cambios en el genoma (poliploidía, aneuploidía y mutaciones puntuales) de cepas *knockout* de levaduras en las que no se ha afectado a genes esenciales. Estos cambios genómicos se consideran el resultado de una evolución compensatoria, que intenta restaurar el estado celular óptimo (Liu *et al.*, 2015; Teng *et al.*, 2013). Igualmente, estos procesos de evolución compensatoria se han detectado tanto en levaduras como en bacterias después de inactivarse algunos genes esenciales (Bergmiller *et al.*, 2012). Liu y colaboradores (2015) han propuesto recientemente una nueva visión del concepto de gen esencial, basado no sólo en la viabilidad celular sino también en la capacidad natural de la célula para evolucionar y adaptarse tanto a situaciones de estrés ambiental como de estrés genético. Estos autores identifican un tipo de genes esenciales que ellos denominan "evolucionables" o capaces de evolucionar, cuya pérdida o reducción puede ser compensada por diversos cambios en el genoma. En la cepa MTT5KD, la gran reducción en el número de copias del gen esencial *MTT5* induce la creación de dos nuevas isoformas del gen *MTT1* como un posible mecanismo de evolución compensatoria. En cualquier caso, este tipo de mecanismo adaptativo basado en la creación de nuevas versiones génicas es único y nuevo en comparación con otros publicados en otros sistemas vivos.

D.- FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN AP-1 EN *Tetrahymena*: RESPUESTA A SITUACIONES DE ESTRÉS POR METALES PESADOS (Cd²⁺, Cu²⁺ o Pb²⁺)

Ante una situación de estrés ambiental, como puede ser la presencia de metales pesados en el medio, se desencadenan un conjunto de respuestas específicas que permiten la supervivencia celular. Estas respuestas generalmente implican la activación transcripcional de diferentes genes cuyos productos protegen a la célula frente a las condiciones de estrés. Los factores de transcripción pertenecientes a la superfamilia bZIP participan en el control de diferentes procesos celulares, tales como el crecimiento y la diferenciación celular o la respuesta transcripcional al AMPc. Concretamente, los factores del tipo AP-1 (pertenecientes a esta superfamilia bZIP) se han asociado con la respuesta celular frente a diferentes condiciones de estrés. Por ejemplo, en algunas levaduras un incremento del número de copias del gen *yAP-1* permite una mayor resistencia a diferentes sustancias, tales como: la cicloheximida, el metil-sulfometuron, la menadiona o el cadmio (entre otros metales) (Wemmie *et al.*, 1994) así como a condiciones de estrés oxidativo (Billard *et al.*, 1997). Por lo tanto, los genes AP-1 parecen actuar como reguladores positivos de la expresión de otros genes que actúan en los procesos de defensa celular frente al estrés. Igualmente, también estos factores se han asociado con el metabolismo celular basal y con el mantenimiento de la homeostasis de metales esenciales como el zinc (Wu *et al.*, 1993).

Los genes MT descritos en el género *Tetrahymena* carecen de elementos MREs (elementos de respuesta a metales), AREs (elementos de respuesta antioxidante) o GREs (elementos de respuesta a glucocorticoides) en sus regiones promotoras. Todos estos dominios reguladores de la expresión son característicos de los genes MT en diversos organismos (Günther *et al.*, 2012). Sin embargo, en los promotores de muchos de los genes MT descritos en las diferentes especies de *Tetrahymena* se han identificado los motivos MTCM1 (*Metallothionein Conserved Motif 1*) (Díaz *et al.*, 2007; de Francisco *et al.*, 2016; Gutiérrez *et al.*, 2009; 2011). Estos motivos presentan una secuencia consenso (5'GTGTGAATCATGAGT3') muy similar a las secuencias palindrómicas de unión de los factores de transcripción eucariotas del tipo AP-1 (5'TGA[G/C]TCA3') (Shaulian and Karin, 2002). Al igual que se ha descrito en otros organismos como *Drosophila melanogaster* o *Crassostrea virginica* (Jenny *et al.*, 2006), los factores de transcripción de la familia AP-1 podrían regular, a nivel transcripcional, la expresión de los genes MT de *Tetrahymena* en respuesta a diferentes condiciones de estrés.

Tras el análisis de los genomas macronucleares secuenciados de cuatro especies de *Tetrahymena* (*T. thermophila*, *T. borealis*, *T. ellioti* y *T. malaccensis*), hemos detectado la existencia de cuatro factores bZIP en cada una de estas especies. Al igual que ocurre en las levaduras *Saccharomyces cerevisiae* y *Kluyveromyces lactis*, en las que se ha detectado la existencia de genes AP-1 ortólogos que comparten una elevada homología entre sí, en cada una de estas cuatro especies de *Tetrahymena* también existen genes bZIP que tienen su homólogo correspondiente en las otras tres especies, tal y como se muestra en la Tabla 44 y en la Fig. 84. TthebZIP1 se asemeja mucho a TmalabZIP1 (95% identidad), TellibZIP1 (88%) y TborbZIP1 (71%). TthebZIP2 presenta elevados porcentajes de identidad con TmalabZIP2 (82%), TellibZIP2 (75%) y TborbZIP3 (58%). TthebZIP3 se parece bastante a TmalabZIP3 (94%), TellibZIP3 (89%) y TborbZIP4 (80%) y, finalmente, TthebZIP4 comparte sus mayores porcentajes de identidad con TmalabZIP4 (95%), TellibZIP4 (89%) y TborbZIP2 (79%) (Tabla 44).

Tabla 44. Matriz de identidad construida con las secuencias aminoacídicas de los diferentes factores de transcripción bZIP descritos en cuatro especies de *Tetrahymena*

	<i>T. thermophila</i>				<i>T. ellioti</i>				<i>T. borealis</i>				<i>T. malaccensis</i>			
	bZIP1	bZIP2	bZIP3	bZIP4	bZIP1	bZIP2	bZIP3	bZIP4	bZIP1	bZIP2	bZIP3	bZIP4	bZIP1	bZIP2	bZIP3	bZIP4
<i>T. thermophila</i>	bZIP1 1															
	bZIP2 29%	1														
	bZIP3 33%	31%	1													
	bZIP4 36%	27%	44%	1												
<i>T. ellioti</i>	bZIP1 88%	30%	34%	37%	1											
	bZIP2 54%	75%	31%	27%	29%	1										
	bZIP3 34%	29%	89%	44%	34%	29%	1									
	bZIP4 37%	27%	44%	89%	37%	27%	44%	1								
<i>T. borealis</i>	bZIP1 71%	30%	33%	34%	70%	29%	33%	46%	1							
	bZIP2 37%	29%	36%	79%	37%	25%	42%	79%	34%	1						
	bZIP3 29%	58%	31%	32%	29%	58%	31%	30%	22%	29%	1					
	bZIP4 34%	31%	80%	45%	36%	31%	76%	45%	31%	43%	31%	1				
<i>T. malaccensis</i>	bZIP1 95%	44%	34%	37%	90%	40%	36%	37%	72%	37%	31%	38%	1			
	bZIP2 29%	82%	32%	23%	50%	76%	30%	25%	30%	27%	58%	32%	32%	1		
	bZIP3 34%	30%	94%	45%	36%	30%	87%	46%	31%	43%	30%	78%	36%	31%	1	
	bZIP4 37%	27%	44%	95%	37%	27%	43%	90%	34%	80%	24%	44%	37%	25%	45%	1

Los mayores porcentajes de identidad obtenidos entre los factores bZIP de una misma especie se indican en rojo. En verde se indican los mayores porcentajes de identidad presentes entre los factores bZIP de las diferentes especies comparadas.

Discusión

Estos elevados porcentajes de identidad se reflejan en el árbol filogenético construido con el programa MEGA 5.01 (método Neighbor Joining) (Fig. 84).

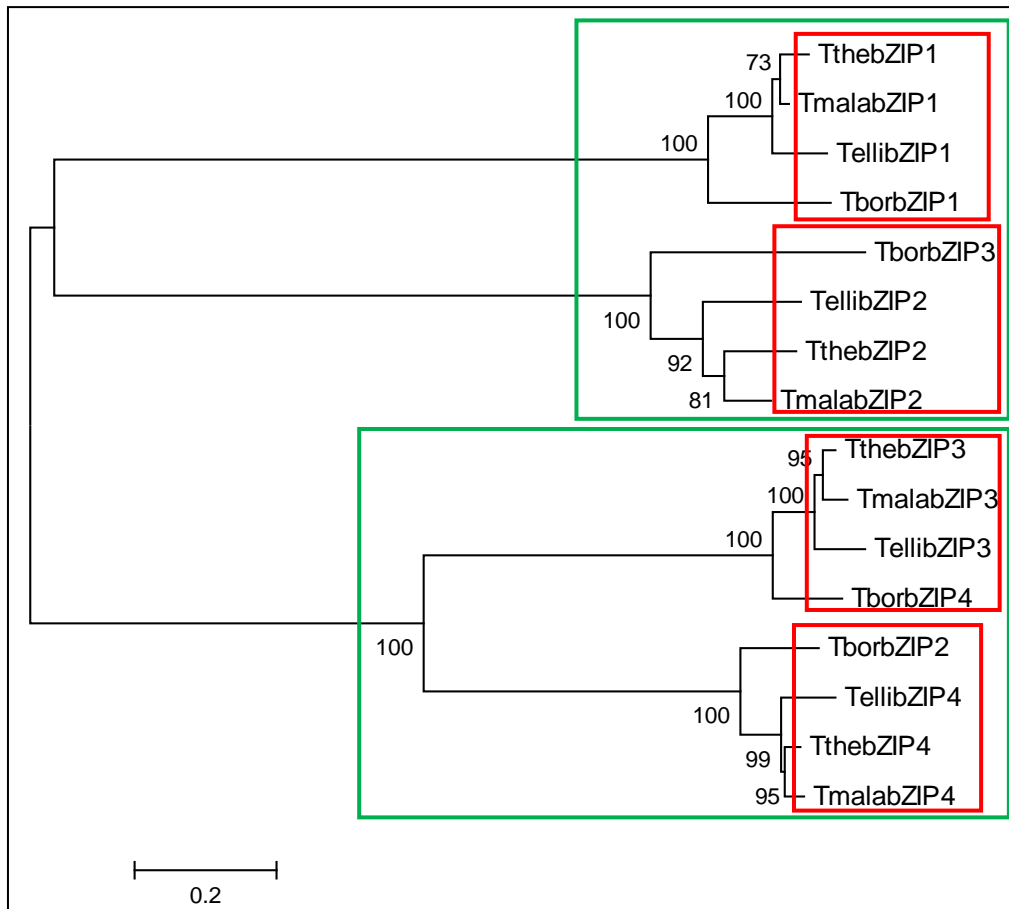


Fig. 84. Árbol filogenético construido con las secuencias aminoacídicas de los factores de transcripción bZIP encontrados en las cuatro especies de *Tetrahymena*. Este árbol se construyó con el programa MEGA 5.01 utilizando el método Neighbor Joining (NJ). La longitud de cada rama sigue la escala indicada y los valores *bootstrap* calculados por el programa se indican en cada nodo del árbol. Tthe: *T. thermophila*. Tbor: *T. borealis*. Telli: *T. ellioti*. Tmala: *T. malaccensis*. Los recuadros rojos indican los cuatro grupos de factores bZIP, cada uno de ellos constituido por cuatro factores bZIP, pertenecientes a las cuatro especies de *Tetrahymena*. Los recuadros verdes reúnen, a su vez, a dos de los recuadros rojos.

En este árbol se muestran cuatro grupos bien diferenciados, cada uno constituido por cuatro factores bZIP que pertenecen a cada una de las especies analizadas (aquellos que comparten entre sí los mayores porcentajes de identidad). Aunque las cuatro especies pertenecen al grupo *Borealis*, *T. thermophila* y *T. malaccensis* son las más próximas filogenéticamente hablando (riboset RSA1) y sus factores bZIP son los que muestran mayores porcentajes de identidad al compararlos entre sí; por el contrario, *T. borealis* es la más distante con respecto a estas dos (riboset RSA2) y sus factores bZIP muestran, en general, los menores porcentajes de identidad con respecto a los demás. Además, los cuatro factores que constituyen cada uno de los cuatro grupos tienen características estructurales muy similares,

tales como: la longitud de su secuencia aminoacídica, el número de exones/intrones de su correspondiente gen o la posición de su motivo de dimerización, existiendo así una elevada conservación no sólo en el número de factores bZIP que existe en cada una de las especies (4) sino también en sus características estructurales. Estos cuatro grupos se agrupan a su vez dos a dos en el árbol filogenético, reuniéndose en un grupo los factores de mayor tamaño (725-750 aa) y en otro los de menor tamaño (500-600 aa). Los productos de estos genes ortólogos altamente conservados podrían llevar a cabo funciones similares en las diferentes especies de *Tetrahymena* al igual que se ha detectado en algunas levaduras, en las que se han llevado a cabo estudios de complementación utilizando cepas mutantes para los genes *AP-1* y se ha comprobado que los genes ortólogos procedentes de una especie pueden complementar la mutación del gen *AP-1* en otra especie diferente (Billard *et al.*, 1997).

Además del análisis comparativo llevado a cabo entre las diferentes isoformas bZIP de las cuatro especies de *Tetrahymena*, también podemos comparar entre sí las cuatro isoformas dentro de cada una de las especies. En este caso, las cuatro isoformas bZIP dentro de una misma especie tienen porcentajes de identidad relativamente bajos entre sí (20-45%). Esto podría corroborar la hipótesis de que las cuatro isoformas son necesarias en cada una de las especies y presentan funciones diferentes entre sí. También se cumple que, en cada una de las especies, las dos isoformas bZIP que muestran un mayor porcentaje de identidad son igualmente las que tienen una mayor probabilidad de formar heterodímeros entre sí (valores previamente predichos con el programa informático *bZIP coiled-coil scoring form*) y, en las cuatro especies, éstas se corresponden con las isoformas de mayor tamaño.

Todos los factores de transcripción AP-1 encontrados en las cuatro especies de *Tetrahymena* presentan el dominio bZIP característico de esta superfamilia de factores de transcripción, existiendo un alto grado de conservación entre ellos. Sus regiones básicas, que facilitan la unión de estos factores de transcripción con las moléculas de ADN, muestran bastantes residuos conservados entre las 16 secuencias, destacándose el siguiente motivo: NR-SA(R/Q)(N/K)(S/V)R-(R/I)KK. Las cremalleras de leucina también presentan un elevado grado de conservación entre las 16 isoformas de factores bZIP comparadas, aunque éste es menor al detectado entre las regiones básicas. Las regiones ricas en leucina permiten los procesos de dimerización (Hurst, 1995) y, probablemente, por esta razón los residuos de leucina tienden a localizarse expuestos hacia la superficie de la proteína, favoreciéndose la asociación de dos monómeros bZIP entre sí y obteniéndose las conformaciones activas (homo- o heterodímeros) que regularán la expresión de determinados genes.

Los cuatro factores bZIP descritos en *T. thermophila* podrían tener funciones diferentes y probablemente complementarias en su respuesta a situaciones de estrés, tal y como muestran los resultados obtenidos por RT-PCR cuantitativa. Los factores de transcripción siempre actúan en pequeñas concentraciones y, en general, sus genes codificantes no suelen alcanzar niveles de inducción muy elevados. Por tanto, pequeños cambios detectados (aunque siempre > 2) entre las condiciones control y tras los tratamientos con metales son considerados como significativos, ya que este ligero aumento en sus niveles de expresión les permite llevar a cabo sus funciones biológicas (Kouno and Ezaki, 2012). No obstante, ante determinadas condiciones experimentales, podemos observar incluso elevados niveles de inducción de los genes *TthebZIP*, muy superiores a los esperados para factores de transcripción. Por lo tanto, estos

factores bZIP de *T. thermophila* parecen tener una gran importancia como activadores de la expresión de genes involucrados en la respuesta a estrés inducida por metales, como son los genes MT.

- **TthebZIP1: un factor de transcripción relacionado con la expresión del gen *MTT1***

En ausencia de metal, el gen *TthebZIP1* presenta unos niveles de expresión basal moderados, ni los más altos (como es el caso del gen *TthebZIP4*) ni los más bajos (como se observa para el gen *TthebZIP3*), mostrando unos valores bastante similares a los calculados para el gen *TthebZIP2* independientemente de la cepa analizada. La única excepción la encontramos en la cepa GFPMTT1, en la que los niveles de expresión basal del gen *TthebZIP1* aumentan considerablemente ($\approx 6,5x$ con respecto a la cepa control), siendo ≈ 3 veces superiores a los calculados para el gen *TthebZIP2* y ≈ 10 veces mayores a los del gen *TthebZIP3*. En la cepa GFPMTT1 existe un mayor número de copias del gen *MTT1* que se relaciona con un aumento de sus niveles de expresión basal de aproximadamente el doble y de hasta casi 7 veces para los genes *MTT2/4* con respecto a la cepa control. La elevada expresión del gen *TthebZIP1* en esta cepa podría requerirse para el mantenimiento de los niveles de expresión basal de algunos de los genes MT, como podría ser el gen *MTT1*, que normalmente presenta elevados niveles de expresión basal en ausencia de metal y, por lo tanto, al aumentarse de manera artificial sus niveles de expresión basal también se detecta un aumento de los niveles de expresión basal del gen *TthebZIP1*.

De igual forma, los perfiles de inducción del gen *TthebZIP1* tras el tratamiento con metales nos recuerdan un poco a los obtenidos para el gen *MTT1*, detectándose los mayores niveles de expresión tras los tratamientos con Cd^{2+} (24h) y, en determinadas cepas, también tras los tratamientos con Pb^{2+} (24h). En general, se obtienen mayores niveles de expresión tras los tratamientos de 24h, lo cual podría relacionarse con unos mayores requerimientos de este factor de transcripción acumulados a lo largo del tiempo. Destacan los resultados obtenidos en las cepas MTT5KD, GFPMTT5 y Cd-ADAP, en las que se aprecian los mayores niveles de inducción para el gen *TthebZIP1*. Estas tres cepas tienen en común el incremento de la expresión del gen *MTT1*, bien mediante un mayor número de copias de este gen con respecto a la cepa control ($\approx 5x$ en la cepa Cd-ADAP y $\approx 3x$ en la cepa MTT5KD) o bien mediante sus mayores niveles de expresión basal ($\approx 5x$ en el caso de la cepa GFPMTT5). De nuevo podemos apreciar una posible conexión entre los niveles de inducción del gen *TthebZIP1* en respuesta a la presencia de Cd^{2+} o Pb^{2+} y los niveles de expresión del gen *MTT1* (Fig. 85).

El factor bZIP1 presenta una mayor identidad con el factor bZIP4 (36%) en tres de las cuatro especies de *Tetrahymena* analizadas (Tabla 44) pero, sin embargo, la interacción entre sus monómeros es bastante baja (Tabla 31) y, por tanto, la forma dimérica funcional de este factor de transcripción estaría formada por dos subunidades del tipo bZIP1, constituyendo un homodímero.

- **TthebZIP2: un factor de transcripción frente a circunstancias puntuales de estrés**

El gen *TthebZIP2* presenta, al igual que el gen *TthebZIP1*, niveles de expresión basal moderados. Sin embargo, en este caso los niveles de expresión basales son bastante similares entre las diferentes cepas analizadas, sin destacarse (de manera significativa) mayores niveles de expresión basal del gen *TthebZIP2* en ninguna de ellas.

Por el contrario, el gen *TthebZIP2* es el que alcanza los mayores niveles de inducción, principalmente tras el tratamiento con Cd^{2+} (24h) o Cu^{2+} (24h), destacándose picos de expresión puntuales en determinadas cepas y ante determinados tratamientos. Su respuesta a la presencia de metal no parece ser tan generalizada como en el caso de los otros tres factores AP-1, ya que el gen *TthebZIP2* responde de manera intensa en circunstancias concretas. Por ejemplo, destaca su elevado nivel de inducción (> 60x) en la cepa Cd-ADAP tras el tratamiento con Cu^{2+} 24h. En estas mismas condiciones, existen elevados niveles de inducción para los genes *MTT2/4* y *MTT3*. También destacan los elevados niveles de inducción del gen *TthebZIP2* en las cepas Cu-ADAP y Pb-ADAP tras el tratamiento con Cd^{2+} 24h, que a su vez coinciden con elevados niveles de inducción de los genes *MTT5*, *MTT1* y *MTT3*. Curiosamente, este factor de transcripción es el único que se induce en la cepa Pb-ADAP tras el tratamiento con metales. Quizá este gen *TthebZIP2* responde intensamente ante situaciones de estrés frente a las que no son capaces de responder tan eficazmente las demás isoformas *TthebZIP*. Podría decirse que este gen responde exclusivamente de manera tardía (ya que casi no se induce con tratamientos de 1h pero lo hace de forma muy intensa tras algunos tratamientos de 24h) con el fin de reforzar la respuesta celular de aquellas cepas que se encuentran bajo mayores condiciones de estrés (principalmente cepas adaptadas a metales y KO+KD en genes MT) o que están sobre-expresando de manera artificial algún gen MT. Su función podría estar igualmente relacionada con la inducción de la expresión de cualquiera de las cinco isoformas MT de *T. thermophila*, activando aquella o aquellas que son más oportunas según cada situación de estrés (Fig. 85).

- **TthebZIP3: un factor de transcripción relacionado con la expresión del gen *MTT5***

El gen *TthebZIP3* es el que muestra los menores niveles de expresión basal independientemente de la cepa analizada. Concretamente, al comparar unas cepas con otras, podemos observar que los mayores niveles de expresión basal para este gen se detectan en las cepas *MTT1KO* (\approx 6 veces superiores a los calculados en la cepa control SB1969) y *MTT1KO+MTT5KD* (\approx 7x con respecto a la cepa control). Estas dos cepas tienen en común que en ambas se ha eliminado por completo el gen *MTT1* y el gen *MTT5* podría intentar suplir su ausencia aumentando considerablemente sus niveles de expresión basal (\approx 8,5x y \approx 59x, respectivamente).

Ante la presencia de metales pesados en el medio, el gen *TthebZIP3* muestra un perfil de inducción muy similar al del gen *TthebZIP1*, expresándose sobre todo en respuesta a los tratamientos con Cd^{2+} (1 y 24h) y Pb^{2+} (24h). Además, en varias cepas (Cd-ADAP y *MTT1KO*, principalmente) también se induce este gen tras los tratamientos con Cu^{2+} (1 y 24h). En general, los niveles de inducción del gen *TthebZIP3* son ligeramente superiores a los obtenidos

para el gen *TthebZIP1*. Su respuesta a las situaciones de estrés parece ser más general y tiene lugar tanto de forma temprana (tras las exposiciones de 1h) como tardía (tras los tratamientos de 24h). Igualmente, existe una cierta conexión entre los niveles de expresión del gen *MTT5* y el gen *TthebZIP3*, tal y como apreciamos en la cepa Cd-ADAP (expuesta a la MCT del Cd²⁺ y tras tratamientos de 24h), la cepa Cu-ADAP (frente al Cd²⁺ 24h), la cepa GFPMTT5 (que sobre-expresa el gen *MTT5*) o las cepas MTT5KD y MTT1KO+MTT5KD (que también sobre-expresan el gen *MTT5*). Por todo ello, se podría considerar cierta conexión entre el factor de transcripción *TthebZIP3* y la expresión del gen *MTT5* en *T. thermophila*, que es igualmente capaz de responder rápidamente (como “gen de alarma”) y de forma intensa a diferentes tipos de metales (principalmente frente al cadmio y plomo) (Fig. 85).

- ***TthebZIP4*: un factor de transcripción relacionado con la expresión de los genes *MTT3* y *MTT2/4***

El gen *TthebZIP4* es el que presenta los mayores niveles de expresión basal de entre los cuatro genes *bZIP* de *T. thermophila*, independientemente de la cepa estudiada. Por ejemplo, en la cepa control SB1969, los niveles de expresión basal del gen *TthebZIP4* son $\approx 6x$ los niveles del gen *TthebZIP1*, $\approx 5x$ los de *TthebZIP2* y hasta $\approx 27x$ los niveles de expresión basal del gen *TthebZIP3*. Este perfil de niveles de expresión basal (*TthebZIP4* > *TthebZIP1* \approx *TthebZIP2* > *TthebZIP3*) se mantiene en todas las cepas, sugiriendo la gran importancia que tiene el gen *TthebZIP4* como regulador de la expresión incluso en ausencia de condiciones de estrés.

Además de su elevada expresión basal, este gen también se induce notablemente ante la presencia de metales pesados en el medio, destacando su inducción principalmente tras la exposición a Cd²⁺ (1 y 24h) y a Cu²⁺ (1 y 24h). Al igual que observábamos con el gen *TthebZIP3*, que responde tanto a exposiciones de metal cortas (1h) como prolongadas en el tiempo (24h), el gen *TthebZIP4* también responde de una forma más generalizada. El gen *TthebZIP4* es el que más responde a la presencia de cobre en el medio y además lo hace de manera significativa en la mayoría de las cepas estudiadas, no de forma puntual como ocurría con el gen *TthebZIP2*. Por lo tanto, podríamos establecer una conexión entre este factor de transcripción y la expresión de los genes *MTT2/4* y *MTT3*, que suelen ser los que más responden a la presencia de cobre en el medio.

Curiosamente, los genes *TthebZIP3* y *TthebZIP4*, que muestran respectivamente los menores y mayores niveles de expresión basal, son los que tienen una mayor homología entre sí y una mayor probabilidad de formar heterodímeros. Sus funciones parecen ser complementarias no sólo por sus diferentes niveles de expresión basal sino también por sus diferentes (y a la vez complementarios) patrones de inducción: ambos se inducen notablemente en presencia de cadmio pero el gen *TthebZIP3* se induce más ante los tratamientos con plomo y el gen *TthebZIP4* lo hace ante las exposiciones con cobre. Quizá los mayores niveles de expresión basal del gen *TthebZIP4* favorecen la formación de homodímeros pero también de heterodímeros *TthebZIP4*-*TthebZIP3* cuando este segundo factor es requerido (como cuando se ha de expresar el gen *MTT5*), sin la necesidad de que el gen *TthebZIP3* se exprese tanto en condiciones basales. Además, ante una situación de estrés, la posibilidad de formar homo- o heterodímeros aumenta la posibilidad de la respuesta celular

pues normalmente estas dos conformaciones se relacionan con la activación de diferentes genes y, por tanto, con funciones diferentes (Wisdom, 1999).

Los factores AP-1 se expresan en condiciones normales de no-estrés celular pero también se inducen ante una gran variedad de estímulos que pueden estresar a la célula, tales como: radiaciones ultravioleta e ionizante, estrés oxidativo, daños en las moléculas de ADN, reorganizaciones del citoesqueleto, etc. Incluso, en células de mamífero, la activación de estos factores de transcripción puede estar inducida por fenómenos de despolarización neuronal, la unión de antígenos a los linfocitos T o B, o la detección de citoquinas, haciendo de los factores AP-1 importantes reguladores de multitud de procesos fisiológicos (Wisdom, 1999). En las regiones promotoras de los genes MT de *T. thermophila*, los motivos denominados MTCM1 (potenciales lugares de unión de factores AP-1) están en un número de copias que sigue el siguiente ranking: *MTT5* (13) >> *MTT1* (6) > *MTT3* (2) = *MTT2/4* (2). El mayor número de estos motivos (13) lo presenta el gen *MTT5*, cuyo promotor está duplicado. Estas diferencias en el número de motivos MTCM1 también se corresponden con los niveles de expresión de estos genes cuando se inducen por agentes estresantes, por lo que existirá una relación proporcional o directa con el número de factores de transcripción AP-1 que se podrán unir a sus secuencias promotoras y que serán necesarios para abrir el gen correspondiente. Por otro lado, la capacidad de estos factores para activar a una gran variedad de genes puede deberse a las modificaciones post-transcripcionales que éstos experimentan, a la composición del dímero o a su asociación con diferentes factores de transcripción o proteínas que actúan como coactivadores (Vesely *et al.*, 2009). Por ejemplo, el factor Klyap1p descrito en *Kluyveromyces lactis* se activa en presencia de H₂O₂ mediante modificaciones post-transcripcionales como fosforilaciones o modificaciones de su estado de oxidación (Billard *et al.*, 1997). Algunas familias de factores de transcripción que son capaces de interactuar con los factores AP-1 son: los receptores nucleares, los factores de transcripción Ets, las proteínas NFAT activadas por calcineurina, las proteínas Oct y las NF-κB, entre otras (Wisdom, 1999).

Todos estos datos reflejan lo complejo que es el panorama que intentamos dilucidar y todos los factores que deberíamos tener en cuenta. Además, es necesario determinar de manera experimental si estos factores TthebZIP realmente se unen a los dominios MTCM1 de los promotores de los genes MT de *T. thermophila*. No obstante, con este trabajo hemos dado un pequeño paso más para una mejor comprensión de la regulación de la expresión de los genes MT en este ciliado. Igualmente, podemos afirmar que los cuatro factores AP-1 de *T. thermophila* parecen tener un papel relevante (entre otros posibles) en la respuesta frente al estrés causado por la presencia de metales pesados en el medio, así como la posible conexión entre éstos y los genes MT de este ciliado. Esta conexión la hemos reflejado gráficamente en un modelo (Fig. 85), en el que representamos un posible escenario con las principales correlaciones entre estos factores AP-1 (bZIP) y los genes MT de *T. thermophila*. La mayoría de los factores bZIP parecen formar homodímeros (bZIP1/1, bZIP2/2, bZIP3/3 o bZIP4/4), mientras que los factores bZIP3 y bZIP4 podrían formar tanto homodímeros como heterodímeros (bZIP3/4) con el fin de reforzar la expresión del gen *MTT5* (principal gen MT involucrado en la respuesta a estrés por metales o “gen de alarma”). Además, como hemos discutido previamente, podría existir una preferencia de algunos factores bZIP por un determinado promotor de un gen MT como, por ejemplo, el bZIP1 por el promotor del gen *MTT1* (P_{MTT1}) o el

bZIP4 por los promotores de los genes *MTT3* y el par *MTT2/4*, aunque también podrían interactuar con otros. También sabemos que, cuando el gen *MTT5* está sobre-expresado, se incrementan los niveles de expresión de los genes *MTT1* y *MTT2/4*, lo que podría ser debido a que la proteína *MTT5* podría interactuar con los promotores de los genes bZIP de manera directa o indirecta incrementando su expresión, teniendo así una función adicional de inductor de los genes bZIP.

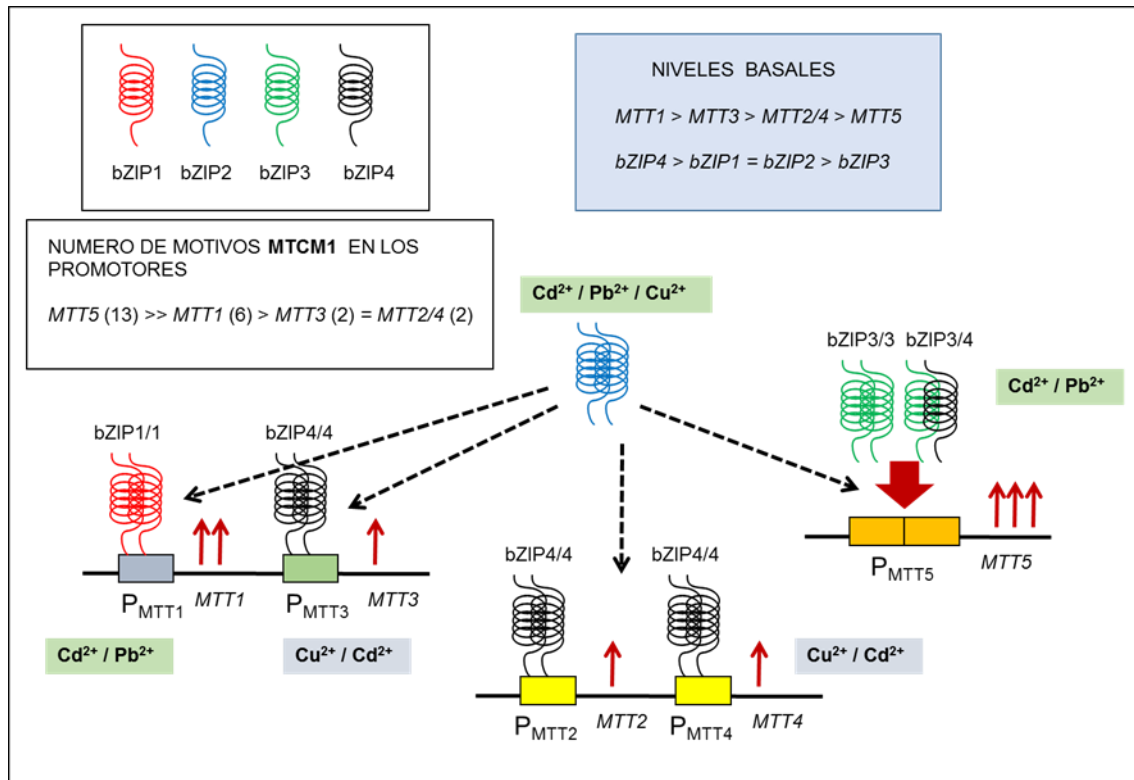


Fig. 85. Modelo hipotético que refleja el posible comportamiento de los diferentes factores de transcripción AP-1 (bZIP) y su conexión con los promotores de los diferentes genes MT (P_{MTT}) de *T. thermophila*, bajo diferentes condiciones de estrés por metales.

E.- POTENCIAL UTILIZACIÓN DE LAS CEPAS ADAPTADAS A METALES EN PROCESOS DE BIORREMEDIACIÓN

Uno de los grandes problemas del siglo XXI es la creciente contaminación ambiental como consecuencia de la industrialización y de otras actividades de origen antropogénico. Los metales pesados son, entre otros, algunos de los contaminantes considerados actualmente como prioritarios y la búsqueda de soluciones eficaces para su eliminación está en auge. Ante los clásicos métodos físico-químicos (muy costosos económicamente, poco efectivos frente a concentraciones de metal inferiores a 100 mg/L y en ocasiones generadores de subproductos dañinos), se intentan desarrollar nuevas alternativas basadas en el uso de organismos vivos

(procesos de biorremediación) para la eliminación eficaz de estos contaminantes. Existen múltiples estudios relacionados con procesos de fitorremediación y algunas variedades de plantas se han utilizado para la eliminación de Co^{2+} , Zn^{2+} y Ni^{2+} en suelos contaminados. Por ejemplo, *Thlaspi caerulescens*, una de las plantas híper-acumuladoras de Cd^{2+} más conocida, es capaz de acumular 10,6 mg de Cd^{2+} por cada gramo de peso seco en sus raíces tras 30 días de exposición a 0,32 mM de Cd^{2+} (Nedelkoska and Doran, 2000). Sin embargo, aunque algunas plantas son capaces de acumular grandes concentraciones de metales pesados, sus tasas de crecimiento suelen ser bastante bajas y su viabilidad menor a la que presentarían en ausencia de metal. Así, los procesos de fitorremediación suelen conllevar largos períodos de tiempo y la generación de una gran cantidad de biomasa vegetal que posteriormente debe incinerarse. Por estas razones, actualmente las estrategias de biorremediación se focalizan más en seleccionar microorganismos capaces de sobrevivir en medios con elevadas concentraciones de metales pesados, que puedan retirar los cationes metálicos del medio o transformarlos en sustancias menos tóxicas de forma eficaz, segura y barata (Margesin and Schinner, 2001).

Tras obtener las cepas de *T. thermophila* adaptadas a metales nos planteamos su potencial utilización como cepas biorremediadoras. Estas cepas son capaces de crecer en presencia de elevadas concentraciones de metal y, además, los mecanismos de resistencia que han desarrollado son el resultado de un proceso de evolución dirigida en el que no han participado técnicas de ingeniería genética. Concretamente, la cepa Pb-ADAP de *T. thermophila* presenta una gran capacidad de eliminación de metal ya que, en sólo 24h, se detecta una reducción de más del 90% del contenido de Pb^{2+} inicialmente presente en el medio. Por otro lado, y según los bioensayos realizados, la pequeña cantidad de metal no eliminada por esta cepa no supone una toxicidad significativa para la cepa control. Esta gran capacidad de eliminación de plomo se debe al desarrollo de un sistema de bioacumulación muy eficaz, en que las células Pb-ADAP originan agregados proteína-metal que posteriormente se eliminan al medio extracelular. Al acomplejar el plomo con la metalotioneína correspondiente, el metal ya no está biodisponible y, por lo tanto, ya no es tóxico. Este sistema de bioacumulación no parece conllevar un elevado gasto energético para la cepa Pb-ADAP, ya que ésta mantiene una tasa de crecimiento muy similar a la mostrada por la cepa control. La cepa Pb-ADAP no es sólo capaz de eliminar casi por completo la cantidad de Pb^{2+} presente en el medio, sino que, bajo estas condiciones tóxicas, es perfectamente viable y mantiene un metabolismo muy activo que le permite capturar intracelularmente el metal, inactivarlo (probablemente mediante su unión a las metalotioneínas) y liberarlo de nuevo al medio extracelular como forma no tóxica. Todo ello, unido a que se trata de un microorganismo adaptado (no modificado genéticamente), nos lleva a considerarlo como un potencial agente biorremediador.

Igualmente, las cepas Cd-ADAP y Cu-ADAP también presentan cierta actividad biorremediadora, pudiendo eliminar en 24h el 36 o el 34% del total del Cd^{2+} o del Cu^{2+} biodisponible en el medio, respectivamente. Incluso, en el caso de la cepa Cd-ADAP, a las 48h de exposición se puede alcanzar hasta un 42% del cadmio retirado del medio. Sin embargo, la cepa Cu-ADAP pierde capacidad de retirada del metal a las 48h, ya que ésta se reduce a sólo el 11%. Esto podría deberse a la expulsión del cobre (por bombeo extracelular) sin que éste sea previamente quelado por MTs. De hecho, los niveles de expresión de los genes *MTT2/4* decaen considerablemente a las 24h de exposición en la cepa Cu-ADAP. En ambos casos, tanto la

adaptación al cadmio como al cobre conllevan reducciones de las tasas de crecimiento y no se observan sistemas de bioacumulación tan eficaces como los de la cepa Pb-ADAP. Es posible que en estas dos cepas estén participando también otros mecanismos de resistencia celular diferentes al proceso de bioacumulación, que podrían inactivar las formas tóxicas del metal pero que, en cualquier caso, reducen la cantidad de metal del medio de forma menos efectiva a la observada en la cepa Pb-ADAP.

Los bioensayos mostrados aquí constituyen sólo una primera aproximación sobre el potencial uso de estas cepas adaptadas en procesos de biorremediación ambiental de metales. Más análisis serían necesarios para conocer si realmente estas cepas (sobre todo la cepa Pb-ADAP) podrían utilizarse en procesos de biorremediación *in situ*, donde las complejas condiciones ambientales podrían afectar a la viabilidad de las células y, por lo tanto, a su capacidad biorremediadora. Además, generalmente en los ecosistemas contaminados con metales existen mezclas complejas de estos contaminantes que podrían presentar sinergias (potenciación o antagonismo) que cambiarían la respuesta de estas células adaptadas a un único metal y aún desconocemos cómo reaccionarían nuestras cepas adaptadas y si serán o no eficaces en la eliminación del metal en estas condiciones. También es importante tener en cuenta el factor tiempo, ya que los procesos de biorremediación podrían ser largos y, aunque no es muy común, en ocasiones se ha descrito la formación de subproductos derivados de los contaminantes originales que podrían ser también tóxicos (Bamforth and Singleton, 2005).

Tras consultar la bibliografía publicada actualmente, comprobamos que existen numerosos estudios sobre la utilización de diversos microorganismos (principalmente bacterias y hongos) en diferentes procesos de biorremediación. Entre ellos, destaca la gran capacidad de algunas bacterias para adaptarse a las alteraciones ambientales (temperaturas altas o bajas, condiciones extremas de pH, elevadas presiones o elevada salinidad) y su potencial utilización en procesos de biorremediación *in situ*. Por ejemplo, *Vibrio harveyi* es capaz de bioacumular cadmio hasta concentraciones de 23,3 mg por cada gramo de peso seco (Abd-Elnaby *et al.*, 2011). Otras bacterias como *Enterobacter cloacae* son capaces de quelar metales pesados mediante la secreción de exopolisacáridos (procesos de biosorción), disminuyendo en un 65% el contenido de cadmio, en un 20% el contenido de cobre y en un 8% el contenido de cobalto presente en el medio (Iyer *et al.*, 2005). *Rhodobium marinum* y *Rhodobacter sphaeroides* pueden eliminar determinados metales (cadmio, zinc, cobre o plomo) mediante procesos de biosorción y bioacumulación (Panwichian *et al.*, 2011). Estos ejemplos muestran el gran potencial biorremediador de algunas bacterias, capaces de biotransformar o acumular diferentes metales pesados o biodegradar determinadas sustancias farmacéuticas, algunos compuestos heterocíclicos e hidrocarbonados y otros xenobióticos (Karigar and Rao, 2011) sin la necesidad de desarrollar previamente ninguna manipulación genética (Dash *et al.*, 2013). Los hongos también son muy versátiles y han sido considerados como potenciales agentes biorremediadores. Por ejemplo, Cecchi y colaboradores (2017) han descrito recientemente la gran capacidad de bioacumulación que presentan determinados micro-hongos aislados de ecosistemas contaminados con plata, capaces de eliminar hasta 153 mg/L de plata tras exposiciones a 330 mg/L. También existen numerosos trabajos que proponen el uso de levaduras como agentes biorremediadores. Las levaduras son capaces de retirar cationes metálicos del medio mediante procesos de biosorción (secuestro pasivo extracelular por unión

de los cationes a sus paredes celulares) pero sobre todo destacan en ellas los procesos de bioacumulación y detoxificación intracelular. Por ejemplo, recientemente se han aislado cepas de levaduras de ecosistemas contaminados con elevadas concentraciones de manganeso que podrían ser potenciales agentes biorremediadores, ya que son capaces de sobrevivir en estas condiciones de estrés, tienen tasas similares de crecimiento a las descritas para la cepa silvestre y pueden acumular 4 ó 5 veces más manganeso que la cepa control (Anh Do *et al.*, 2016).

Existen muy pocos estudios sobre procesos de biorremediación utilizando protistas. Rodríguez-Zavala y colaboradores (2007) han descrito la gran tolerancia que presenta el flagelado fotosintético *Euglena gracilis* al Cd^{2+} y su considerable capacidad acumuladora (24,5 μg de Cd^{2+} por cada gramo de peso seco tras la exposición durante 4 días a 0,1 mM de $CdCl_2$), lo que lo convierten en un potencial agente biorremediador. *E. gracilis* presenta una gran plasticidad metabólica que le permite adaptarse fácilmente a los cambios ambientales y puede ser un buen bioindicador de la contaminación por metales pesados en ecosistemas acuáticos (Einicker-Lamas, 2002). Utilizando quistes de resistencia maduros (de más de 3 meses de antigüedad) procedentes del ciliado *Colpoda inflata* y empleando a *T. thermophila* como ciliado-reportero para evaluar la biotoxicidad de la muestra, se comprobó que las glucoproteínas de la pared quística podrían llevar a cabo un proceso de biosorción para eliminar Cd^{2+} después de sólo 30 minutos de exposición a una concentración de cadmio de 0,5 mg/ml, haciendo que el medio ya no fuese tóxico para el ciliado reportero (Gutiérrez *et al.*, 2008).

En protozoos ciliados, la ausencia de pared celular en la forma vegetativa permite una mayor sensibilidad a la presencia de contaminantes ambientales y, por tanto, una respuesta celular más rápida que favorece la adaptación del microorganismo a los cambios ambientales (Gutiérrez *et al.*, 2011). Por esta misma razón se han utilizado ciliados para la construcción de biosensores celulares, capaces de detectar metales tóxicos tanto en medios acuáticos como terrestres (Amaro *et al.*, 2011; 2014; Gutiérrez *et al.*, 2015). Las cepas adaptadas a metal de *T. thermophila* fueron obtenidas mediante un proceso adaptativo sin la necesidad de aplicar ingeniería genética, y por lo tanto pueden ser consideradas como microorganismos seguros (GRAS: *Generally Recognised As Safe*).

El uso de cepas microbianas modificadas genéticamente en procesos de biorremediación ambiental presenta algunas ventajas, tales como: la optimización de la producción de determinadas enzimas implicadas en los procesos de detoxificación y la activación o represión de determinadas rutas metabólicas. Por ejemplo, la transformación bacteriana con un plásmido conteniendo el gen *merA* [que codifica una mercurio reductasa que convierte la forma tóxica del mercurio (Hg^{2+}) en una forma menos tóxica (Hg^0)] podría utilizarse en procesos de biorremediación de mercurio (De Rore *et al.*, 1994). Actualmente, se conocen multitud de bacterias modificadas genéticamente (*Pseudomonas putida*, *Burkholderia spp.*, *Sphingomonas desiccabilis*, *Ralstonia eutropha*, *Comamonas spp.*, *Achromobacter spp.*, *Alcaligenes spp.*, *Rhodococcus spp.* o *Dehalococcoides spp.*) que presentan una mayor capacidad de biodegradación de compuestos xenobióticos o de acumulación y detoxificación de metales pesados como cadmio, mercurio, plomo, zinc o uranio, debido a la inserción de determinados genes en sus genomas que les confieren mayores capacidades biorremediadoras

Discusión

(Singh *et al.*, 2011). Sin embargo, el uso de cepas recombinantes en procesos de biorremediación *in situ* también supone algunos riesgos y su liberación al medio ambiente está muy limitada. Los genes clonados pueden presentar cierta inestabilidad frente a cambios en el hábitat e igualmente podrían darse también procesos de transferencia génica horizontal que afectasen a la microbiota autóctona. Aún no se conocen bien todas las consecuencias reales de liberar microorganismos alterados genéticamente y, por tanto, los riesgos que pueden suponer para la salud del ecosistema y del ser humano. Además de este desconocimiento, los microorganismos modificados genéticamente normalmente se han desarrollado y testado bajo las condiciones controladas del laboratorio sin tener en cuenta que éstas son mucho más complejas y cambiantes en los ecosistemas naturales (Singh *et al.*, 2011).

Introducción

Objetivos

Material y Métodos

Resultados

Discusión

Conclusiones

Cuestiones por resolver en el futuro

Bibliografía

Anexos

CONCLUSIONES

A la vista de los resultados obtenidos podemos establecer las siguientes conclusiones generales:

A)- Sobre las metalotioneínas del género *Tetrahymena*

1A- El análisis comparativo de los 42 genes que codifican metalotioneínas actualmente aislados del género *Tetrahymena* junto con el gen *ImMTT2* del ciliado parásito *Ichthyophthitius multifiliis* (del mismo orden - *Hymenostomatida* - que el género *Tetrahymena*) nos confirma la subdivisión de la familia 7 (MTs de ciliados) en dos subfamilias: 7a o CdMTs y 7b o CuMTs. Ambas subfamilias se diferencian principalmente en: a) su característico patrón de cisteínas, b) la diferente proporción entre los aminoácidos Lys y Cys, c) el marcado carácter modular de las CdMTs, d) la asimetría existente en el uso de codones que codifican el aminoácido glutamina y e) la inducción preferente por Cd²⁺ o Cu²⁺, respectivamente.

2A- La marcada estructura modular y submodular de las CdMTs, la elevada conservación de las repeticiones de cisteína en las CuMTs y la existencia de múltiples isoformas génicas en cada una de las diferentes especies analizadas (en ocasiones situadas muy próximas entre sí dentro del mismo subfragmento cromosómico), parecen indicar que los procesos de duplicación (con o sin deleciones) y posterior divergencia génica han sido los mecanismos moleculares implicados en la evolución de las MTs en este grupo de ciliados. Un claro ejemplo de ello nos lo ha mostrado *T. malaccensis*, donde la isoforma de CdMT *TmalaMTT3* muy probablemente surgió por un proceso de duplicación en tándem a partir de dos copias del gen *TmalaMTT4*.

3A- Las MTs de *Tetrahymena* presentan características únicas en comparación con las MTs descritas en otros organismos, tales como: su excepcional longitud, su mayor contenido en residuos de cisteína y su mayor capacidad de quelación de metal.

4A- El análisis comparativo de las regiones 5' y 3' UTRs de los 21 nuevos ADNc descritos en este trabajo muestra la presencia generalizada del motivo conservado MTCM1 en las regiones promotoras de todos ellos, lo que posiblemente está relacionado con la regulación de la expresión de los genes MT mediante la intervención de factores de transcripción del tipo AP-1 (pertenecientes a la superfamilia bZIP).

5A- Los patrones de expresión de algunas de las nuevas isoformas de MTs de *Tetrahymena* corroboran el carácter multiestrés de estas proteínas, capaces de responder principalmente a la presencia de metales pesados en el medio pero también frente a compuestos oxidantes como el paraquat o la menadiona, condiciones de pH ácido o básico, elevadas temperaturas (42°C) o situaciones de inanición.

6A- El análisis *in silico* de las estructuras 3D de las apo-metalotioneínas de *Tetrahymena* nos muestra una gran heterogeneidad estructural, destacándose isoformas con estructuras globulares formadas por un único dominio, estructuras en "yo-yo" con dos regiones globulares

Conclusiones

conectadas entre sí mediante una región más lineal (típicas de algunas MT de vertebrados) o estructuras alargadas compuestas por uno, dos o hasta tres dominios diferenciados.

B)- Sobre el crecimiento y las características estructurales de las cepas adaptadas a elevadas concentraciones de metal

1B- La adaptación a los metales Cd^{2+} o Cu^{2+} implica una disminución de la velocidad de crecimiento de la cepa adaptada, mientras que la adaptación al Pb^{2+} no lleva consigo una reducción sustancial de la velocidad de crecimiento.

2B- Las tres cepas adaptadas a metal presentan alteraciones estructurales muy diferentes entre sí, que parecen estar relacionadas con la toxicidad del metal al que se encuentran expuestas y/o a las estrategias adaptativas que han desarrollado para protegerse de los mismos. En todos los casos estas alteraciones estructurales son reversibles, ya que desaparecen cuando se retira el metal del medio y vuelven a aparecer cuando se les expone de nuevo al metal correspondiente.

3B- La adaptación al Cd^{2+} implica un incremento del contenido lipídico intracelular, una más intensa actividad autofagosómica y una mayor formación de mucocistos. Estos orgánulos podrían también servir como un elemento adicional de biosorción de cadmio por la célula.

4B- La adaptación al Cu^{2+} lleva consigo un incremento en el número de mitocondrias, condensadas en la periferia celular.

5B- Una de las alteraciones estructurales más espectaculares de las cepas adaptadas a metal la muestra la cepa adaptada al Pb^{2+} , ya que acumula este metal en grandes inclusiones muy electrodensas que, posteriormente, expulsa al exterior. La estructura fina de este material es similar a la de algunas nanopartículas metálicas y probablemente se trata de complejos metalotioneína-metal.

C)- Sobre la expresión de los genes MT en diferentes cepas de *T. thermophila*

1C- El gen *MTT1* presenta elevados niveles de expresión basal, por lo que podría tener un papel importante (pero no esencial) en funciones basales celulares como la homeostasis de metales. La isoforma *MTT1* también es clave en la adaptación celular al Cd^{2+} y en una rápida respuesta celular frente al estrés causado por Cd^{2+} y Pb^{2+} principalmente.

2C- El gen *MTT5* se puede considerar un gen "de alarma" que se induce enormemente ante una situación de estrés y a su vez promueve la expresión de otros genes MT (como el *MTT1*, el *MTT2* y/o el *MTT4*), que también participan en los procesos de detoxificación. Además, el gen *MTT5* parece tener un papel clave en los procesos de adaptación al Pb^{2+} .

3C- La isoforma MTT3 presenta una afinidad intermedia entre Cd^{2+} y Cu^{2+} y, por esta razón, muchos autores la consideran como una MT “poco definida”. Por sus características químicas (presencia de residuos de histidina) podría estar involucrada en la homeostasis del Zn^{2+} .

4C- Las isoformas MTT2 y/o MTT4 actúan como verdaderas CuMTs, por lo que tienen un papel clave en la adaptación al cobre.

D)- Sobre los mecanismos de adaptación genética en las cepas Cd-ADAP y MTT5KD

1D- La adaptación a cadmio conlleva el incremento del número de copias de todo el subfragmento cromosómico que contiene los genes *MTT1* y *MTT3*. Este proceso de amplificación diferencial macronuclear es relativamente rápido y reversible, sin embargo, este incremento en el número de copias que afecta a estos dos genes MT sólo se traduce en un aumento de la expresión del gen *MTT1*, clave para este proceso de adaptación. Por consiguiente, el gen *MTT3* está regulado negativamente de una manera similar al mecanismo conocido como compensación de la dosis génica, presente en otros eucariotas.

2D- El gen *MTT5* es el primer gen que codifica una MT que se caracteriza como un gen esencial, por lo que no pueden obtenerse cepas de *T. thermophila* que sean *knockout* estables para este gen. La reducción del $\approx 97\%$ en la ploidía de este gen esencial en la cepa MTT5KD parece que está compensada por la creación de al menos dos nuevas isoformas génicas de metalotioneínas. Estas nuevas isoformas (*MTT1a* y *MTT1b*) se generan mediante recombinación homóloga a partir de dos copias del gen *MTT1* original y son funcionalmente activas, capaces de sobre-expresarse en respuesta a la presencia de Cd^{2+} en el medio. Este tipo de mecanismo adaptativo frente a la ausencia de un gen esencial para la célula es la primera vez que se describe en microbiología.

E)- Sobre los factores de transcripción posiblemente involucrados en la expresión de los genes MT en *T. thermophila*

1E- En las cuatro especies de *Tetrahymena* analizadas (*T. thermophila*, *T. borealis*, *T. ellioti* y *T. malaccensis*) existen cuatro factores de transcripción bZIP altamente conservados entre sí, ya que para cada uno de los cuatro factores AP-1 existe su homólogo en las otras tres especies. Esta elevada conservación evolutiva nos indica la relevancia funcional de estos factores en estas células.

2E- Independientemente de las identidades aminoacídicas entre los cuatro factores AP-1 de *T. thermophila*, la mejor capacidad teórica en la formación de heterodímeros está entre bZIP4 y bZIP3, por lo que probablemente exista una mayor tendencia a formar heterodímeros funcionales entre ellos.

3E- El factor bZIP1 de *T. thermophila* podría estar relacionado con la expresión del gen *MTT1* y con la respuesta de éste frente al estrés por Cd^{2+} o Pb^{2+} .

Conclusiones

4E- El factor bZIP2 de *T. thermophila* parece estar involucrado en el refuerzo puntual de la expresión de genes MT en células bajo un estrés extremo.

5E- Las formas diméricas bZIP3-3 y bZIP3-4 podrían estar implicadas en la activación de la expresión del gen *MTT5*, capaz de responder de forma intensa y rápida a diferentes metales.

6E- El factor bZIP4 de *T. thermophila* es el que tiene niveles basales más altos y destaca su presencia frente al Cd^{2+} y al Cu^{2+} . Podría estar vinculado a la transcripción de los genes *MTT2/4* y *MTT3*.

7E- Por primera vez en protozoos ciliados, se presenta un modelo integrado de las posibles funciones de los diferentes factores de transcripción AP-1 que podrían estar involucrados en la respuesta celular al estrés por metales.

F)- Sobre la potencial utilidad de las cepas adaptadas a metales en la biorremediación de estos contaminantes inorgánicos

1F- Las tres cepas adaptadas a elevadas concentraciones de metal podrían ser útiles en la biorremediación de los metales a los que están adaptadas, pero entre ellas la cepa adaptada al Pb^{2+} es la que presenta mayores capacidades para ser utilizada en procesos de biorremediación.

Introducción

Objetivos

Material y Métodos

Resultados

Discusión

Conclusiones

Cuestiones por resolver en el futuro

Bibliografía

Anexos

CUESTIONES POR RESOLVER EN EL FUTURO

Todo proceso de investigación científica que descubre algo nuevo provoca inexorablemente la formulación de nuevas preguntas. A lo largo del presente trabajo de tesis doctoral se han descubierto varios aspectos inéditos dentro del mundo de las metalotioneínas y, al mismo tiempo, se han originado una serie de cuestiones que quedan por resolver así como algunos aspectos aún no acabados y que esperamos se respondan y/o lleven a cabo en un futuro. Las más importantes son las siguientes:

A)- En relación con las cepas adaptadas a metales obtenidas en *T. thermophila*

1A- Dilucidar la naturaleza bioquímica de los orgánulos electrolúcidos similares a inclusiones lipídicas presentes en la cepa Cd-ADAP, aplicando métodos citoquímicos a nivel de microscopía óptica-confocal fluorescente y electrónica. Opcionalmente, llevar a cabo un análisis bioquímico del contenido lipídico de estas células y compararlas con la cepa control (no adaptada al cadmio).

2A- Analizar la naturaleza molecular de las nanopartículas metálicas que se forman en las inclusiones celulares con alta concentración de plomo de la cepa Pb-ADAP. Estos biocomplejos metálicos se podrán analizar por técnicas como Resonancia Magnética Nuclear o Espectrometría de masas, metodologías que permiten un análisis estructural de compuestos orgánicos u organometálicos. Este punto constituye uno de los objetivos ya establecidos en nuestro actual proyecto de investigación financiado (CGL2016-75494-R).

3A- Incrementar nuestro conocimiento sobre los mecanismos de adaptación de las tres cepas adaptadas, lo que podría implicar: 1- Un análisis comparativo de los niveles de expresión de genes codificantes de enzimas del sistema redox y 2- Un análisis comparativo de los niveles de expresión de genes codificantes de bombas de eflujo de cationes (sobre todo en la cepa Cu-ADAP).

4A- Completar los estudios sobre la capacidad biorremediadora de las cepas adaptadas a metales, principalmente para la cepa Pb-ADAP. Realización de bioensayos en medios acuáticos y edáficos utilizando plántulas de leguminosas.

B)- En relación con los genes MT, los mecanismos genómicos de adaptación frente a metales y a la ausencia de un gen MT esencial

1B- Intentar responder a las siguientes preguntas: ¿Cómo la ADN polimerasa identifica el fragmento subcromosómico que lleva los genes *MTT1* y *MTT3* para sobre-amplificarlo específicamente respecto del resto del genoma macronuclear en la cepa Cd-ADAP? ¿Existe algún mecanismo epigenético involucrado en este proceso?

2B- ¿Es reversible el mecanismo de creación de nuevas isoformas del gen *MTT1* en la cepa MTT5KD? ¿Cómo sobrevive la cepa MTT1KO+MTT5KD al no poder originar estas nuevas isoformas de la *MTT1* que supuestamente sustituyen al bajo número de copias del gen *MTT5*? ¿Dónde se localizan en el genoma macronuclear de *T. thermophila* estas dos nuevas isoformas de *MTT1*? ¿Por qué el gen *MTT5* es un gen esencial? ¿Qué otras funciones fundamentales desempeña en la célula?

Cuestiones por resolver en el futuro

3B- ¿Cómo se comportaría una cepa *knockout* en el gen *MTT3*? ¿Cómo la proteína MTT5 induce la sobre-expresión de genes como *MTT1* o el par *MTT2/4*? ¿Existen interacciones entre MTs y factores de transcripción? ¿Por qué el gen *MTT5*, que es esencial para la célula, es el que se expresa menos a niveles basales o constitutivos?

C)- En relación a los factores de transcripción AP-1 de *T. thermophila*

1C- Dilucidar si el modelo propuesto para el comportamiento de los cuatro factores AP-1 respecto de la expresión de los genes MT es correcto.

2C- ¿Cómo se comportarían cepas *knockout* en cada uno de los cuatro factores AP-1 en presencia y ausencia de un estrés por metal?

En resumen, estas son algunas de las preguntas básicas (entre otras que podríamos plantear) que están pendientes de una respuesta y que, ya sea nosotros u otros investigadores, deberíamos asumir en un futuro.

Introducción

Objetivos

Material y Métodos

Resultados

Discusión

Conclusiones

Cuestiones por resolver en el futuro

Bibliografía

Anexos

BIBLIOGRAFÍA

- Abd-Elnaby H, Abou-Elela GM and El-Sersy NA. (2011) Cadmium resisting bacteria in Alexandria Eastern Harbor (Egypt) and optimization of cadmium bioaccumulation by *Vibrio harveyi*. *African J Biotechnol*, 10:3412-3423.
- Adamis PDB, Panek AD, Leite SGF and Eleutherio ECA. (2003) Factors involved with cadmium absorption by a wild-type strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *Braz J Microbiol*, 34:55-60.
- Adamo GM, Brocca S, Passolunghi S, Salvato B and Lotti M. (2012a) Laboratory evolution of copper tolerant yeast strains. *Microb Cell Fact*, 11:1.
- Adamo GM, Lotti M, Tamás MJ and Brocca S. (2012b) Amplification of the *CUP1* gene is associated with evolution of copper tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology*, 158:2325-2335.
- Ahemad M. (2014) Bacterial mechanisms for Cr(IV) resistance and reduction: an overview and recent advances. *Folia Microbiol*, 59:321-332.
- Amaro F, De Lucas MP, Martín-González A and Gutiérrez JC. (2008) Two new members of the *Tetrahymena* multi-stress inducible metallothionein family: Characterization and expression analysis of *T. rostrata* Cd/Cu metallothionein genes. *Gene*, 423:85-91.
- Amaro F, Turkewitz AP, Martín-González A and Gutiérrez JC. (2011) Whole-cell biosensors for detection of heavy metal ions in environmental samples based on metallothionein promoters from *Tetrahymena thermophila*. *Microb Biotechnol*, 4:513-522.
- Amaro F, Turkewitz AP, Martín-González A and Gutiérrez JC. (2014) Functional GFP-metallothionein from *Tetrahymena thermophila*: a potential whole-cell biosensor for monitoring heavy metal pollution and a cell model to study metallothionein overproduction effects. *Biometals*, 27:195-205.
- Ambjørn M, Asmussen JW, Lindstam M, Gotfryd K, Jacobsen C, Kiselyov VV, Moestrup SK, Penkowa M, Bock E and Berezin V. (2008) Metallothionein and a peptide modeled after metallothionein, EmtinB, induce neuronal differentiation and survival through binding to receptors of the low-density lipoprotein receptor family. *J Neurochem*, 104:21-37.
- An YJ, Kim YM, Kwon TI and Jeong SW. (2004) Combined effects of copper, cadmium, and lead upon *Cucumis sativus* growth and bioaccumulation. *Sci Total Environ*, 326:85-63.
- Anh Do T, Sakai T, Kishida M and Furuta M. (2016) Isolation and characterization of a variant manganese resistant strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biocontrol Sci*, 21:253-260.
- Andrews GK. (2000) Regulation of metallothionein gene expression by oxidative stress and metal ions. *Biochem Pharmacol*, 59:95-104.
- Andrews GK, Huet-Hudson YM, Paria BC, McMaster MT, De SK and Dey SK. (1991) High levels of metallothionein messenger RNAs in male germ cells of the adult mouse. *Mol Endocrinol*, 5:628-636.

Bibliografia

- Appukkuttan D, Rao AS and Apte SK. (2006) Engineering of *Deinococcus radiodurans* R1 for bioprecipitation of uranium from dilute nuclear waste. *Appl Environ Microbiol*, 72:7873-7878.
- Arshadi M and Mousavi SM. (2014) Enhancement of simultaneous gold and copper extraction from computer printed circuit boards using *Bacillus megaterium*. *Bioresour Technol*, 175:315-324.
- Arseniev A, Schultze P, Wörgötter E, Braun W, Wagner G, Vášak M, Kägi JH and Wüthrich K. (1988) Three-dimensional structure of rabbit liver [Cd7] metallothionein-2a in aqueous solution determined by nuclear magnetic resonance. *J Mol Biol*, 201:637-657.
- Asai DJ and Forney JD. (2000) *Tetrahymena thermophila*. San Diego, Academic Press.
- Atkins P and Jones L. Chemistry - Molecules, Matter and Change. 3rd ed., W. H. Freeman, New York (1997).
- Atrian S and Capdevila M. (2013) Metallothionein-protein interactions. *Biomol Concepts*, 4:143-160.
- Aury JM, Jaillon O, Duret L, Noel B, Jubin C, Porcel BM, Ségurens B, Daubin V, Anthouard V, Aïach N, Arnaiz O, Billaut A, Beisson J, Blanc I, Bouhouche K, Câmara F, Duharcourt S, Guigo R, Gogendeau D, Katinka M, Keller AM, Kissmehl R, Klotz C, Koll F, Le Mouél A, Lepère G, Malinsky S, Nowacki M, Nowak JK, Plattner H, Poulain J, Ruiz F, Serrano V, Zagulski M, Dessen P, Bétermier M, Weissenbach J, Scarpelli C, Schächter V, Sperling L, Meyer E, Cohen J and Wincker P. (2006) Global trends of the whole-genome duplications revealed by the ciliate *Paramecium tetraurelia*. *Nature*, 444:171-178.
- Bailey TL and Elkan C. (1994) Fitting a mixture model by expectation maximization to discover motifs in biopolymers. *Proc Int Conf Intell Syst Mol Biol*, 2:28-36.
- Bamforth SM and Singleton I. (2005) Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons: current knowledge and future directions. *J Chem Technol Biotechnol*, 80:723-736.
- Baranyi J and Roberts TA. (1994) A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. *Int J Food Microbiol*, 23:277-294.
- Bargelloni L, Scudiero R, Parisi E, Carginale V, Capasso C and Patarnello T. (1999) Metallothioneins in Antarctic fish: evidence for independent duplication and gene conversion. *Mol Biol Evol*, 16:885-897.
- Bauman JW, Madhu C, McClim Jr JM, Liu Y and Klaassen CD. (1992) Induction of hepatic metallothionein by paraquat. *Toxicol Appl Pharmacol*, 117:233-241.
- Bell SG and Vallee BL. (2009). The metallothionein/thionein system: an oxidoreductive metabolic zinc link. *Chembiochem*, 10:55-62.
- Berman, J. (2016) Ploidy plasticity: a rapid and reversible strategy for adaptation to stress. *FEMS Yeast Res*, 16:1-4.
- Bergmiller T, Ackermann M and Silander OK. (2012) Patterns of evolutionary conservation of essential genes correlate with their compensability. *PLoS Genet*, 8:1-13.

- Bertin G and Averbeck D. (2006) Cadmium: cellular effects, modifications of biomolecules, modulation of DNA repair and genotoxic consequences (a review). *Biochimie*, 88:1549-1559.
- Besold AN, Culbertson EM and Culotta VC. (2016). The Yin and Yang of copper during infection. *J Biol Inorg Chem*, 21:137-44.
- Billard P, Dumond H and Bolotin-Fukuhara M. (1997) Characterization of an AP-1-like transcription factor that mediates an oxidative stress response in *Kluyveromyces lactis*. *Mol Gen Genet*, 257:62-70.
- Binz PA and Kägi JHR. (1999) Metallothionein: molecular evolution and classification. In *Metallothionein IV*. C. D. Klaasen (Ed.). Basel Birkhäuser, Verlag, pp. 7-13.
- Blanchette EJ. (1966) Ovarian steroid cells. I. Differentiation of lutein cell from the granulosa follicle cell during the preovulatory stage and under the influence of exogenous gonadotrophins. *J Cell Biol*, 31:501-516.
- Blindauer CA. (2008) Metallothioneins with unusual residues: histidines as modulators of zinc affinity and reactivity. *J Inorg Biochem*, 102:507-521.
- Blindauer CA, Harrison MD, Parkinson JA, Robinson AJ, Cavet JS, Robinson NJ and Sadler PJ. (2001) A metallothionein containing a zinc finger within a four-metal cluster protects a bacterium from zinc toxicity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 98:9593-9598.
- Bofill R, Capdevila M and Atrian S. (2009) Independent metal-binding features of recombinant metallothioneins convergently draw a step gradation between Zn- and Cu-thioneins. *Metallomics*, 1:229-34.
- Boldrin F, Santovito G, Irato P and Piccinni E. (2002) Metal interaction and regulation of *Tetrahymena pigmentosa* metallothionein genes. *Protist*, 153:283-291.
- Boldrin F, Santovito G, Gaertig J, Wloga D, Cassidy-Hanley D, Clark TG and Piccinni E. (2006) Metallothionein gen from *Tetrahymena thermophila* with a copper-inducible-repressible promoter. *Eukaryot Cell*, 5:422-425.
- Bondarenko O, Rolova T, Kahru A and Ivask A. (2008) Bioavailability of Cd, Zn and Hg in soil to nine recombinant luminescent metal sensor bacteria. *Sensors*, 8:6899-6923.
- Bornberg-Bauer E, Rivals E and Vingron M. (1998) Computational approaches to identify leucine zippers. *Nucleic Acids Res*, 26:2740-2746.
- Braithwaite EK, Mattie MD and Freedman JH. (2010) Activation of metallothionein transcription by 4-hydroxynonenal. *J Biochem Mol Toxicol*, 24: 330-334.
- Bräutigam A, Schaumlöffel D, Preud'homme H, Thondorf I and Wesenberg D. (2011) Physiological characterization of cadmium-exposed *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Cell Environ*, 34:2071–2082.
- Brown DA. (2001) Lipid droplets: proteins floating on a pool of fat. *Curr Biol*, 11: R446-449.
- Bruins MR, Kapil S and Oehme FW. (2000) Microbial resistance to metals in the environment. *Ecotoxicol Environ Saf*, 45:198-207.

Bibliografia

- Burgos A, Maldonado J, De los Rios A, Solé A and Esteve I. (2013) Effect of copper and lead on two consortia of phototrophic microorganisms and their capacity to sequester metals. *Aquat Toxicol*, 140-141:324-336.
- Busvine JR. (1954) Houseflies resistant to a group of chlorinated hydrocarbon insecticides. *Nature*, 174:783-785.
- Butler PR, Brown M and Oliver SG. (1996) Improvement of antibiotic titers from *Streptomyces* bacteria by interactive continuous selection. *Biotechnol Bioeng*, 49:185-196.
- Çakar ZP, Alkim C, Turanlı B, Tokman N, Akman S, Sarikaya M, Tamerler C, Benbadis L and François JM. (2009) Isolation of cobalt hyper-resistant mutants of *Saccharomyces cerevisiae* by in vivo evolutionary engineering approach. *J Biotechnol*, 143:130-138.
- Calderone V, Dolderer B, Hartmann HJ, Echner H, Luchinat C, Del Bianco C, Mangani S and Weser U. (2005) The crystal structure of yeast copper thionein: the solution of a long-lasting enigma. *Proc Natl Acad Sci USA*, 102:51-56.
- Capasso C, Carginale V, Crescenzi O, Di Maro D, Parisi E, Spadaccini R and Temussi PA. (2003) Solution structure of MT-nc, a novel metallothionein from the Antarctic fish *Notothenia coriiceps*. *Structure*, 11:435-443.
- Capdevila M and Atrian S. (2011) Metallothionein protein evolution: a miniassay. *J Biol Inorg Chem*, 16:977-989.
- Capdevila M, Bofill R, Palacios O and Atrian S. (2011) State-of-the-art of metallothioneins at the beginning of the 21st century. *Coord Chem Rev*, 256:46-62.
- Capecchi, MR. (1989) Altering the genome by homologous recombination. *Science*, 244:1288-1292.
- Carpène E, Andreani G and Isani G. (2007) Metallothionein functions and structural characteristics. *J Trace Elem Med Biol*, 21:35-39.
- Cecchi G, Marescotti P, Di Piazza S and Zotti M. (2017) Native fungi as metal remediators: silver myco-accumulation from metal contaminated waste-rockdumps (Libiola Mine, Italy). *J Environ Sci Health B*, 52:191-195.
- Chang SL, Lai HY, Tung SY and Leu JY. (2013) Dynamic large-scale chromosomal rearrangements fuel rapid adaptation in yeast populations. *PLoS Genet*, 9(1):e1003232.
- Chang Y, Liu G, Guo L, Liu H, Yuan D, Xiong J, Ning Y, Fu C and Miao W. (2014) Cd-Metallothionein in three additional *Tetrahymena* species: intragenic repeat patterns and induction by metal ions. *J Eukaryot Microbiol*, 61:333-342.
- Chantangsi C and Lynn DH. (2008) Phylogenetic relationships within the genus *Tetrahymena* inferred from the cytochrome c oxidase subunit 1 and small subunit ribosomal RNA genes. *Mol Phylogenet Evol*, 49:979-987.
- Chen WY, John JA, Lin CH and Chang CY. (2002) Molecular cloning and developmental expression of zinc finger transcription factor MTF-1 gene in zebrafish, *Danio rerio*. *Biochem Biophys Res Commun*, 291:798-805.
- Cheung AP, Au CY, Chan WW and Chan KM. (2010) Characterization and localization of metal-responsive-element-binding transcription factors from tilapia. *Aquat Toxicol*, 99:42-55.

- Cheung A, Pok L, Vincent KLL and King MC. (2005) Tilapia metallothionein genes: PCR-cloning and gene expression studies. *Biochim Biophys Acta*, 1731:191-201.
- Chiera NM, Rowinska-Zyrek M, Wieczorek R, Guerrini R, Witkowska D, Remelli M and Kozłowski H. (2013) Unexpected impact of the number of glutamine residues on metal complex stability. *Metallomics*, 5:214-221.
- Choudhury R and Srivastava S. (2001) Zinc resistance mechanisms in bacteria. *Curr Sci*, 81:768-775.
- Church HJ, Day JP, Braithwaite RA and Brown SS. (1993) Binding of lead to a metallothionein-like protein in human erythrocytes. *J Inorg Biochem*, 49:55-68.
- Cobine PA, McKay RT, Zangger K, Dameron CT and Armitage IM. (2004) Solution structure of Cu₆ metallothionein from the fungus *Neurospora crassa*. *Eur J Biochem*, 271:4213-4221.
- Costa D, Mariën J, Janssens TK, van Gestel CA, Driessen G, Sousa JP, van Straalen NM and Roelofs D. (2012) Influence of adaptive evolution of cadmium tolerance on neutral and functional genetic variation in *Orchesella cincta*. *Ecotoxicology*, 21:2078-87.
- Costa GB, Simioni C, Pereira DT, Ramlov F, Maraschin M, Chow F, Horta PA, Bouzon ZL and Schmidt EC. (2017) The brown seaweed *Sargassum cymosum*: changes in metabolism and cellular organization after long-term exposure to cadmium. *Protoplasma*, 254:817-837.
- Coyle P, Philcox JC, Carey LC and Rofe AM. (2002) Metallothionein: the multipurpose protein. *Cell Mol Life Sci*, 59:627-647.
- Dal Corso G, Farinati S and Furini A. (2010) Regulatory networks of cadmium stress in plants. *Plant Signal Behav*, 5:663-667.
- Dalton TP, Solis WA, Nebert DW and Carvan MJ 3rd. (2000) Characterization of the MTF-1 transcription factor from zebrafish and trout cells. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 126:325-335.
- Daniels MJ, Turner-Cavet JS, Selkirk R, Sun H, Parkinson JA, Sadler PJ and Robinson NJ. (1998) Coordination of Zn²⁺ (and Cd²⁺) by prokaryotic metallothionein. Involvement of His-Imidazole. *J Biol Chem*, 273:22957-22961.
- Dash HR, Mangwani N, Chakraborty J, Kumari S and Das S. (2013) Marine bacteria: potential candidates for enhanced bioremediation. *Appl Microbiol Biotechnol*, 97:561-571.
- De Francisco P, Melgar LM, Díaz S, Martín-González A and Gutiérrez JC. (2016). The *Tetrahymena* metallothionein gene family: twenty-one new cDNAs, molecular characterization, phylogenetic study and comparative analysis of the gene expression under different abiotic stressors. *BMC Genomics*, 17:346-369.
- De Rore H, Top E, Houwen F, Mergcaj M and Verstraete W. (1994) Evolution of heavy metal-resistant transconjugants in a soil environment with a concomitant selective pressure. *FEMS Microbiol Ecol*, 14:263-273.

Bibliografía

- Devisscher L, Hindryckx P, Lynes MA, Waeytens A, Cuvelier C, De Vos F, Vanhove C, Vos MD and Laukens D. (2014) Role of metallothioneins as danger signals in the pathogenesis of colitis. *J Pathol*, 233:89-100.
- Díaz F and Moraes CT. (2008) Mitochondrial biogenesis and turnover. *Cell Calcium*, 44:24-35.
- Díaz S, Amaro F, Rico D, Campos V, Benítez L, Martín-González A, Hamilton E, Orias E and Gutiérrez JC. (2007) *Tetrahymena* metallothioneins fall into two discrete subfamilies. *PLoS One*, 2:e291.
- Díaz S, Martín-González A, Cubas L, Ortega R, Amaro F, Rodríguez-Martín D and Gutiérrez JC. (2016) High resistance of *Tetrahymena thermophila* to paraquat: mitochondrial alterations, oxidative stress and antioxidant genes expression. *Chemosphere*, 144:909-917.
- Di Croce L, Okret S, Kersten S, Gustafsson JA, Parker M, Wahli W and Beato M. (1999) Steroid and nuclear receptors. Villefranche-sur-Mer, France, May 25-27. 1999. *EMBO J*, 18:6201-6210.
- Docampo R and Moreno SN. (2008) The acidocalcisome as a target for chemotherapeutic agents in protozoan parasites. *Curr Pharm Des*, 14:882-888.
- Doerder FP, Deak JC and Lief JH. (1992) Rate of phenotypic assortment in *Tetrahymena thermophila*. *Dev Genet*, 13:126-132.
- Domenech J, Bofill R, Tinti A, Torreggiani A, Atrian S and Capdevilla M. (2008) Comparative insights into the Zn(II)-, Cd(II)- and Cu(I)- binding features on the protozoan *Tetrahymena pyriformis* MT1 metallothionein. *Biochim Biophys Acta*, 1784:693-704.
- Dondero F, Cavaletto M, Chezzi AR, La Terza A, Banni M and Viarengo A. (2004) Biochemical characterization and quantitative gene expression analysis of the multi-stress inducible metallothionein from *Tetrahymena thermophila*. *Protist*, 155:157-168.
- Duffus, JH. (2002) "Heavy metals" - A meaningless term? (IUPAC Technical Report). *Pure Appl Chem*, 74: 793-807.
- Egli D, Yepiskoposyan H, Selvaraj A, Balamurugan K, Rajaram R, Simons A, Multhaup G, Mettler S, Vardanyan A, Georgiev O and Schaffner W. (2006) A family knockout of all four *Drosophila* metallothioneins reveals a central role in copper homeostasis and detoxification. *Mol Cell Biol*, 26:2286-2296.
- Einicker-Lamas M, Mezian GA, Fernandez TB, Silva FL, Guerra F, Miranda K, Attias M and Oliveira MM. (2002) *Euglena gracilis* as a model for the study of Cu²⁺ and Zn²⁺ toxicity and accumulation in eukaryotic cells. *Environ Pollut*, 120:779-786.
- Eisen JA, Coyne RS, Wu M, Wu D, Thiagarajan M, Wortman JR, Badger JH, Ren Q, Amedeo P, Jones KM, Tallon LJ, Delcher AL, Salzberg SL, Silva JC, Haas BJ, Majoros WH, Farzad M, Carlton JM, Smith RK Jr, Garg J, Pearlman RE, Karrer KM, Sun L, Manning G, Elde NC, Turkewitz AP, Asai DJ, Wilkes DE, Wang Y, Cai H, Collins K, Stewart BA, Lee SR, Wilamowska K, Weinberg Z, Ruzzo WL, Wloga D, Gaertig J, Frankel J, Tsao CC, Gorovsky MA, Keeling PJ, Waller RF, Patron NJ, Cherry JM, Stover NA, Krieger CJ, del Toro C, Ryder HF, Williamson SC, Barbeau RA, Hamilton EP and Orias E. (2006) Macronuclear genome sequence of the ciliate *Tetrahymena thermophila*, a model eukaryote. *PLoS Biol*, 4:c286.

- Erk M and Raspor B. (2001) Interference of Pb leaching from the pH electrode on Cd-metallothionein complex. *Analitica Chimica Acta*, 442:165-170.
- Espart A, Marín M, Gil-Moreno S, Palacios O, Amaro F, Martín-González A, Gutiérrez JC, Capdevila M and Atrian S. (2015) Hints for metal-preference protein sequence determinants: different metal binding features of the five *Tetrahymena thermophila* metallothioneins. *Int J Biol Sci*, 11:456-471.
- Fairbrother A, Wenstel R, Sappington K and Wood W. (2007) Framework for metals risk assessment. *Ecotoxicol Environ Saf*, 58:145-227.
- Farslow JC, Lipinski KJ, Packard LB, Edgley ML, Taylor J, Flibotte S, Moerman DG, Katju V And Bergthorsson U. (2015) Rapid increase in frequency of gene copy-number variants during experimental evolution in *Caenorhabditis elegans*. *BMC Genomics*, 16:1-18.
- Fong JH, Keating AE and Singh M. (2004) Predicting specificity in bZIP coiled-coil protein interactions. *Genome Biol*, 5:R11.
- Ford CB, Funt JM, Abbey D, Issi L, Guiducci C, Martinez DA, Delorey T, Li BY, White TC, Cuomo C, Rao RP, Berman J, Thompson DA and Regev A. (2015) The evolution of drug resistance in clinical isolates of *Candida albicans*. *ELife*. 4:1-27.
- Formigari A, Irato P and Santon A. (2007) Zinc, antioxidant systems and metallothionein in metal mediated-apoptosis: biochemical and cytochemical aspects. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, 146:443-459.
- Fowler BA, Hildebrand CE, Kojima Y and Webb M. (1987) Nomenclature of metallothionein. *Experientia Suppl*, 52:19-22.
- Franco R, Sánchez-Olea R, Reyes-Reyes EM and Panayiotidis MI. (2009) Environmental toxicity, oxidative stress and apoptosis: menage a trois. *Mutat Res*, 674:3-22.
- François F, Lombard C, Guigner JM, Soreau P, Brian-Jaisson F, Martino G, Vandervennet M, García D, Molinier AL, Pignol D, Peduzzi J, Zirah S and Rebuffat S. (2011) Isolation and characterization of environmental bacteria capable of extracellular biosorption of mercury. *Appl Environ Microbiol*, 78:1097-1106.
- Fu C and Miao W. (2006) Cloning and characterization of a new multi-stress inducible metallothionein gene in *Tetrahymena pyriformis*. *Protist*, 157:193-203.
- Fujiwara Y and Satoh M. (2013) Protective role of metallothionein in chemical and radiation carcinogenesis. *Curr Pharm Biotechnol*, 14:394-399.
- Gadd, GM. (2000) Heavy metal pollutants: environmental and biotechnological aspects. *The Encyclopedia of Microbiology*. J. Lederberg. New York, Academic Press. 2:607-617.
- Gallego A, Martín-González A, Ortega R and Gutiérrez JC. (2007) Flow cytometry assessment of cytotoxicity and reactive oxygen species generation by single and binary mixtures of cadmium, zinc and copper on populations of the ciliated protozoan *Tetrahymena thermophila*. *Chemosphere*, 68:647-661.
- García-García JD, Sánchez-Thomas R and Moreno-Sánchez R. (2016) Bio-recovery of non-essential heavy metals by intra- and extracellular mechanisms in freeliving microorganisms. *Biotechnol Adv*, 34:859-873.

Bibliografía

- Geva P, Kahta R, Nakonechny F, Aronov S and Nisnevitch M. (2016) Increased copper bioremediation ability of new transgenic and adapted *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Environ Sci Pollut Res Int*, 23:19613-19625.
- Gittins JR, D'Angelo C, Oswald F, Edwards RJ and Wiedenmann J. (2015) Fluorescent protein-mediated colour polymorphism in reef corals: multicopy genes extend the adaptation/acclimatization potential to variable light environments. *Mol Ecol*, 24:453-65.
- Goering PL. (1993) Lead-protein interactions as a basis for lead toxicity. *Neurotoxicology*, 14:45-60.
- Gong J, Dong J, Liu X and Massana R. (2013) Extremely high copy number and polymorphisms of the rDNA operon estimated from the single cell analysis of oligotrich and peritrich ciliates. *Protist*, 164:369-379.
- Gowri PM and Srivastava S. (1996) Reduced uptake based zinc resistance in *Azospirillum brasilense* sp7. *Curr Sci*, 71:139-142.
- Goyer RA. (1990) Lead toxicity: from overt to subclinical to subtle health effects. *Environ Health Perspect*, 86:177-181.
- Grill E, Winnacker EL and Zenk MH. (1986) Synthesis of seven different homologous phytochelatins in metal-exposed *Schizosaccharomyces pombe* cells. *FEBS Lett*, 197:115-120.
- Grill E, Thumann J, Winnacker EL and Zenk MH. (1988) Induction of heavy metal phytochelatins by inoculation of cell cultures in standard media. *Plant Cell Rep*, 7:375-378.
- Grill E, Löffler S, Winnacker EL and Zenk MH. (1989) Phytochelatins, the heavy-metal-binding peptides of plants, are synthesized from glutathione by a specific gamma-glutamylcysteine dipeptidyl transpeptidase (phytochelatin synthase). *Proc Natl Acad Sci*, 86:6838-6842.
- Grüber C, Stürzenbaum S, Gehrig P, Sack R, Hunziker P, Berger B and Dallinger R. (2000) Isolation and characterization of a self-sufficient one-domain protein (Cd)-metallothionein from *Eisenia foetida*. *Eur J Biochem*, 267:573-582.
- Guimarães-Soares L, Felícia H, João Bebianno M and Cássio F. (2006) Metal-binding proteins and peptides in the aquatic fungi *Fontanospora fusiformis* and *Flagellospora curta* exposed to severe metal stress. *Sci Total Environ*, 372:148-156.
- Günther V, Lindert U and Schaffner W. (2012) The taste of heavy metals: Gene regulation by MTF-1. *Biochim Biophys Acta*, 1823:1416-1425.
- Guo L, Fu C and Miao W. (2008) Cloning, characterization and gene expression analysis of a novel cadmium metallothionein gene in *Tetrahymena pigmentosa*. *Gene*, 423:29-35.
- Gutiérrez JC and Orias E. (1992) Genetic characterization of *Tetrahymena thermophila* mutants unable to secrete capsules. *Dev Genet*, 13:160-166.
- Gutiérrez JC, Martín-González A and Callejas S. (1998) Nuclear changes, macronuclear chromatin reorganization and DNA modifications during ciliate encystment. *Europ J Protistol*, 34:97-103.

- Gutiérrez JC, Callejas S, Borniquel S, Benítez L and Martín-González A. (2001) Ciliate cryptobiosis: a microbial strategy against environmental starvation. *Int Microbiol*, 4:151-157.
- Gutiérrez JC, Martín-González A, Díaz S, Amaro F, Ortega R, Gallego A and De Lucas MP. (2008) Ciliates as cellular tools to study the eukaryotic cell: heavy metal interactions. In *Heavy metal pollution*. S.E. Brown and W.C. Welton (Eds.). Nova Science Publishers Inc., 99. 1-44.
- Gutiérrez JC, Amaro F and Martín-González A. (2009) From heavy metal-binders to biosensors: ciliate metallothioneins discussed. *BioEssays*, 31:805-816.
- Gutiérrez JC, Amaro F, Díaz S, De Francisco P, Cubas LL and Martín-González A. (2011) Ciliate metallothioneins: unique microbial eukaryotic heavy-metal-binder molecules. *J Biol Inorg Chem*, 16:1025-1034.
- Gutiérrez JC, Amaro F and Martín-González A. (2015) Heavy metal whole-cell biosensors using eukaryotic microorganisms: an updated critical review. *Front Microbiol*, 6:48.
- Hanna EG and Tait PW. (2015) Limitations to thermoregulation and acclimatization challenge human adaptation to global warming. *Int J Environ Res Public Health*, 12:8034-8074.
- Haq F, Mahoney M and Koropatnick J. (2003) Signaling events for metallothionein induction. *Mutat Res*, 533:211-226.
- Haugland RP, Gregory J, Spence MTZ and Johnson ID. (2002) *Handbook of fluorescent probes and research products*. Eugene, OR, Molecular Probes.
- Henkel G and Krebs B. (2004) Metallothioneins: zinc, cadmium, mercury and copper thiolates and selenolates mimicking protein active site features-structural aspects and biological implications. *Chem Rev*, 104:801-824.
- Hesketh J. (2004) 3'-Untranslated regions are important in mRNA localization and translation: lessons from selenium and metallothionein. *Biochem Soc Trans*, 32:990-3.
- Heuchel R, Radtke F, Georgiev O, Stark G, Aguet M and Schaffner W. (1994) The transcription factor MTF-1 is essential for basal and heavy metal-induced metallothionein gene expression. *EMBO J*, 12:1355-1362.
- Hirata K, Tsuji N and Miyamoto K. (2005) Biosynthetic regulation of phytochelatin, heavy-metal binding peptides. *J Biosci Bioeng*, 100:593-599.
- Hlihor RM, Diaconu M, Fertu D, Chelaru C, Sandu I, Tavares T and Gavrilescu M. (2013) Bioremediation of Cr(VI) polluted wastewaters by sorption on heat inactivated *Saccharomyces cerevisiae* biomass. *Int J Environ Res*, 7:581-594.
- Höckner M, Dallinger R and Stürzenbaum SR. (2011) Nematode and snail metallothioneins. *J Biol Inorg Chem*, 16:1057-1065.
- Hodson, ME. (2004) Heavy metals - geochemical bogey men? *Environ Pollut*, 129:341-343.
- Huang M, Shaw III F and Petering DH. (2004) Interprotein metal exchange between transcription factor IIIa and apo-metallothionein. *J Inorg Biochem*, 98:639-648.
- Huang Y and Agrawal AF. (2016) Experimental evolution of gene expression and plasticity in alternative selective regimes. *PLoS Genet*, 12:1-23.

Bibliografia

- Hughes S and Sturzenbaum SR. (2007) Single and double metallothionein knockout in the nematode *C. elegans* reveals cadmium dependent and independent toxic effects on life history traits. *Environ Pollut*, 145:395-400
- Hurst HC. (1995) Transcription factors 1: bZIP proteins. *Protein Profile*, 2:101-168.
- Hussain D, Haydon MJ, Wang Y, Wong E, Sherson SM, Young J, Camakaris J, Harper JF and Cobbetta CS. (2004) P-Type ATPase heavy metal transporters with roles in essential zinc homeostasis in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 16:1327-1339.
- Irfan M, Hayat S, Ahmad A and Alyemini MN. (2013) Soil cadmium enrichment: Allocation and plant physiological manifestations. *Saudi J Biol Sci*, 20:1-10.
- Isani G and Carpenè E. (2014) Metallothioneins, unconventional proteins from unconventional animals: a long journey from nematodes to mammals. *Biomolecules*, 4:435-457.
- Iyer A, Mody J and Jha B. (2005) Biosorption of heavy metals by a marine bacterium. *Mar Poll Bull*, 50:340-343.
- Jaishankar M, Tseten T, Anbalagan N, Mathew BB and Beeregowda KN. (2014) Toxicity, mechanism and health effects of some heavy metals. *Interdiscip Toxicol*, 7:60-72.
- Jakoby M, Weisshaar B, Dröge-Laser W, Vicente-Carbajosa J, Tiedemann J, Kroj T and Parcy F. (2002) bZIP transcription factors in *Arabidopsis*. *Trends Plant Sci*, 7:106-111.
- Jansen RP. (2001) mRNA localization: message on the move. *Nature Reviews*, 2:247-256.
- Janssens TK, Mariën J, Cenijn P, Legler J, van Straalen NM and Roelofs D. (2007) Recombinational micro-evolution of functionally different metallothionein promoter alleles from *Orchesella cincta*. *BMC Evol Biol*, 7:88.
- Janssens TK, Lopez R, Mariën J, Timmermans MJ, Montagne-Wajer K, van Straalen NM and Roelofs D. (2008) Comparative population analysis of metallothionein promoter alleles suggests stress-induced microevolution in the fiels. *Environ Sci Technol*, 42:3873-3878.
- Järup L. (2003) Hazards of heavy metal contamination. *Br Med Bull*, 68:167-182.
- Javanbakht V, Alavi SA and Zilouei H. (2014) Mechanisms of heavy metal removal using microorganisms as biosorbent. *Water Sci Technol*, 69:1775-1787.
- Jeffares DC, Penkett CJ and Bahler J. (2008) Rapidly regulated genes are intron poor. *Trends Genet*, 24:375-378.
- Jenny MJ, Warr GW, Ringwood AR, Baltzegar DA and Chapman RW. (2006) Regulation of metallothionein genes in the American oyster (*Crassostrea virginica*): ontogeny and differential expression in response to different stressors. *Gene*, 379:156-165.
- Jones DT. (1999) Protein secondary structure prediction based on position-specific scoring matrices. *J Mol Biol*, 292:195-202.
- Joseph P. (2009) Mechanisms of cadmium carcinogenesis. *Toxicol Appl Pharmacol*, 238:272-279.
- Joutey NT, Sayel H, Bahafid W and El Ghachtouli N. (2015) Mechanisms of hexavalent chromium resistance and removal by microorganisms. *Rev Environ Contam Toxicol*, 233:45-69.

- Kang YJ. (1999) The antioxidant function of metallothionein in the heart. *Proc Soc Exp Biol Med*, 222:263-273.
- Kappelmann M, Bosserhoff A and Kuphal S. (2014) AP-1/c-Jun transcription factors: regulation and function in malignant melanoma. *Eur J Cell Biol*, 93:76-81.
- Kappus H and Sies H. (1981) Toxic drug effects associated with oxygen metabolism: redox cycling and lipid peroxidation. *Experientia*, 37:1233-1241.
- Karigar CS and Rao SS. (2011) Role of microbial enzymes in the bioremediation of pollutants: a review. *Enzyme Res*, 2011:805187.
- Karin M, Liu Z and Zandi E. (1997) AP-1 function and regulation. *Curr Opin Cell Biol*, 9:240-246.
- Karpf AR and Jones DA. (2002) Reactivating the expression of methylation silenced genes in human cancer. *Oncogen*, 21:5496-5503.
- Kawai K, Liu SX, Tyurin VA, Tyurina YY, Borisenko GG, Jiang JF, St. Croix CM, Fabisiak JP, Pitt BR and Kagan VE. (2000) Antioxidant and antiapoptotic function of metallothioneins in HL-60 cells challenged with copper nitrilotriacetate. *Chem Res Toxicol*, 13:1275-1286.
- Kelley LA, Mezulis S, Yates CM, Wass MN and Sternberg MJ. (2015) The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nat Protoc*, 10:845-858.
- Kettlewell HBD. (1955) Selection experiments on industrial melanism in the Lepidoptera. *Heredity*, 9:323-342.
- Khan Z, Hussain SZ, Rehman A, Zulfiqar S and Shakoori AR. (2015) Evaluation of cadmium resistant bacterium, *Klebsiella pneumoniae*, isolated from industrial wastewater for its potential use to bioremediate environmental cadmium. *Pakistan J Zool*, 47:1503-1513.
- Khatchadourian A and Maysinger D. (2009) Lipid droplets: their role in nanoparticle-induced oxidative stress. *Mol Pharm*, 6:1125-1137.
- Kimara T and Kambe T. (2016) The functions of Metallothionein and ZIP and ZnT transporters: An overview and perspective. *Int J Mol Sci*, 17:336-358.
- Klaassen CD and Liu J. (1998) Metallothionein transgenic and knock-out mouse models in the study of cadmium toxicity. *J Toxicol Sci*, 2:97-102.
- Klaassen CD, Liu J and Choudhuri S. (1999) Metallothionein: an intracellular protein to protect against cadmium toxicity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 39:267-294.
- Klaassen CD, Liu J and Diwn BA (2009) Metallothionein protection of cadmium toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol*, 238:215-220.
- Klimek B. (2012) Effect of long-term zinc pollution on soli microbial community. Resistance to repeated contamination. *Bull Environ Contam Toxicol*, 88:617-622.
- Knipp M, Meloni G, Roschitzki B and Vasak M. (2005) Zn7-metallothionein-3 and the synaptic vesicle cycle: interaction of metallothionein-3 with the small GTPase Rab3A. *Biochemistry*, 44:3159-3165.

Bibliografía

- Kondo N, Imai K, Isobe M and Goto T. (1984) Cadystin A and B major unit peptides comprising cadmium binding peptides induced in a fission yeast---separation, revision of structures and synthesis. *Tetrahedron Lett*, 25:3869-3872.
- Koropatnick J. (1988) Amplification of metallothionein-I genes in mouse liver cells in situ: extra copies are transcriptionally active. *Proc Soc Exp Biol Med*, 188:287-300.
- Koropatnick J. Toxic and essential metals in the cellular response to signals, in: RK Zalups, J Koropatnick (Eds.), *Molecular Biology and Toxicology of Metals*. Taylor and Francis, London, 2000. pp.551-556.
- Kouno T and Ezaki B. (2012) Multiple regulation of *Arabidopsis AtGST11* gene expression by four transcription factors under abiotic stresses. *Physiol Plant*, 148:97-104.
- Kovalchuk I, Titov V, Hohn B and Kovalchuk O. (2005) Transcriptome profiling reveals similarities and differences in plant responses to cadmium and lead. *Mutat Res*, 570:149-161.
- Kulshreshtha A, Agrawal R, Barar M and Saxena S. (2014) A Review on bioremediation of heavy metals in contaminated water. *IOSRJESTFT*, 8:44-50
- Kültz D. (2005) Molecular and evolutionary basis of the cellular stress response. *Annu Rev Physiol*, 67:225-257.
- Kumar S, Briguglio JS and Turkewitz AP. (2015) Secretion of polypeptide crystals from *Tetrahymena thermophila* secretory organelles (mucocysts) depends on processing by a cysteine cathepsin, Cth4p. *Eukaryot Cell*, 14:817-833.
- Kuroda K and Ueda M. (2010) Engineering of microorganisms towards recovery of rare metal ions. *Appl Microbiol Biotechnol*, 87:53-60.
- Lachapelle J, Bell G and Colegrave N. (2015) Experimental adaptation to marine conditions by a freshwater alga. *Evolution*, 69:2662-75.
- Laemmli UK. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227:680-685.
- Larionov A, Krause A and Miller W. (2005) A standard curve based method for relative real time PCR data processing. *BMC Bioinform*, 6:62-78.
- Laukens D, Waeytens A, De Bleser P, Cuvelier C and De Vos M. (2009) Human metallothionein expression under normal and pathological conditions: mechanisms of gene regulation based on in silico promoter analysis. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*, 19:301-317.
- Fernández Leborans G, Olalla Herrero Y and Novillo A. (1998) Toxicity and bioaccumulation of lead in marine protozoa communities. *Ecotoxicol Environ Saf*, 39:172-178.
- Leignel V, Hardivillier Y and Laulier M. (2005) Small metallothionein MT-10 genes in coastal and hydrothermal mussels. *Mar Biotechnol*, 7:236-244.
- Leignel V, Marchand J, Moreau B and Chenais B. (2008) Metallothionein genes from hydrothermal crabs (*Bythograeidae, Decapoda*): characterization, sequence analysis, gene expression and comparison with coastal crabs. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, 148:6-13.

- Lemercier G, Espiau B, Ruiz FA, Vieira M, Luo S, Baltz T, Docampo R and Bakalara N. (2004) A pyrophosphatase regulating polyphosphate metabolism in acidocalcisomes is essential for *Trypanosoma brucei* virulence in mice. *J Biol Chem*, 279:3420-3425.
- Li WH, Yang J and Gu X. (2005) Expression divergence between duplicated genes. *Trends Genet*, 21:602-607
- Lindert U, Leuzinger L, Steiner K, Georgiev O and Schaffner W. (2008) Characterization of metal-responsive transcription factor (MTF-1) from the giant rodent capybara reveals features in common with human as well as with small rodents (mouse, rat). Short communication. *Chem Biodivers*, 5:1485-1494.
- Liu G, Yong MYJ, Yurieva M, Srinivasan KG, Liu J, Lim JSY, Poidinger M, Wright GD, Zolezzi F, Choi H, Pavelka N and Rancati G. (2015) Gene essentiality is a quantitative property linked to cellular evolvability. *Cell*, 163:1388-1399.
- Liu J, Liu Y, Hartley D, Klaassen CD, Shehin-Johnson SE, Lucas A and Cohen SD. (1999) Metallothionein-I/II knockout mice are sensitive to acetaminophen-induced hepatotoxicity. *J Pharmacol Exp Ther*, 289:580-586.
- Liu N and Scott JG. (1998) Increased transcription of CYP6D1 causes cytochrome P450-mediated insecticide resistance in house fly. *Insect Biochem Mol Biol*, 28: 531-535.
- Liu X and Thiele DJ. (1996) Oxidative stress induces heat shock factor phosphorylation and HSF-dependent activation of yeast metallothionein gene transcription. *Genes Dev*, 10:592-603.
- Lozupone CA, Knight RD and Landweber LF. (2001) The molecular basis of nuclear genetic code change in ciliates. *Curr Biol*, 11:65-74.
- Lu LL, Tian SK, Yang XE, Wang XC, Brown P, Li TQ and He ZL. (2008) Enhanced root-to-shoot translocation of cadmium in the hyperaccumulating ecotype of *Sedum alfredii*. *J Exp Bot*, 59:3203-3213.
- Lupas A, Van Dyke M and Stock J. (1991) Predicting coiled coils from protein sequences. *Science*, 252:1162-1164.
- Macomber L and Imlay JA. (2009) The iron-sulfur clusters of dehydratases are primary intracellular targets of copper toxicity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 106:8344-8349.
- Madinger CL, Collins K, Fields LG, Taron CH and Benneri JS. (2010) Constitutive secretion in *Tetrahymena thermophila*. *Eukaryot Cell*, 9:674-81.
- Mager WH and Kruijft AJJ. (1995) Stress-induced transcriptional activation. *Microbiol Rev*, 59:506-531.
- Maihle NJ and Satir BH. (1986) Protein secretion in *Tetrahymena thermophila*. Characterization of the major proteinaceous secretory proteins. *J Biol Chem*, 261:7566-7570.
- Malaiyandi LM, Sharthiya H and Dineley KE. (2016) Fluorescence detection of intracellular cadmium with Leadmium Green. *Biomaterials*, 29:625-635.

Bibliografía

- Malik A. (2004) Metal bioremediation through growing cells. *Environ Int*, 30:261-278.
- Manzano JI, García-Hernández R, Castanys S and Gamarro F. (2013) A new ABC half-transporter in *Leishmania major* is involved in resistance to antimony. *Antimicrob Agents Chemother*, 57:3719-3730.
- Manzoni M, Rollini SM and Benedetti A. Copper-enriched biomass, method for the preparation thereof and pro-biotic cosmetic, dietary and nutraceutical products comprising the same. *US Patent PCT/IB2009/053072* 2009.
- Maret W, Jacob C, Vallee BL and Fisher EH. (1999) Inhibitory sites in enzymes: zinc removal and reactivation by thionein. *Proc Natl Acad Sci USA*, 96:1936-1940.
- Margesin R and Schinner F. (2001) Biodegradation and bioremediation of hydrocarbons in extreme environments. *Appl Microbiol Biotechnol*, 56:650-663.
- Margoshes M and Vallee BL. (1957) A cadmium protein from equine kidney cortex. *J Am Chem Soc*, 79:1813-1814.
- Maroni G, Wise J, Young JE and Otto E. (1987) Metallothionein gene duplications and metal tolerance in natural populations of *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 117:739-744.
- Martín-González A, Díaz S, Borniquel S, Gallego A and Gutiérrez JC. (2006). Cytotoxicity and bioaccumulation of heavy metals by ciliated protozoa isolated from urban wastewater treatment plants. *Res Microbiol*, 157:108-118.
- Martín-Platero AM, Valdivia E, Maqueda M and Martínez-Bueno M. (2007) Fast, convenient, and economical method for isolating genomic DNA from lactic acid bacteria using a modification of the protein "salting-out" procedure. *Anal Biochem*, 366:102-104.
- Masters BA, Kelly EJ, Quaife CJ, Brinster RL and Palmiter RD. (1994) Targeted disruption of metallothionein I and II genes increases sensitivity to cadmium. *Proc Natl Acad Sci USA*, 91:548-588
- Matschullat J. (2000) Arsenic in the geosphere - a review. *Sci Total Environ*, 249:297-312.
- Mattie MD, McElwee MK and Freedman JH. (2008) Mechanism of copper-activated transcription: activation of AP-1, and the JNK/SAPK and p38 signal transduction pathways. *J Mol Biol*, 383:1008-1018.
- Mendoza-Cózatl D, Devars S, Loza-Tavera H and Moreno-Sánchez R. (2002) Cadmium accumulation in the chloroplast of *Euglena gracilis*. *Physiol. Plant*, 115:276-283.
- Mendoza-Cózatl DG, Jobe TO, Hauser F and Schroeder JI. (2011) Long-distance transport, vacuolar sequestration, tolerance, and transcriptional responses induced by cadmium and arsenic. *Curr Opin Plant Biol*, 14:554-562.
- Merriam EV and Bruns PJ. (1988) Phenotypic assortment in *Tetrahymena thermophila*: assortment kinetics of antibiotic-resistance markers, tsA, death, and the highly amplified rDNA locus. *Genetics*, 120:389-395.
- Messerle BA, Schäffer A, Vasák M, Kägi JH and Wüthrich K. (1990) Three-dimensional structure of human [113Cd7] metallothionein-2 in solution determined by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J Mol Biol*, 214:765-779.

- Miceli C, La Terza A, Bradshaw RA and Luporini P. (1992) Identification and structural characterization of a cDNA clone encoding a membrane-bound form of the polypeptide pheromone Er-1 in the ciliate protozoan *Euplotes raikovi*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 89:1988-1992.
- Mieczkowski PA, Lemoine FJ and Petes TD. (2006) Recombination between retrotransposons as a source of chromosome rearrangements in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *DNA Repair (Amst)*, 5:1010-1020.
- Miles AT, Hawksworth GM, Beattie JH and Rodilla V. (2000) Induction, regulation, degradation and biological significance of mammalian metallothioneins. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 35:35-70.
- Mishra S and Whetstone JR. (2016) Different facets of copy number changes: permanent, transient and adaptive. *Mol Cell Biol*, 36:1050-1057.
- Misra RR, Hochadel JF, Smith GT, Cook JC, Walkes MP and Wink DA. (1996) Evidence that nitric oxide enhances cadmium toxicity by displacing the metal from metallothionein. *Chem Res Toxicol*, 9:326-332.
- Moilanen LH, Fukushige T and Freedman JH. (1999) Regulation of metallothionein gene transcription. Identification of upstream regulatory elements and transcription factors responsible for cell-specific expression of the metallothionein genes from *Caenorhabditis elegans*. *J Biol Chem*, 274:29655-29665.
- Morigasaki S, Shimada K, Ikner A, Yanagida M and Shiozaki K. (2008) Glycolytic enzyme GAPDH promotes peroxide stress signaling through multistep phosphorelay to a MAPK cascade. *Mol Cell*, 30:108-113.
- Mrvčić J, Butorac A, Solić E, Stanzer D, Bačun-Družina V, Cindrić M and Stehlik-Tomas V. (2013) Characterization of *Lactobacillus brevis* L62 strain, highly tolerant to copper ions. *World J Microbiol Biotechnol*, 29:75-85.
- Muñoz A, Försterling FH, Shaw III CF and Petering DH. (2002) Structure of the (113) Cd(3)beta domains from *Homarus americanus* metallothionein-1: hydrogen bonding and solvent accessibility of sulfur atoms. *J Biol Inorg Chem*, 7:713-724.
- Najeeb U, Ahmad W, Zia MH, Malik Z and Zhou W. (2014) Enhancing the lead phytostabilization in wetland plant *Juncus effusus* L. through somaclonal manipulation and EDTA enrichment. *Arab J Chem* [in press].
- Narula SS, Brouwer M, Hua Y and Armitage IM. (1995) Three-dimensional solution structure of *Callinectes sapidus* metallothionein-1 determined by homonuclear and heteronuclear magnetic resonance spectroscopy. *Biochemistry*, 34:620-31.
- Navarro-Aviñó JP, Aguilar Alonso I and López-Moya JR. (2007) Aspectos bioquímicos y genéticos de la tolerancia y acumulación de metales pesados en plantas. *Ecosistemas*, 16:10-25.
- Nedelkoska TV and Doran PM. (2000) Hyperaccumulation of cadmium by hairy roots of *Thlaspi caerulescens*. *Biotechnol Bioeng*, 67:607-615.
- Nguyen DK and Disteché CM. (2006) Dosage compensation of the active X chromosome in mammals. *Nat Genet*, 38:47-53.

Bibliografía

- Nguyen T, Sherratt PJ and Pickett CB. (2003) Regulatory mechanisms controlling gene expression mediated by the antioxidant response element. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 43:233-260.
- Nickens KP, Patierno SR and Ceryak S. (2010) Chromium genotoxicity: a double-edged sword. *Chem Biol Interact*, 188:276-288.
- Nies DH. (1999) Microbial heavy-metal resistance. *Appl Microbiol Biotechnol*, 51:730-750.
- Nilsson JR. (1989) *Tetrahymena* in cytotoxicology: with special reference to effects of heavy metals and selected drugs. *Europ J Protistol*, 25:2-25.
- Notredame C, Higgins DG and Heringa J. (2000) T-Coffee: a novel method for fast and accurate multiple sequence alignment. *J Mol Biol*, 302:205-217.
- Nury D, Chabanon H, Levadoux-Martin M and Hesketh J. (2005) An eleven nucleotide section of the 3'-untranslated region is required for perinuclear localization of rat metallothionein-1 mRNA. *Biochem J*, 387:419-428.
- O'Keefe DO. (1994) Quantitative electrophoretic analysis of proteins labeled with monobromobimane. *Anal Biochem*, 222:86-94.
- Orihuela R, Fernández B, Palacios O, Valero E, Atrian S, Watt RK, Domínguez-Vera JM and Capdevila M. (2011) Ferritin and metallothionein: dangerous liaisons. *Chem Commun*, 47:12155-12157.
- Ostrakhovitch EA, Olsson P-E, Jiang S and Cherian MG. (2006) Interaction of metallothionein with tumor suppressor p53 protein. *FEBS Lett*, 580:1235-1238.
- Palmiter RD. (1998) The elusive function of metallothioneins. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95:8428-8430.
- Panwichian S, Kantachote D, Wittayaweerasa B and Mallavarapu M. (2011) Removal of heavy metals by exopolymeric substances produced by resistant purple non sulphur bacteria isolated from contaminated shrimp ponds. *Electron J Biotechnol*, 14:1-10.
- Parente A, Merrifield B, Geraci G and D'Alessio G. (1985) Molecular basis of superreactivity of cysteine residues 31 and 32 of seminal ribonuclease. *Biochemistry*, 24:1098-1104.
- Peng H, Chen W, Cheng Y, Hakuna L, Strongin R and Wang B. (2012) Thiol reactive probes and chemosensors. *Sensors (Basel)*, 12:15907-15946.
- Penkowa M, Carrasco J, Giralt M, Molinero A, Hernandez J, Campbell IL and Hidalgo J. (2000) Altered central nervous system cytokine-growth factor expression profiles and angiogenesis in metallothionein-I+II deficient mice. *J Cereb Blood Flow Metab*, 20:1174-1189.
- Pérez-Rafael S, Monteiro F, Dallinger R, Atrian S, Palacios O and Capdevila M. (2014) *Cantareus aspersus* metallothionein metal binding abilities: the unspecific CaCd/CuMT isoform provides hints about the metal preference determinants in metallothioneins. *Biochim Biophys Acta*, 1844:1694-1707.
- Peroza EA, Schmucki R, Güntert P, Preisinger E and Zerbe O. (2009) The β E-domain of wheat Ec-1 metallothionein: a metal-binding domain with a distinctive structure. *J Mol Biol*, 387:207-218.

- Perrone GG, Tan SX and Dawes IW. (2008) Reactive oxygen species and yeast apoptosis. *Biochim Biophys Acta*, 1783:1354-1368.
- Perry GH, Dominy NJ, Claw KG, Lee AS, Fiegler H, Redon R, Werner J, Villanea FA, Mountain JL, Misra R, Carter NP, Lee C and Stone AC. (2007) Diet and the evolution of human amylase gene copy number variation. *Nat Genet*, 39:1256-1260.
- Peterson CW, Narula SS and Armitage IM. (1996) 3D solution structure of copper and silver-substituted yeast metallothioneins. *FEBS Lett*, 379:85-93.
- Piccinni E, Bertagia D, Santovito G, Miceli C and Kraen A. (1999) Cadmium metallothionein gene of *Tetrahymena pyriformis*. *Gene*, 234:51-59.
- Piccinni E, Staudenmann W, Albergoni V, De Gabrieli R and James P. (1994) Purification and primary structure of metallothioneins induced by cadmium in the protists *Tetrahymena pigmentosa* and *Tetrahymena pyriformis*. *Eur J Biochem*, 226:853-859.
- Prescott DM. (1994) The DNA of ciliated protozoa. *Microbiol Rev*, 58:233-267.
- Qu W and Waalkes MP. (2015) Metallothionein blocks oxidative DNA damage induced by acute inorganic arsenic exposure. *Toxicol Appl Pharmacol*, 282:267-274.
- Quesada AR, Byrnes RW, Krezoski SO and Petering DH. (1996) Direct reaction of H₂O₂ with sulfhydryl groups in HL-60 cells: Zn-metallothionein and other sites. *Arch Biochem Biophys*, 334:241-250.
- Quiming NS, Vergel RB, Nicolas MG and Villanueva JA. (2005) Interaction of bovine serum albumin and metallothionein. *J Health Sci*, 51:8-15.
- Radtke F, Heuchel R, Georgiev O, Hergersberg M, Gariglio M, Dembic Z and Schaffner W. (1993) Cloned transcription factor MTF-1 activates the mouse metallothionein I promoter. *EMBO J*, 12:1355-1362.
- Rajakumar S and Nachiappan V. (2017) Lipid droplets alleviate cadmium induced cytotoxicity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Toxicol Res*, 6:30-41.
- Raikov IB. (1982) The protozoan nucleus, morphology and evolution. Springer-Verlag, New York.
- Raikov IB. (1995) Structure and genetic organization of the polyploid macronucleus of ciliates: a comparative review. *Acta Protozool*, 34: 151-171.
- Rana SV. (2008) Metals and apoptosis: recent developments. *J Trace Elem Med Biol*, 22:262-284.
- Rehman A, Sohail Anjum M and Hasnain S. (2010) Cadmium biosorption by yeast, *Candida tropicalis* CBL-1, isolated from industrial wastewater. *J Gen Appl Microbiol*, 56:359-368.
- Rico D, Martín-González A, Díaz S, De Lucas P and Gutiérrez JC. (2009) Heavy metals generate reactive oxygen species in terrestrial and aquatic ciliated protozoa. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, 140:90-96.
- Riek R, Prêcheur B, Wang Y, Mackay EA, Wilder G, Güntert P, Liu A, Kägi JH and Wüthrich K. (1999) NMR structure of the sea urchin (*Strongylocentrotus purpuratus*) metallothionein MTA. *J Mol Biol*, 291:417-428.

Bibliografía

- Rigouin C, Nylín E, Cogswell AA, Schaumlöffel D, Dobritzsch D and Williams DL. (2013) Towards an understanding of the function of the phytochelatin synthase of *Schistosoma mansoni*. *PLoS Negl Trop Dis*, 7:e2037.
- Ritter A, Ubertini M, Romac S, Gaillard F, Delage L, Mann A, Cock JM, Tonon T, Correa JA and Potin P. (2010) Copper stress proteomics highlights local adaptation of two strains of the model brown alga *Ectocarpus siliculosus*. *Proteomics*, 10:2074-88.
- Robenek H, Hofnagel O, Buers I, Robenek MJ, Troyer D and Severs NJ. (2006) Adipophilin-enriched domains in the ER membrane are sites of lipid droplet biogenesis. *J Cell Sci*, 119:4215-4224.
- Rodríguez-Zavala JS, García-García JD, Ortiz-Cruz MA and Moreno-Sánchez R. (2007) Molecular mechanisms of resistance to heavy metals in the protist *Euglena gracilis*. *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng*, 42:1365-1378.
- Roy M, Reddy PH, Iijima M and Sesaki H. (2015) Mitochondrial division and fusion in metabolism. *Curr Opin Cell Biol*, 33:111-118.
- Rudyk O and Eaton P. (2014) Biochemical methods for monitoring protein thiol redox states in biological systems. *Redox Biol*, 2:803-813.
- Ruiz FA, Marchesini N, Seufferheld M, Govindjee and Docampo R. (2001) The polyphosphate bodies of *Chlamydomonas reinhardtii* possess a proton-pumping pyrophosphatase and are similar to acidocalcisomes. *J Biol Chem*, 276:46196-46203.
- Russo R, Bonaventura R and Matranga V. (2014) Time- and dose-dependent gene expression in sea urchin embryos exposed to UVB. *Marine Environ Res*, 93:85-92.
- Sakulsak N. (2012) Metallothionein: An overview on its metal homeostatic regulation in mammals. *Int J Morphol*, 30:1007-1012.
- Sambrook J and Russell DW. (2001) *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor [New York], Laboratory Press.
- Samson SL and Gedamu L. (1998) Molecular analyses of metallothionein gene regulation. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, 59:257-288.
- Sánchez-Pérez G, Mira A, Nyirö G, Pasic L and Rodríguez-Valera F. (2008) Adapting to environmental changes using specialized paralogs. *Trends Genet*, 24:154-158.
- Santhiya D and Ting YP. (2006) Use of adapted *Aspergillus niger* in the bioleaching of spent refinery processing catalyst. *J Biotechnol*, 121:62-74.
- Sauer U. (2001) Evolutionary engineering of industrially important microbial phenotypes. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 73:129-169.
- Saydam N, Adams TK, Steiner F, Schaffner W and Freedman JH. (2002) Regulation of metallothionein transcription by the metal-responsive transcription factor MTF-1: identification of signal transduction cascades that control metal-inducible transcription. *J Biol Chem*, 277:20438-20445.
- Schnockel, H. (2008) Formation, structure and bonding of metalloid Al and Ga clusters. A challenge for chemical efforts in nanosciences. *Dalton Trans*, 4344-4362.

- Schütze K, Harter K and Chaban C. (2008) Post-translational regulation of plant bZIP factors. *Trends Plant Sci*, 13: 247-255.
- Schultze P, Wörgötter E, Braun W, Wagner G, Vasák M, Kägi JH and Wüthrich K. (1988) Conformation of [Cd7]-metallothionein-2 from rat liver in aqueous solution determined by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J Mol Biol*, 203:251-268.
- Selmecki A, Gerami-Nejad M, Paulson C, Forche A and Berman J. (2008) An isochromosome confers drug resistance in vivo by amplification of two genes, ERG11 and TAC1. *Mol Microbiol*, 68:624-641
- Semple KT, Doick KJ, Jones KC, Burauel P, Craven A and Harms H. (2004) Defining bioavailability and bioaccessibility of contaminated soil and sediment is complicated. *Environ Sci Technol*, 38:228-231.
- Sharma P and Dubey RS. (2005). Lead toxicity in plants. *Braz J Plant Physiol*, 17:35-52.
- Shaulian E and Karin M. (2002) AP-1 as a regulator of cell life and death. *Nat Cell Biol*, 4E:131–136
- Shi H, Shi X and Liu KJ. (2004) Oxidative mechanism of arsenic toxicity and carcinogenesis. *Mol Cell Biochem*, 255:67-78.
- Shuja RN and Shakoori AR. (2009) Identification and cloning of the first cadmium metallothionein like gene from locally isolated ciliate, *Paramecium sp.* *Mol Biol Rep*, 36:549-560.
- Silver S and Phung le T. (2005) A bacterial view of the periodic table: genes and proteins for toxic inorganic ions. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 32:587-605.
- Sing N, Kumar D and Sahu A. (2007) Arsenic in the environment: effects on human health and possible prevention. *J Environ Biol*, 28:359-365.
- Singh JS, Abhilash PC, Singh HB, Singh RP and Singh DP. (2011) Genetically engineered bacteria: an emerging tool for environmental remediation and future research perspectives. *Gene*, 480:1-9.
- Sitsel O, Grønberg C, Autzen HE, Wang K, Meloni G, Nissen P and Gourdon P. (2015) Structure and function of Cu(I)- and Zn(II)-ATPases. *Biochemistry*, 54:5673-5383.
- Smith AH, Lingas EO and Rahman M. (2000) Contamination of drinking-water by arsenic in Bangladesh: a public health emergency. *Bull World Health Organ*, 78:1093-1103.
- Sokalingam S, Raghunathan G, Soundrarajan N and Lee SG. (2012) A study on the effect of surface lysine to arginine mutagenesis on protein stability and structure using green fluorescent protein. *PLoS One*, 7:e40410.
- Solomon EI, Heppner DE, Johnston EM, Ginsbach JW, Cirera J, Qayyum M, Kieber-Emmons MT, Kjaergaard CH, Hadt RG and Tian L. (2014) Copper active sites in biology. *Chem Rev*, 114:3659-3853.

Bibliografia

- Sornaraj P, Luang S, Lopato S and Hrmova M. (2016) Basic leucine zipper (bZIP) transcription factors involved in abiotic stresses: A molecular model of a wheat bZIP factor and implications of its structure in function. *Biochim Biophys Acta*, 1860:46-56.
- Stenberg P and Larsson J. (2011) Buffering and the evolution of chromosome-wide gene regulation. *Chromosoma*, 120:213-225.
- Stuart GW, Searle PF and Palmiter RD. (1985) Identification of multiple metal regulatory elements in mouse metallothionein-I promoter by assaying synthetic sequences. *Nature*, 317:828–831.
- Stürzenbaum SR. (2009). Chapter 7: Earthworm and nematode metallothioneins, in *Metal Ions in Life Sciences, Volume 5: Metallothioneins and Related Chelators* (Eds. A. Sigel, H. Sigel and R.K.O. Sigel). Royal Society of Chemistry Publishing, Cambridge, UK. *Met. Ions Life Sci.* 5, 183–197.
- Strüder-Kypke MC, Wright ADG, Jerome CA and Lynn DH. (2001) Parallel evolution of histophagy in ciliates of the genus *Tetrahymena*. *BMC Evol Biol*, 1:5-14.
- Sun S, Berg OG, Roth JR and Andersson DI. (2009) Contribution of gene amplification to evolution of increased antibiotic resistance in *Salmonella typhimurium*. *Genetics*, 182:1183-1195.
- Sundar K, Mukherjee A, Sadiq M and Chandrasekaran N. (2011) Cr(III) bioremoval capacities of indigenous and adapted bacterial strains from Palar river basin. *J Hazard Mater*, 187:553-61.
- Takahashi, S. (2015) Positive and negative regulators of the metallothionein gene (Review). *Mol Med Rep*, 12:795-799.
- Tang YC and Amon A. (2013) Gene copy-number alterations: A cost-benefit analysis. *Cell*, 152:394-405.
- Tang CM, Westling J and Seto E. (1999) Trans repression of the human metallothionein IIA gene promoter by PZ120, a novel 120-kDa zinc finger protein. *Mol Cell Biol*, 19:680-689.
- Tanguy A and Moraga D. (2001) Cloning and characterization of a gene coding for a novel metallothionein in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (CgMT2): a case of adaptive response to metal-induced stress? *Gene*, 273:123-130.
- Teigen LE, Orczewska JI, McLaughlin J and O'Brien KM. (2015) Cold acclimation increases levels of some heat shock protein and sirtuin isoforms in threespine stickleback. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*, 188:139-47.
- Teng X, Dayhoff-Brannigan M, Cheng WC, Gilbert CE, Sing CN, Diny NL, Wheelan SJ, Dunham MJ, Boeke JD, Pineda FJ and Hardwick JM. (2013) Genome-wide consequences of deleting any single gene. *Mol Cell*, 52:485-494.
- Thirumoorthy N, Shyam Sunder A, Manisenthil Kumar KT, Senthil Kumar M, Ganesh GNK and Chatterjee M. (2011) A review of metallothionein isoforms and their role in pathophysiology. *World J Surg Oncol*, 9:54-61.

- Thor H, Smith MT, Hartzell P, Bellomo G, Jewell SA and Orrenius S. (1982) The metabolism of menadione (2-methyl-1,4-naphthoquinone) by isolated hepatocytes. *J Biol Chem*, 257:12419-12425.
- Timmermans MJ, Ellers J, Roelofs D and van Straalen NM. (2005) Metallothionein mRNA expression and cadmium tolerance in metal-stressed and reference populations of the springtail *Orchesella cincta*. *Ecotoxicology*, 14:727-739.
- Tokuyasu K and Scherbaum OH. (1965) Ultrastructure of mucocysts and pellicle of *Tetrahymena pyriformis*. *J Cell Biol*, 27:67-81.
- Tourancheau AB, Tsao N, Klobutcher LA, Pearlman RE and Adoutte A. (1995) Genetic code deviations in the ciliates: Evidence for multiple and independent events. *EMBO J.*, 14:3262-3267.
- Tucker SL, Thornton CR, Tasker K, Jacob C, Giles G, Edgan M and Talbot NJ. (2004) A fungal metallothionein is required for pathogenicity of *Magnaporthe grisea*. *Plant Cell*, 16:1575-1588.
- Valko M, Morris H and Cronin MT. (2005). Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr Med Chem*, 12:1161-1208.
- Valls M, Bofill R, González-Duarte R, González-Duarte P, Capdevila M and Atrian S. (2001) A new insight into metallothionein (MT) classification and evolution: the in vivo and in vitro metal binding features of *Homarus americanus* recombinant MT. *J Biol Chem*, 276:32835-32843.
- van Straalen NM, Janssens TKS and Roelofs D. (2011) Micro-evolution of toxicant tolerance: from single genes to the genome's tangled bank. *Ecotoxicology*, 20:574-579.
- Vasák M. (2005) Advances in metallothionein structure and functions. *J Trace Elem Med Biol*, 19:13-17.
- Vasák M and Hasler DW. (2000) Metallothioneins: new functional and structural insights. *Curr Opin Chem Biol*, 4:177-183.
- Vasák M and Meloni G. (2011) Chemistry and biology of mammalian metallothioneins. *J Biol Inor Chem*, 16:1067-1078.
- Vatamaniuk OK, Mari S, Lu YP and Rea PA. (2000) Mechanism of heavy metal ion activation of phytochelatin (PC) synthase: blocked thiols are sufficient for PC synthase-catalyzed transpeptidation of glutathione and related thiol peptides. *J Biol Chem*, 275:31451-31459.
- Vesely PW, Staber PB, Hoefler G and Kenner L. (2009) Translational regulation mechanisms of AP-1 proteins. *Mutat Res*, 682:7-12.
- Waalkes MP, Harvey MJ and Klaassen CD. (1984) Relative in vitro affinity of hepatic metallothionein for metals. *Toxicol Lett*, 20:33-39.
- Waalkes MP, Liu J, Goyer RA and Diwan BA. (2004) Metallothionein-I/II double knockout mice are hypersensitive to lead-induced kidney carcinogenesis: role of inclusion body formation. *Cancer Res*, 64:7766-7772.
- Wadhwa N, Mathew BB, Jatawa S and Tiwari A. (2012) Lipid peroxidation: mechanism, models and significance. *Int J Curr Sci*, 3:29-38.

Bibliografia

- Wang B, Li Y, Shao C, Tan Y and Cai L. (2012) Cadmium and its epigenetic effects. *Curr Med Chem*, 19:2611-2620.
- Wang J and Chen C. (2006) Biosorption of heavy metals by *Saccharomyces cerevisiae*: a review. *Biotechnol Adv*, 24:427-451
- Wang H, Zhang Q, Cai B, Li H, Sze KH, Huang ZX, Wu HM and Sun H. (2006) Solution structure and dynamics of human metallothionein-3 (MT-3). *FEBS Lett*, 580:795-800.
- Wang Q, Xu J, Chai B, Liang A and Wang W. (2011) Functional comparison of metallothioneins MTT1 and MTT2 from *Tetrahymena thermophila*. *Arch Biochem Biophys*, 509:107-176.
- Wang Y, Wimmer U, Lichtlen P, Inderbitzin D, Stieger B, Meier PJ, Hunziker L, Stallmach T, Forrer R, Rüllicke T, Georgiev O and Schaffner W. (2004) Metal-responsive transcription factor-1 (MTF-1) is essential for embryonic liver development and heavy metal detoxification in the adult liver. *FASEB J*, 18:1071-1079.
- Warwicker J, Charonis S and Curtis RA. (2014) Lysine and arginine content of proteins: computational analysis suggests a new tool for solubility design. *Mol Pharmaceutics*, 11:294-303.
- Weissman Z, Berdicevsky I, Cavari BZ and Kornitzer D. (2000) The high copper tolerance of *Candida albicans* is mediated by a P-type ATPase. *Proc Natl Acad Sci*, 97:3520-3525.
- Wemmie JA, Wu AL, Harshmann KD, Parker CS and Moye-Rowley WS. (1994) Transcriptional activation mediated by the yeast AP-1 protein is required for normal cadmium tolerance. *J Biol Chem*, 269:14690-14697.
- West AK, Hidalgo J, Eddins D, Levin ED and Aschner M. (2008) Metallothionein in the central nervous system: Roles in protection, regeneration and cognition. *Neurotoxicology*, 29:489-503.
- Westin G and Schaffner W. (1988) A zinc-responsive factor interacts with a metal-regulated enhancer element (MRE) of the mouse metallothionein-I gene. *EMBO J*, 7:3763-3770.
- White C and Gadd GM. (1989) Uptake and cellular distribution of copper, cobalt and cadmium in strains of *Saccharomyces cerevisiae* cultured on elevated concentrations of these metals. *FEMS Microbiol Ecol*, 38:277-283.
- Wilson MJ, Coyne C and Glen DM. (1998) Low temperatures suppress growth of the ciliate parasite, *Tetrahymena rostrata*, and pathogenicity to field slugs, *Deroceras reticulatum*. *Biocontrol Sci Technol*, 8:181-184.
- Wisdom R. (1999) AP-1: one switch for many signals. *Exp Cell Res*, 253:180-185.
- Wu A, Wemmie JA, Edgington NP, Goebel M, Guevara JL and Moye-Rowley WS. (1993) Yeast bZIP proteins mediate pleiotropic drug and metal resistance. *J Biol Chem*, 268:18850-18858.
- Wu CH, Yeh LSL, Huang H, Arminski L, Castro-Alvear J, Chen Y, Hu Z, Kourtesis P, Ledley RS, Suzek BE, Vinayaka CR, Zhang J and Barker WC. (2003) The Protein Information Resource. *Nucleic Acids Res*, 31:345-347.

- Wu W, Huang H, Ling Z, Yu Z, Jiang Y, Liu P and Li X. (2016) Genome sequencing reveals mechanisms for heavy metal resistance and polycyclic aromatic hydrocarbon degradation in *Delftia lacustris* strain LZ-C. *Ecotoxicology*, 25:234-47.
- Yamamoto K and Kawanishi S. (1991) Site-specific DNA damage induced by hydrazine in the presence of manganese and copper ions. The role of hydroxyl radical and hydrogen atom. *J Biol Chem*, 266:1509-1515.
- Yang J, Wang Q, Wang Q and Wu T. (2009) Heavy metals extraction from municipal solid waste incineration fly ash using adapted metal tolerant *Aspergillus niger*. *Bioresour Technol*, 100:254-60.
- Yang M, Zhang F, Wang F, Dong Z, Cao Q and Chen M. (2015a) Characterization of a type 1 metallothionein gene from the stresses-tolerant plant *Ziziphus jujuba*. *Int J Mol Sci*, 16:16750-16762.
- Yang Y, Cao ZD and Fu SJ. (2015b) Variations in temperature acclimation effects on glycogen storage, hypoxia tolerance and swimming performance with seasonal acclimatization in juvenile Chinese crucian carp. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*, 185:16-23.
- Ye J, Chang Y, Yan Y, Xiong J, Xue XM, Yuan D, Sun GX, Zhu YG and Miao W. (2014) Identification and characterization of the arsenite methyltransferase from a protozoan, *Tetrahymena pyriformis*. *Aquat Toxicol*, 149:50-57.
- Zahid MT, Shakoori FR, Zulifqar S, Jahan N and Shakoori AR. (2014) A new ciliate species, *Tetrahymena farahensis*, isolated from the industrial wastewater and its phylogenetic relationship with other members of the genus *Tetrahymena*. *Pakistan J Zool*, 46:1433-1445.
- Zahid MT, Shakoori FR, Zulifqar S, Ahmed I, Al-Ghanim K, Mehboob S and Shakoori AR. (2016) Molecular characterization of a copper metallothionein gene from a ciliate *Tetrahymena farahensis*. *J Cell Biochem*, 9999:1-12.
- Zangger H, Oz G, Otvos JD and Armitage IM. (1999) Three-dimensional solution structure of mouse [Cd7]-metallothionein-1 by homonuclear and heteronuclear NMR spectroscopy. *Protein Sci*, 8:2630-2638.
- Zhang B, Egli D, Georgiev O and Schaffner W. (2001) The *Drosophila* homolog of mammalian zinc finger factor MTF-1 activates transcription in response to heavy metals. *Mol Cell Biol*, 21:4505-4514.
- Zhang B, Georgiev O, Hagmann M, Günes C, Cramer M, Faller P, Vasak M and Schaffner W. (2003) Activity of metal-responsive transcription factor 1 by toxic heavy metals and H₂O₂ in vitro is modulated by metallothionein. *Mol Cell Biol*, 23:8471-8485.
- Zhang J. (2003) Evolution by gene duplication: an update. *Trends Ecol Evol*, 18:292-298.
- Zhao X, Tang X, Zhang H, Qu T and Wang Y. (2016) Photosynthetic adaptation strategy of *Ulva prolifera* floating on the sea surface to environmental changes. *Plant Physiol Biochem*, 107:116-125.
- Zolotov PA, Tutelyan VA and Knyazhev VA. A method of baker's yeast production. *Russian Federation Patent 2103352* 1998.

Bibliografia

Zufall RA and Rausher MD. (2004) Genetic changes associated with floral adaptation restrict future evolutionary potential. *Nature*, 428:847-850.

Introducción

Objetivos

Material y Métodos

Resultados

Discusión

Conclusiones

Cuestiones por resolver en el futuro

Bibliografía

Anexos

ANEXO I. Tablas complementarias

Tabla A1. Parámetros de las curvas estándar obtenidos en los análisis por RT-PCR y PCR cuantitativas

Especie/Cepa	Gen	Pendiente	Eficacia (%)	Y-intercept	R ² (*)
<i>T. borealis</i>	α -tubulina	-3,644	88,10	14,044	0,997
	β -actina	-3,180	106,30	22,256	0,999
	TborMTT1	-3,462	94,47	17,989	0,996
	TborMTT2	-3,375	97,83	17,738	0,990
	TborMTT7	-3,271	102,20	16,265	0,991
<i>T. ellioti</i>	α -tubulina	-3,494	93,90	11,692	0,975
	β -actina	-3,668	87,40	10,024	0,989
	TelliMTT6	-3,271	102,20	15,800	0,994
<i>T. americanis</i>	α -tubulina	-3,212	104,80	10,713	0,993
	β -actina	-3,474	94,00	15,072	0,997
	TamerMTT3	-3,436	95,40	17,184	0,994
<i>T. malaccensis</i>	α -tubulina	-3,459	94,60	12,450	0,962
	β -actina	-3,565	90,80	18,589	0,986
	TmalaMTT5	-3,577	90,40	18,876	0,982
<i>T. thermophila</i> SB1969	β -actina	-3,154	107,5	11,292	0,983
	MTT1	-3,160	107,2	6,351	0,994
	MTT2/4	-3,476	94,00	10,449	0,997
	MTT3	-3,506	92,90	10,022	0,992
	MTT5	-3,602	89,50	7,897	0,955
	CYCLIC	-3,323	100	14,404	0,978
	TthebZIP1	-3,666	87,40	22,405	0,999
	TthebZIP2	-3,287	101,50	23,588	0,999
	TthebZIP3	-3,652	87,80	24,427	0,999
TthebZIP4	-3,271	102,20	17,751	0,999	
<i>T. thermophila</i> CU428	β -actina	-3,558	91,00	12,449	0,986
	MTT1	-3,542	91,60	11,207	0,982
	MTT2/4	-3,562	90,90	10,998	0,979
	MTT3	-3,518	92,40	12,175	0,998
	MTT5	-3,594	89,80	12,898	0,995
	CYCLIC	-3,739	85,10	11,190	0,996
<i>T. thermophila</i> SB210	β -actina	-3,188	105,9	13,149	0,982
	MTT1	-3,491	93,40	11,071	0,984
	MTT2/4	-3,422	96,00	11,202	0,962
	MTT3	-3,441	95,30	11,804	0,999
	MTT5	-3,536	91,80	12,856	0,979
	CYCLIC	-3,637	88,40	11,264	0,995
<i>T. thermophila</i> GFPMTT5	β -actina	-3,541	91,60	10,006	0,987
	MTT1	-3,428	95,80	6,218	0,992
	MTT2/4	-3,539	91,70	10,513	0,991
	MTT3	-3,510	92,70	8,198	0,997
	MTT5	-3,479	93,80	5,507	0,985
	TthebZIP1	-3,952	79,10	16,555	0,995
	TthebZIP2	-3,661	87,60	17,545	0,988
	TthebZIP3	-3,850	81,90	18,400	0,965
TthebZIP4	-3,340	99,20	15,687	0,979	

Especie/Cepa	Gen	Pendiente	Eficacia (%)	Y-intercept	R ² (*)
<i>T. thermophila</i> GFPMTT1	<i>β-actina</i>	-3,436	95,40	11,311	0,998
	<i>MTT1</i>	-3,495	93,30	6,742	0,992
	<i>MTT2/4</i>	-3,451	94,90	10,460	0,997
	<i>MTT3</i>	-3,357	98,60	9,678	0,994
	<i>MTT5</i>	-3,546	91,40	9,098	0,997
	<i>CYCLIC</i>	-3,693	86,60	11,430	0,978
	<i>TthebZIP1</i>	-3,786	83,70	21,013	0,999
	<i>TthebZIP2</i>	-3,593	89,80	18,632	0,994
	<i>TthebZIP3</i>	-3,522	92,30	21,404	0,967
<i>TthebZIP4</i>	-3,462	94,50	15,695	0,970	
<i>T. thermophila</i> Cd-ADAP	<i>β-actina</i>	-3,393	97,10	15,985	0,999
	<i>MTT1</i>	-3,515	92,50	12,751	0,996
	<i>MTT2/4</i>	-3,560	91,00	18,425	0,997
	<i>MTT3</i>	-3,317	100,2	7,255	0,993
	<i>MTT5</i>	-3,678	87,00	19,316	0,997
	<i>CYCLIC</i>	-3,729	85,40	8,944	0,996
	<i>TthebZIP1</i>	-3,543	91,50	19,192	0,997
	<i>TthebZIP2</i>	-3,535	91,80	23,039	0,996
	<i>TthebZIP3</i>	-3,607	89,00	26,952	0,988
<i>TthebZIP4</i>	-3,499	93,10	15,266	0,979	
<i>T. thermophila</i> Cu-ADAP	<i>β-actina</i>	-3,462	94,50	15,267	0,998
	<i>MTT1</i>	-3,451	94,90	12,845	0,999
	<i>MTT2/4</i>	-3,371	98,00	7,951	0,998
	<i>MTT3</i>	-3,404	96,70	10,446	0,991
	<i>MTT5</i>	-3,415	96,20	13,371	0,995
	<i>CYCLIC</i>	-3,563	90,80	11,366	0,991
	<i>TthebZIP1</i>	-3,781	83,90	19,432	0,998
	<i>TthebZIP2</i>	-3,608	89,30	20,287	0,998
	<i>TthebZIP3</i>	-3,649	88,00	21,739	0,999
<i>TthebZIP4</i>	-3,131	108,7	18,327	0,998	
<i>T. thermophila</i> Pb-ADAP	<i>β-actina</i>	-3,401	96,80	13,248	0,999
	<i>MTT1</i>	-3,539	91,70	12,760	0,999
	<i>MTT2/4</i>	-3,586	90,00	15,841	0,994
	<i>MTT3</i>	-3,596	89,70	16,711	0,996
	<i>MTT5</i>	-3,480	93,80	9,242	0,979
	<i>CYCLIC</i>	-3,496	93,20	12,135	0,993
	<i>TthebZIP1</i>	-3,514	92,60	24,737	0,999
	<i>TthebZIP2</i>	-3,260	102,6	22,087	0,991
	<i>TthebZIP3</i>	-3,015	115	26,134	0,958
<i>TthebZIP4</i>	-3,131	108,7	18,327	0,998	
<i>T. thermophila</i> Cd-ADAP (-1M)	<i>β-actina</i>	-3,520	98,80	11,142	0,966
	<i>MTT1</i>	-3,380	97,60	14,125	0,986
	<i>MTT2/4</i>	-3,467	94,30	14,561	0,976
	<i>MTT3</i>	-3,531	92,00	8,210	0,991
	<i>MTT5</i>	-3,436	95,50	7,359	0,986
	<i>CYCLIC</i>	-3,777	84,00	9,485	0,996

Espece/Cepa	Gen	Pendiente	Eficacia (%)	Y-intercept	R ² (*)
<i>T. thermophila</i> Cu-ADAP (-1M)	<i>β-actina</i>	-3,521	92,30	14,140	0,984
	<i>MTT1</i>	-3,789	93,60	10,689	0,988
	<i>MTT2/4</i>	-3,965	79,00	8,424	0,998
	<i>MTT3</i>	-3,418	96,10	15,170	0,964
	<i>MTT5</i>	-3,341	99,20	16,793	0,945
<i>T. thermophila</i> Pb-ADAP (-1M)	<i>β-actina</i>	-3,152	107,6	13,665	0,999
	<i>MTT1</i>	-3,310	100,5	9,956	0,998
	<i>MTT2/4</i>	-3,659	88,00	15,836	0,999
	<i>MTT3</i>	-3,895	80,60	12,576	0,987
	<i>MTT5</i>	-3,384	97,50	7,592	0,982
<i>T. thermophila</i> Cd-ADAP (-6M)	<i>β-actina</i>	-3,661	87,60	11,194	0,975
	<i>MTT1</i>	-3,628	88,60	13,328	0,946
	<i>MTT2/4</i>	-3,777	84,00	16,227	0,985
	<i>MTT3</i>	-3,860	82,00	16,308	0,991
	<i>MTT5</i>	-3,988	78,10	14,955	0,956
<i>T. thermophila</i> Cu-ADAP (-6M)	<i>β-actina</i>	-3,497	93,20	14,077	0,993
	<i>MTT1</i>	-3,610	89,20	12,082	0,986
	<i>MTT2/4</i>	-3,596	90,00	12,049	0,988
	<i>MTT3</i>	-3,399	97,00	9,519	0,997
	<i>MTT5</i>	-3,433	95,50	10,200	0,994
<i>T. thermophila</i> Pb-ADAP (-6M)	<i>β-actina</i>	-3,350	98,80	15,775	0,948
	<i>MTT1</i>	-3,187	105,9	19,879	0,997
	<i>MTT2/4</i>	-3,675	87,00	18,302	0,975
	<i>MTT3</i>	-3,055	113,0	24,119	0,999
	<i>MTT5</i>	-3,367	98,10	18,158	0,98
<i>T. thermophila</i> Cd-ADAP (-7M)	<i>β-actina</i>	-3,353	98,70	12,975	0,995
	<i>MTT1</i>	-3,585	90,10	11,776	0,987
	<i>MTT2/4</i>	-3,412	96,40	11,817	0,982
	<i>MTT3</i>	-3,765	84,30	12,228	0,988
	<i>MTT5</i>	-3,608	89,30	13,196	0,986
	<i>CYCLIC</i>	-3,252	103,0	11,535	0,996
<i>T. thermophila</i> Cd-ADAP (-10M)	<i>β-actina</i>	-3,648	88,00	12,975	0,997
	<i>MTT1</i>	-3,356	98,60	11,776	0,985
	<i>MTT2/4</i>	-3,432	95,60	11,817	0,991
	<i>MTT3</i>	-3,698	86,40	12,228	0,985
	<i>MTT5</i>	-3,580	90,20	13,196	0,977
	<i>CYCLIC</i>	-3,648	88,00	11,589	0,997
<i>T. thermophila</i> Cd-ADAP (-10M + 1 semana con Cd)	<i>β-actina</i>	-3,567	90,70	12,975	0,985
	<i>MTT1</i>	-3,356	98,60	11,776	0,985
	<i>MTT2/4</i>	-3,432	95,60	11,817	0,991
	<i>MTT3</i>	-3,698	86,40	12,228	0,985
	<i>MTT5</i>	-3,580	90,20	13,196	0,977
	<i>CYCLIC</i>	-3,520	92,40	11,385	0,997

Especie/Cepa	Gen	Pendiente	Eficacia (%)	Y-intercept	R ² (*)
<i>T. thermophila</i> MTT1KO	<i>β-actina</i>	-3,457	94,60	14,775	0,994
	<i>MTT2/4</i>	-3,428	95,70	9,453	0,995
	<i>MTT3</i>	-3,701	86,10	9,213	0,994
	<i>MTT5</i>	-4,059	76,40	5,658	0,992
	<i>TthebZIP1</i>	-4,749	62,40	16,283	0,995
	<i>TthebZIP2</i>	-4,273	71,40	18,423	0,973
	<i>TthebZIP3</i>	-4,779	61,90	18,016	0,993
	<i>TthebZIP4</i>	-4,398	68,80	16,187	0,977
<i>T. thermophila</i> MTT5KD	<i>β-actina</i>	-3,592	89,90	10,963	0,987
	<i>MTT1</i>	-3,554	91,10	5,988	0,990
	<i>MTT2/4</i>	-3,626	88,70	10,249	0,990
	<i>MTT3</i>	-3,861	81,60	10,192	0,996
	<i>MTT5</i>	-3,765	84,30	13,024	0,993
	<i>TthebZIP1</i>	-3,361	98,40	18,833	0,991
	<i>TthebZIP2</i>	-4,709	63,10	18,143	0,997
	<i>TthebZIP3</i>	-4,469	67,00	19,290	0,983
	<i>TthebZIP4</i>	-3,904	80,40	20,681	0,959
<i>T. thermophila</i> MTT1KO + MTT5KD	<i>β-actina</i>	-3,280	102,8	11,972	0,996
	<i>MTT2/4</i>	-3,632	88,50	10,093	0,990
	<i>MTT3</i>	-3,604	89,40	12,027	0,992
	<i>MTT5</i>	-3,701	86,30	7,231	0,989
	<i>TthebZIP1</i>	-4,099	75,40	18,532	0,999
	<i>TthebZIP2</i>	-3,400	96,80	20,739	0,971
	<i>TthebZIP3</i>	-3,575	90,00	21,954	0,942
	<i>TthebZIP4</i>	-3,584	91,10	18,633	0,954

(*): coeficiente de correlación. La eficacia (E) de la amplificación de cada pareja de cebadores se calcula a partir del valor de la pendiente de la curva estándar, según la fórmula: $E = 10^{(-1/\text{pendiente})-1}$. M: meses.

Tabla A2. Números de acceso en el GenBank (NCBI) de los genes MT de ciliados

Gen	Especie	Número de acceso
<i>TpigMT-1</i>	<i>Tetrahymena pigmentosa</i>	EU420056
<i>TpigMT-2</i>	<i>Tetrahymena pigmentosa</i>	AF479586
<i>TpyrMT-1</i>	<i>Tetrahymena pyriformis</i>	AJ005080
<i>TpyrMT-2</i>	<i>Tetrahymena pyriformis</i>	AY765220
<i>TtheMTT1</i>	<i>Tetrahymena thermophila</i>	AY061892
<i>TtheMTT1a</i>	<i>Tetrahymena thermophila</i>	KY206888
<i>TtheMTT1b</i>	<i>Tetrahymena thermophila</i>	KY206889
<i>TtheMTT2</i>	<i>Tetrahymena thermophila</i>	AY204351
<i>TtheMTT3</i>	<i>Tetrahymena thermophila</i>	AY740525
<i>TtheMTT4</i>	<i>Tetrahymena thermophila</i>	AY660008
<i>TtheMTT5</i>	<i>Tetrahymena thermophila</i>	DQ517936
<i>TrosMTT1</i>	<i>Tetrahymena rostrata</i>	EU627174
<i>TrosMTT2</i>	<i>Tetrahymena rostrata</i>	EU627175
<i>TtroMTT1</i>	<i>Tetrahymena tropicalis</i>	ABM74559
<i>TtropMT1</i>	<i>Tetrahymena tropicalis</i>	FJ664125
<i>TtropMT2</i>	<i>Tetrahymena tropicalis</i>	FJ664126
<i>TmobMT1</i>	<i>Tetrahymena mobilis</i>	HQ166888
<i>TvorMT1</i>	<i>Tetrahymena vorax</i>	HQ166889
<i>ThegMT1</i>	<i>Tetrahymena hegewischi</i>	HQ166890
<i>ThegMT2</i>	<i>Tetrahymena hegewischi</i>	HQ166891
<i>ThegMT3</i>	<i>Tetrahymena hegewischi</i>	HQ166892
<i>ThegMT4</i>	<i>Tetrahymena hegewischi</i>	HQ166893
<i>TfarCuMT</i>	<i>Tetrahymena farahensis</i>	HE820725
<i>TborMTT1</i>	<i>Tetrahymena borealis</i>	KU052675
<i>TborMTT2</i>	<i>Tetrahymena borealis</i>	KU052676
<i>TborMTT3</i>	<i>Tetrahymena borealis</i>	KU052677
<i>TborMTT4</i>	<i>Tetrahymena borealis</i>	KU167650
<i>TborMTT6</i>	<i>Tetrahymena borealis</i>	KU052678
<i>TborMTT7</i>	<i>Tetrahymena borealis</i>	KU052679
<i>TborMTT8</i>	<i>Tetrahymena borealis</i>	KU052680
<i>TelliMTT1</i>	<i>Tetrahymena elliotti</i>	KU167642
<i>TelliMTT2</i>	<i>Tetrahymena elliotti</i>	KU167643
<i>TelliMTT6</i>	<i>Tetrahymena elliotti</i>	KU167644
<i>TelliMTT8</i>	<i>Tetrahymena elliotti</i>	KU167645
<i>TmalaMTT1</i>	<i>Tetrahymena malaccensis</i>	KU167646
<i>TmalaMTT2</i>	<i>Tetrahymena malaccensis</i>	KU167647
<i>TmalaMTT3</i>	<i>Tetrahymena malaccensis</i>	KU167648
<i>TmalaMTT4</i>	<i>Tetrahymena malaccensis</i>	KU167649
<i>TmalaMTT5</i>	<i>Tetrahymena malaccensis</i>	KU167651
<i>TpatMTT1</i>	<i>Tetrahymena patula</i>	KU167652
<i>TpatMTT2</i>	<i>Tetrahymena patula</i>	KU167653
<i>TamerMTT1</i>	<i>Tetrahymena americanis</i>	KU052681
<i>TamerMTT2</i>	<i>Tetrahymena americanis</i>	KU167641
<i>TamerMTT3</i>	<i>Tetrahymena americanis</i>	KU167655
<i>ImMTT2</i>	<i>Ichthyophthirius multifiliis</i>	KU167654

Los 24 nuevos genes MT (la mayoría como ADNc) descritos en este trabajo aparecen destacados en naranja.

Tabla A3. Números de acceso en el GenBank (NCBI) de las secuencias de MTs de otros organismos no pertenecientes al género *Tetrahymena*

Denominación en este trabajo	Gen/ Proteína	Especie	Grupo biológico	Nº acceso
PaerMT	MT	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	γ-Proteobacteria	EKA54082
TvulMT-NA	MT-NA	<i>Thermosynechococcus vulcanus</i>	Cianobacteria	CAA37832
SmtA	SmtA	<i>Synechococcus</i>	Cianobacteria	CAA45873
AbisMT	MT2	<i>Agaricus bisporus</i>	Hongo filamentoso	EKV50732
Mmt1	Mmt1	<i>Magnaporthe grisea</i>	Hongo filamentoso	AAS86162
ScerCuMT	MT	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Levadura	AAA66061
Cup1	Cup1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Levadura	NP_011922
YlipMT	MT-3	<i>Yarrowia (Candida) lipolytica</i>	Levadura	Q9HFD0
MeduMT-10-Ia	MT-10-Ia	<i>Mytilus edulis</i>	Molusco bivalvo	CAA06548
CvirMT-IVB	MT-IVB	<i>Crassostrea virginica</i>	Molusco bivalvo	AAZ94898
HamerMT-1	MT-1	<i>Homarus americanus</i>	Crustáceo	P29499
CsapMT-1	CdMT-I	<i>Callinectes sapidus</i>	Crustáceo	AAF08964
CsapMT-2	CuMT-II	<i>Callinectes sapidus</i>	Crustáceo	AAF08966
DmelMT-1	MT-A	<i>Drosophila melanogaster</i>	Insecto	NP_001262438
CeleMT-1	MT-I	<i>Caenorhabditis elegans</i>	Nematodo	P17511
EfetMT	MT	<i>Eisenia foestida</i>	Anélido	P81695
SpurMT-A	MTA	<i>Strongylocentrotus purpuratus</i>	Equinoideo	P04734
TaesMT-1	EC-protein I/II	<i>Triticum aestivum</i>	Planta	P30569
ZmaysMT-1	MT	<i>Zea mays</i>	Planta	2118343A
AthaMT-1A	MT-1A	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Planta	AEE28147
NcorMT-A	MT-A	<i>Notothenia coriiceps</i>	Pez	P62339
DrerMT-1	MT-1	<i>Danio rerio</i>	Pez	NP_571150
XlaeMT-A	MT-A	<i>Xenopus laevis</i>	Anfibio	AAB60616
HsapMT-1A	MT-1A	<i>Homo sapiens</i>	Mamífero	AAH29475
HsapMT-1F	MT-1F	<i>Homo sapiens</i>	Mamífero	AAA36213
HsapMT-2	MT-2	<i>Homo sapiens</i>	Mamífero	CAA65915
PtroMT-1X	MT-1X	<i>Pan troglodytes</i>	Mamífero	JAA05282
RratMT-2	MT-2	<i>Rattus rattus</i>	Mamífero	4MT2_A
MmusMT-1	MT-1	<i>Mus musculus</i>	Mamífero	EDL11119
EcabMT-1A	MT-1A	<i>Equus caballus</i>	Mamífero	P02800
OcunMT-2A	MT-2A	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	Mamífero	AAB21306
SscroMT-1C	MT-1C	<i>Sus scrofa</i>	Mamífero	P79376

Tabla A4. Números de acceso en el GenBank (NCBI) de los ARNr 18S de aquellas especies de *Tetrahymena* en las que se ha descrito alguna MT

Grupo filogenético (riboset)	Especie	Nº acceso del ARNr 18S
Borealis (RSA1)	<i>T. malaccensis</i>	M26360
	<i>T. thermophila</i>	M10930
	<i>T. farahensis</i>	HE820726
Borealis (RAS2)	<i>T. borealis</i>	M98020
	<i>T. ellioti</i>	EF070246
	<i>T. mobilis</i>	AF364040
	<i>T. rostrata</i>	AF364042
	<i>T. tropicalis</i>	X56168
Borealis (RSB)	<i>T. pyriformis</i>	X56171
	<i>T. vorax</i>	AF364038
Australis (RSC)	<i>T. americanis</i>	EF070242
	<i>T. hegewischi</i>	X56166
	<i>T. patula</i>	X56174
	<i>T. pigmentosa</i>	M26358

Tabla A5. Números de acceso en el GenBank (NCBI) o en las bases de datos de *Tetrahymena* de los posibles genes codificantes de factores de transcripción pertenecientes a la superfamilia bZIP

Especie	Nombre asignado al factor de transcripción	Nº acceso
<i>T. thermophila</i>	TthebZIP1	TTHERM_00442410
	TthebZIP2	TTHERM_00245720
	TthebZIP3	TTHERM_00442930
	TthebZIP4	TTHERM_00349090
<i>T. borealis</i>	TborbZIP1	EI9_12572.2
	TborbZIP2	EI9_09817.1
	TborbZIP3	EI9_00516.1
	TborbZIP4	EI9_12630.1
<i>T. malaccensis</i>	TmalabZIP1	EIA_12351.2
	TmalabZIP2	EIA_03662.2
	TmalabZIP3	EIA_12297.2
	TmalabZIP4	EIA_09172.2
<i>T. ellioti</i>	TellibZIP1	EI7_15490.3
	TellibZIP2	EI7_01112.3
	TellibZIP3	EI7_15548
	TellibZIP4	EI7_14928.3
<i>Homo sapiens</i>	FOS	CAG47063
<i>Caenorhabditis elegans</i>	FOS-1	NP_001033481
<i>Mus musculus</i>	JUN-B	NP_032442
<i>Rattus norvegicus</i>	ATF3	NP_037044

Tabla A6. Análisis *in silico* de similitud estructural entre todas las CdMTs conocidas en el género *Tetrahymena* con proteínas de diferentes organismos cuya estructura tridimensional ha sido obtenida experimentalmente

CdMT	Longitud total (aa)	Nº aa modelados (%)*	Proteínas con las que el programa encuentra cierta similitud estructural (C: cobertura del alineamiento; ID: porcentaje de similitud estructural)
TpigMT-1	118	0 (0%)	No se encuentran proteínas similares
TpyrMT1	107	0 (0%)	MT-1 de <i>Homarus americanus</i> (langosta americana) <i>Crustacea</i> . (C: 11%; ID: 62%) MT-A <i>Strongylocentrotus purpuratus</i> (erizo de mar púrpura) <i>Echinoidea</i> (C: 8%; ID: 60%) MT-I de <i>Callinectes sapidus</i> (Cangrejo azul). <i>Crustacea</i> . (C: 11%; ID: 54%)
TpyrMT2	181	173 (96%)	Proteína de adhesión celular: integrina beta-2. <i>H. sapiens. Vertebrata</i> . (C: 95%; ID: 14%) Proteína de señalización: jagged-1. <i>H. sapiens. Vertebrata</i> . (C: 80%; ID: 10%)
TtheMTT1	162	158 (98%)	Proteína de señalización: interacción con hedgehog. <i>H. sapiens. Vertebrata</i> . (C: 40%; ID:19%) Proteína estructural: fibrilina-1. <i>H. sapiens. Vertebrata</i> . (C: 72%; ID: 14%)
TtheMTT3	162	150 (93%)	Jagged-1 (protein-binding). <i>H. sapiens. Vertebrata</i> . (C: 92%; ID: 12%) Proteína estructural: fibrilina-1. <i>H. sapiens. Vertebrata</i> . (C:80%; ID: 16%)
TtheMTT5	99	0 (0%)	MT-1 de <i>Homarus americanus</i> (langosta americana) <i>Crustacea</i> (C: 12%; ID: 38%) MT-I de <i>Callinectes sapidus</i> (Cangrejo azul). <i>Crustacea</i> . (C: 12%; ID: 38%)
TrosMTT1	113	0 (0%)	MT-1 de <i>Homarus americanus</i> (langosta americana) <i>Crustacea</i> . (C: 10%; ID: 54%)
TtroMTT1	156	96 (62%)	Proteína de señalización: interacción con hedgehog. <i>H. sapiens. Vertebrata</i> . (C:33%; ID:19%) Proteína de señalización: Factor de inhibición 1 de Wnt. <i>H. sapiens. Vertebrata</i> . (C:60%; ID: 21%)
TmobMT1	172	146 (85%)	Proteína de señalización: interacción con hedgehog. <i>H. sapiens.</i> (C:30%; ID:15%) Proteína de señalización: Factor de inhibición 1 de Wnt. <i>H. sapiens. Vertebrata</i> . (C: 31%; ID: 22%)
TvorMT1	169	163 (97%)	Proteína estructural: fibrilina-1. <i>H. sapiens. Vertebrata</i> . (C: 80%; ID: 16%) Proteína de unión: netrína-1. <i>H. sapiens.</i> (C:96%; ID:18%)
ThegMT1	122	0 (0%)	No se encuentran proteínas similares
ThegMT2	191	181 (95%)	Proteína de señalización del tipo delta. <i>H. sapiens. Vertebrata</i> . (C: 94%; ID: 18%) Factor de coagulación VIIa (EGF-Laminina). <i>H. sapiens. Vertebrata</i> . (C: 22%; ID: 7%)
ThegMT3	178	131 (74%)	Proteína estructural: fibrilina-1. <i>H. sapiens. Vertebrata</i> . (C: 78%; ID: 14%) Proteína de señalización: Factor de inhibición 1 de Wnt. <i>H. sapiens. Vertebrata</i> . (C:40%; ID: 15%)
ThegMT4	193	189 (98%)	Proteína de adhesión celular: laminina. <i>H. sapiens. Vertebrata</i> . (C: 93%; ID:12%) Proteína de señalización tipo delta. <i>H. sapiens. Vertebrata</i> . (C: 91%; ID: 14%)
TborMTT1	113	0 (0%)	MT-1 de <i>Homarus americanus</i> (langosta americana) <i>Crustacea</i> . (C: 10%; ID: 54%)
TborMTT2	163	130 (80%)	Proteína de señalización: interacción con hedgehog. <i>H. sapiens. Vertebrata</i> . (C: 34%; ID:14%) Proteína estructural: fibrilina-1. <i>H. sapiens. Vertebrata</i> . (C: 91%; ID: 13%)
TelliMTT1	154	81 (53%)	Proteína de señalización: Factor de inhibición 1 de Wnt. <i>H. sapiens. Vertebrata</i> . (C:51%; ID: 20%) Proteína de unión del tipo delta. <i>H. sapiens. Vertebrata</i> . (C: 45%; ID: 14%)
TelliMTT2	145	140 (97%)	Proteína de señalización: interacción con hedgehog. <i>H. sapiens. Vertebrata</i> . (C:42%; ID:16%) Proteína de señalización: Factor de inhibición 1 de Wnt. <i>H. sapiens. Vertebrata</i> . (C:72%; ID: 20%)
TamerMTT1	106	0 (0%)	MT-1 de <i>Homarus americanus</i> (langosta americana) <i>Crustacea</i> . (C: 21%; ID: 50%) MT-I de <i>Callinectes sapidus</i> (Cangrejo azul). <i>Crustacea</i> . (C: 11%; ID: 62%)
TamerMTT2	157	125 (80%)	Proteína de adhesión celular: integrina beta-2. <i>H. sapiens. Vertebrata</i> . (C: 79%; ID:12%) Proteína estructural: fibrilina-1. <i>H. sapiens. Vertebrata</i> . (C: 75%; ID: 13%)
TmalaMTT1	162	139 (86%)	Proteína de señalización: Factor de inhibición 1 de Wnt. <i>H. sapiens. Vertebrata</i> . (C:75%; ID: 20%) Proteína de señalización: interacción con hedgehog. <i>H. sapiens. Vertebrata</i> . (C:38%; ID:26%)
TmalaMTT2	162	100 (62%)	Proteína de señalización: Factor de inhibición 1 de Wnt. <i>H. sapiens. Vertebrata</i> . (C:93%; ID: 23%) Proteína estructural: fibrilina-1. <i>H. sapiens. Vertebrata</i> . (C: 89%; ID: 11%)
TmalaMTT3	179	80 (45%)	Proteína de señalización: Factor de inhibición 1 de Wnt. <i>H. sapiens. Vertebrata</i> . (C:44%; ID: 15%) Proteína perteneciente a la superfamilia EFG/laminina. <i>H. sapiens. Vertebrata</i> . (C:21%; ID: 18%)
TmalaMTT4	99	0 (0%)	MT-1 de <i>Homarus americanus</i> (langosta americana) <i>Crustacea</i> . (C: 12%; ID: 38%)
TpatMTT1	117	0 (0%)	Dominio de unión a heparina del factor de crecimiento del endotelio vascular. <i>H. sapiens. Vertebrata</i> . (C: 7%; ID: 30%) Receptor de la Tyr-proteín-kinasa erbb-2. <i>H. sapiens. Vertebrata</i> . (C: 67%; ID: 8%)
TpatMTT2	148	133 (90%)	Proteína de adhesión celular: dominio del-1 egf. <i>H. sapiens. Vertebrata</i> . (C: 74%; ID: 14%) Proteína de señalización: Factor de inhibición 1 de Wnt. <i>H. sapiens. Vertebrata</i> . (C:71%; ID: 13%)

(*) Se indica el número y el porcentaje (entre paréntesis) de aminoácidos de cada secuencia que el programa *Phyre2* es capaz de modelar con una confianza superior al 90%. También se muestran las proteínas con las que el programa detecta una mayor similitud estructural, indicándose el porcentaje de la secuencia alineada (cobertura: C) y su porcentaje de identidad (ID). Las nuevas CdMTs descritas en este trabajo aparecen en naranja.

Tabla A7. Análisis de similitud estructural entre todas las CuMTs conocidas en el género *Tetrahymena* con proteínas de diferentes organismos cuya estructura tridimensional ha sido obtenida experimentalmente.

CuMT	Longitud total (aa)	Nº aa modelados (%)*	Proteínas con las que el programa encuentra cierta similitud estructural (C: cobertura del alineamiento; ID: porcentaje de similitud estructural)
TtropMT1	100	90 (90%)	Factor de coagulación IXa de <i>Sus scrofa</i> (jabalí). <i>Vertebrata</i> . (C: 80%; ID: 28%) Hidrolasa/inhibidor de hidrolasa (factor IXa) de <i>Sus scrofa</i> . (C: 89%; ID: 24%)
TtropMT2	108	106 (99%)	Hidrolasa/inhibidor de hidrolasa (factor IXa) de <i>Sus scrofa</i> . (C: 79%; ID: 25%) Factor de coagulación IXa de <i>Sus scrofa</i> (jabalí). <i>Vertebrata</i> . (C: 69%; ID: 28%)
TfarCuMT	108	98 (91%)	Factor de coagulación IXa de <i>Sus scrofa</i> (jabalí). <i>Vertebrata</i> . (C: 86%; ID: 20%) Proteína de adhesión celular: trombospondina-2. <i>H. sapiens</i> . <i>Vertebrata</i> (C: 89; ID: 23%)
TpigMT-2	96	0 (0%)	MT-1 de <i>Triticum aestivum</i> (Trigo). <i>Poaceae</i> . (C: 34%; ID: 32%) MT-2 de <i>Rattus rattus</i> (rata negra). <i>Vertebrata</i> . (C: 17%; ID: 56%) MT-1 de <i>Mus musculus</i> (ratón casero). <i>Vertebrata</i> . (C: 17%; ID: 50%) MT-2 de <i>Homo sapiens</i> . <i>Vertebrata</i> . (C: 17%; ID: 56%) MT-2A de <i>Oryctolagus cuniculus</i> (conejo común). <i>Vertebrata</i> . (C: 17%; ID: 50%) MT-2 de <i>Rattus rattus</i> (rata negra). <i>Vertebrata</i> . (C: 38%; ID: 43%) MT-A de <i>Notothenia coriiceps</i> (bacalao antártico). <i>Vertebrata</i> (C:26%; ID:42%) MT-A <i>Strongylocentrotus purpuratus</i> (erizo de mar púrpura) <i>Echinoidea</i> . (C: 26%; ID: 38%)
TtheMTT2	108	97 (90%)	NH ₂ - Factor X de <i>Bos taurus</i> (vaca o toro). <i>Vertebrata</i> . (C: 33%; ID: 27%) Factor de coagulación VIIIa de <i>Homo sapiens</i> . <i>Vertebrata</i> . (C: 34%; ID: 29%)
TtheMTT4	108	101 (94%)	Factor de coagulación IXa de <i>Sus scrofa</i> (jabalí). <i>Vertebrata</i> . (C: 84%; ID: 19%) Hidrolasa/inhibidor de hidrolasa (factor IXa) de <i>Sus scrofa</i> . (C: 71%; ID: 21%)
TrosMTT2	78	0 (0%)	MT-1 de <i>Triticum aestivum</i> (Trigo). <i>Poaceae</i> . (C: 16%; ID: 57%) MT-2 de <i>Rattus rattus</i> (rata negra). <i>Vertebrata</i> . (C: 21%; ID: 50%) MT-1 de <i>Mus musculus</i> (ratón casero). <i>Vertebrata</i> . (C: 21%; ID: 44%) MT-2 de <i>Homo sapiens</i> . <i>Vertebrata</i> . (C: 21%; ID: 50%) MT-2A de <i>Oryctolagus cuniculus</i> (conejo común). <i>Vertebrata</i> . (C: 21%; ID: 44%) MT-A de <i>Notothenia coriiceps</i> (bacalao antártico). <i>Vertebrata</i> . (C: 32%; ID_ 38%) MT-1 de <i>Homarus americanus</i> (langosta americana) <i>Crustacea</i> . (C: 28%; ID: 52%)
TamerMTT3	107	107 (100%)	Factor de coagulación IXa de <i>Sus scrofa</i> (jabalí). <i>Vertebrata</i> . (C: 80%; ID: 20%) Activador de plasminógeno de <i>Homo sapiens</i> . <i>Vertebrata</i> . (C: 47%; ID: 27%)
TmalaMTT5	108	97 (90%)	Hidrolasa/inhibidor de hidrolasa (factor IXa) de <i>Sus scrofa</i> . (C: 79%; ID: 25%) NH ₂ - Factor X de <i>Bos taurus</i> (vaca o toro). <i>Vertebrata</i> . (C: 35%; ID: 26%)
TborMTT3	158	158 (100%)	Proteína homóloga a notch 1. <i>Homo sapiens</i> . <i>Vertebrata</i> . (C: 92%; ID: 15%) Proteína de adhesión celular: integrina beta-2. <i>H. sapiens</i> . <i>Vertebrata</i> . (C: 98%; ID: 19%)
TborMTT4	60	0 (0%)	MT-1 de <i>Triticum aestivum</i> (Trigo). <i>Poaceae</i> . (C: 21%; ID: 57%) MT-2 de <i>Rattus rattus</i> (rata negra). <i>Vertebrata</i> . (C: 28%; ID: 50%) MT-1 de <i>Mus musculus</i> (ratón casero). <i>Vertebrata</i> . (C: 28%; ID: 44%) MT-2 de <i>Homo sapiens</i> . <i>Vertebrata</i> . (C: 28%; ID: 50%) MT-2A de <i>Oryctolagus cuniculus</i> (conejo común). <i>Vertebrata</i> . (C: 28%; ID: 44%) MT-2 de <i>Rattus rattus</i> (rata negra). <i>Vertebrata</i> . (C: 28%; ID: 50%) MT-1 de <i>Homarus americanus</i> (langosta americana) <i>Crustacea</i> . (C: 36%; ID: 52%) MT-A de <i>Notothenia coriiceps</i> (bacalao antártico). <i>Vertebrata</i> . (C: 41%; ID: 31%) MT-1 de <i>Callinectes sapidus</i> (Cangrejo azul). <i>Crustacea</i> . (C: 16%; ID: 45%) MT-A (dominio beta) del <i>Strongylocentrotus purpuratus</i> . <i>Echinoidea</i> . (C: 28%; ID: 44%)
TborMTT6	158	158 (100%)	Factor de coagulación VIIIa de <i>Homo sapiens</i> . <i>Vertebrata</i> . (C: 23%; ID: 26%) NH ₂ - Factor X de <i>Bos taurus</i> (vaca o toro). <i>Vertebrata</i> . (C: 23%; ID: 21%)
TborMTT7	149	140 (94%)	Factor de coagulación VIIIa de <i>Homo sapiens</i> . <i>Vertebrata</i> . (C: 24%; ID: 26%) NH ₂ - Factor X de <i>Bos taurus</i> (vaca o toro). <i>Vertebrata</i> . (C: 24%; ID: 24%)
TborMTT8	78	0 (0%)	MT-1 de <i>Triticum aestivum</i> (Trigo). <i>Poaceae</i> . (C: 16%; ID: 57%) MT-2 de <i>Rattus rattus</i> (rata negra). <i>Vertebrata</i> . (C: 21%; ID: 50%) MT-1 de <i>Mus musculus</i> (ratón casero). <i>Vertebrata</i> . (C: 21%; ID: 44%) MT-2 de <i>Homo sapiens</i> . <i>Vertebrata</i> . (C: 21%; ID: 50%) MT-2A de <i>Oryctolagus cuniculus</i> (conejo común). <i>Vertebrata</i> . (C: 21%; ID: 44%) MT-A de <i>Notothenia coriiceps</i> (bacalao antártico). (C: 32%; ID: 38%) MT-2 de <i>Rattus rattus</i> (rata negra). <i>Vertebrata</i> . (C: 21%; ID: 50%) MT-1 de <i>Homarus americanus</i> (langosta americana) <i>Crustacea</i> . (C: 28%; ID: 52%) MT-1 de <i>Callinectes sapidus</i> (Cangrejo azul). <i>Crustacea</i> . (C: 12%; ID: 45%)
TelliMTT6	148	139 (94%)	Receptor: proteína homóloga a notch 1. <i>Mus musculus</i> . <i>Vertebrata</i> . (C: 23%; ID:25%) Proteína de adhesión celular: dominio del-1 egf. <i>H. sapiens</i> . <i>Vertebrata</i> . (C: 83%; ID:14%)
TelliMTT8	90	0 (0%)	MT-1 de <i>Triticum aestivum</i> (Trigo). <i>Poaceae</i> . (C: 14%; ID: 64%) MT-1 de <i>Mus musculus</i> (ratón casero). <i>Vertebrata</i> . (C: 18%; ID: 50%) MT-2 de <i>Rattus rattus</i> (rata negra). <i>Vertebrata</i> . (C: 18%; ID: 44%) MT-2 de <i>Homo sapiens</i> . <i>Vertebrata</i> . (C: 18%; ID: 44%) MT-2 de <i>Rattus rattus</i> (rata negra). <i>Vertebrata</i> . (C: 42%; ID: 50%) MT-A de <i>Notothenia coriiceps neglecta</i> (bacalao antártico). (C: 27%; ID: 42%) MT-2A de <i>Oryctolagus cuniculus</i> (conejo común). <i>Vertebrata</i> . (C: 18%; ID: 44%) MT-1 de <i>Homarus americanus</i> (langosta americana) <i>Crustacea</i> . (C: 28%; ID: 58%)
ImMTT2	167	167 (100%)	Proteína homóloga a notch 1. <i>Homo sapiens</i> . <i>Vertebrata</i> . (C: 83%; ID: 23%) Proteína de adhesión celular (dominos EGF) de <i>Homo sapiens</i> . (C: 82%; ID: 20%)

(*) Se indica el número y el porcentaje de aminoácidos (entre paréntesis) de cada secuencia que el programa *Phyre2* es capaz de modelar con una confianza superior al 90%. También se muestran las proteínas con las que el programa detecta una mayor similitud estructural, indicándose el porcentaje de la secuencia alineada (cobertura: C) y su porcentaje de identidad (ID). Las nuevas CuMTs descritas en este trabajo aparecen en naranja.

Tabla A8. Valores de inducción relativa de los genes MT de diferentes cepas de *T. thermophila*, obtenidos mediante RT-PCR cuantitativa tras diferentes tratamientos con metales

GenMTT1											
Cepa	Tratamiento	Cd 1h	Cd 24h	MCT-Cd	Cu 1h	Cu 24h	MCT-Cu	Pb 1h	Pb 24h	MCT-Pb	
	Control SB1969	156,31 ± 51,64	247,14 ± 51,19	-	3,29 ± 0,99	1,53 ± 0,1	-	16,11 ± 3,61	20,19 ± 2,23	-	-
	Cd-ADAP	5,91 ± 0,85	23,56 ± 2,31	80,22 ± 16,5	13,21 ± 3,9	5,6 ± 0,15	-	2,18 ± 0,21	1,24 ± 0,14	-	-
	Cu-ADAP	151,58 ± 22,69	341,74 ± 69,9	-	96,1 ± 17,97	39,1 ± 7,4	9,4 ± 1,65	6,33 ± 0,72	19,48 ± 6,13	-	-
	Pb-ADAP	158,82 ± 3,75	231,95 ± 11,89	-	90,97 ± 19,7	40,03 ± 13,5	-	4,38 ± 0,56	4,43 ± 0,86	13,25 ± 1,15	-
	GFPMTT5	7,74 ± 0,73	36,32 ± 5,56	-	9,55 ± 1,94	2,8 ± 0,35	-	2,45 ± 0,31	2,16 ± 0,3	-	-
	GFPMTT1	21,82 ± 1,51	44,51 ± 6,57	-	4,32 ± 1,21	2,63 ± 0,4	-	0,15 ± 0,01	11,74 ± 3,17	-	-
	MTT5KD	135,06 ± 43,02	290,29 ± 86,59	-	10,62 ± 1,05	5,89 ± 1,39	-	22,43 ± 0,11	30,7 ± 5,23	-	-
GenMTT3											
Cepa	Tratamiento	Cd 1h	Cd 24h	MCT-Cd	Cu 1h	Cu 24h	MCT-Cu	Pb 1h	Pb 24h	MCT-Pb	
	Control SB1969	14,04 ± 4,5	21,65 ± 4,56	-	1,75 ± 0,2	1,43 ± 0,07	-	17,81 ± 3,38	4,33 ± 0,31	-	-
	Cd-ADAP	21,5 ± 2,44	32,25 ± 3,32	32,69 ± 1,99	52,02 ± 1,06	137,2 ± 5,96	-	2,69 ± 0,27	1,03 ± 0,11	-	-
	Cu-ADAP	61,73 ± 4,05	346,82 ± 77,2	-	86,44 ± 13,6	34,9 ± 2,56	3,45 ± 0,43	0,94 ± 0,11	9,54 ± 1,83	-	-
	Pb-ADAP	98,46 ± 11,28	157,86 ± 6,85	-	130,5 ± 30,9	16,19 ± 2,37	-	3,62 ± 0,17	1,85 ± 0,1	2,85 ± 0,25	-
	GFPMTT5	41,9 ± 2,17	99,45 ± 23,73	-	24,82 ± 0,63	13,38 ± 1,66	-	4,16 ± 0,17	6,19 ± 0,85	-	-
	GFPMTT1	13,04 ± 2,99	31,77 ± 4,27	-	9,91 ± 2,64	4,17 ± 1,82	-	0,1 ± 0,07	0,71 ± 0,08	-	-
	MTT1KO	24,93 ± 0,6	127,89 ± 2,94	-	2,65 ± 0,45	8,99 ± 0,71	-	13,2 ± 1,79	6,55 ± 2,74	-	-
	MTT5KD	79,35 ± 14,22	200,05 ± 58,5	-	9,004 ± 1,01	5,44 ± 1,09	-	13,45 ± 0,99	26,15 ± 4,58	-	-
	MTT1KO + MTT5KD	15,55 ± 1,12	36,65 ± 3,45	-	2,01 ± 0,07	0,56 ± 0,06	-	11,34 ± 0,13	5,75 ± 0,51	-	-

Gen MTT5										
Cepa	Tratamiento	Cd 1h	Cd 24h	MCT-Cd	Cu 1h	Cu 24h	MCT-Cu	Pb 1h	Pb 24h	MCT-Pb
	Control SB1969	863,01±240,85	2.056,3±297,5	-	49,4 ± 14,17	38,11 ± 3,28	-	192,2±48,35	4.212,7±773,5	-
	Cd-ADAP	38,44 ± 16,41	80,13 ± 1,57	420,2 ± 81,4	45,09 ± 7,8	12,06 ± 1,3	-	37,2 ± 3,66	136,21 ± 9,53	-
	Cu-ADAP	192,1 ± 33,09	930,46±189,87	-	113,2 ± 27,8	25,58 ± 4,96	47,5 ± 6,06	53,79 ± 1,06	271,47±68,71	-
	Pb-ADAP	323,74 ± 10,99	336,59 ± 63,17	-	359,6±171,1	238,2 ± 20,5	-	22,25 ± 2,87	60,64 ± 19,24	556,4±114,1
	GFPMTT5	50,39 ± 8,9	1.579,2±358,3	-	5,82 ± 0,33	5,11 ± 0,62	-	12,74 ± 1,46	23,06 ± 7,97	-
	GFPMTT1	170,47 ± 5,87	537,1 ± 79,58	-	4,33 ± 1,38	53,48 ± 7,69	-	9,13 ± 0,91	1.171,2±297,6	-
	MTT1KO	544,82 ± 110,4	703,08 ± 49,7	-	24,38 ± 3,81	23,72 ± 1,71	-	246,97 ± 32,5	454,82±145,58	-
	MITT5KD	617,68 ± 137,8	3.967,1±1.100,9	-	48,74 ± 4,6	117,2 ± 23,6	-	302,1±12,42	3.747,6 ± 690,9	-
	MITT1KO + MITT5KD	42,89 ± 4,82	76,57 ± 1,34	-	2,09 ± 0,09	2,45 ± 0,41	-	20,52 ± 0,5	108,4 ± 16,93	-
Genes MTT2/4										
Cepa	Tratamiento	Cd 1h	Cd 24h	MCT-Cd	Cu 1h	Cu 24h	MCT-Cu	Pb 1h	Pb 24h	MCT-Pb
	Control SB1969	37,53 ± 10,46	20,57 ± 3,82	-	46,9 ± 11,12	25,66 ± 3,24	-	9,46 ± 2,2	2,79 ± 0,3	-
	Cd-ADAP	1,86 ± 0,39	2,67 ± 0,14	2,29 ± 0,62	307,2 ± 99,6	99,61 ± 2,35	-	2,83 ± 0,57	0,69 ± 0,11	-
	Cu-ADAP	5,01 ± 0,52	7,23 ± 1,55	-	41,4 ± 7,2	8,73 ± 1,73	4,77 ± 0,6	1,73 ± 0,27	0,4 ± 0,08	-
	Pb-ADAP	6,35 ± 0,26	20,26 ± 0,97	-	326,3 ± 71,6	89,6 ± 9,35	-	0,36 ± 0,02	0,5 ± 0,1	0,85 ± 0,09
	GFPMTT5	2,32 ± 0,2	1,68 ± 0,24	-	103,2 ± 1,71	19,45 ± 2,35	-	3,27 ± 0,28	0,38 ± 0,05	-
	GFPMTT1	4,62 ± 0,9	1,28 ± 0,26	-	44,68 ± 13,3	6,86 ± 0,62	-	0,06 ± 0,01	0,28 ± 0,02	-
	MTT1KO	18,42 ± 0,51	12,59 ± 0,32	-	37,04 ± 5,68	40,94 ± 5,48	-	7,71 ± 1,53	0,29 ± 0,1	-
	MITT5KD	12,19 ± 2,12	14,58 ± 4,05	-	48,97 ± 7,73	28,28 ± 6,01	-	5,43 ± 0,68	1,08 ± 0,19	-
	MITT1KO + MITT5KD	11,53 ± 0,85	3,93 ± 0,18	-	9,38 ± 0,5	5,29 ± 0,86	-	2,96 ± 0,09	1,32 ± 0,13	-

(-): datos no calculados. La normalización de los valores de expresión génica se llevó a cabo utilizando el gen de la β-actina como control endógeno. Se muestran los valores medios ± la desviación estándar obtenidos a partir de dos o tres experimentos diferentes. Las concentraciones de metales así como las condiciones de cada tratamiento se indican en la Tabla 9.

Tabla A9. Valores de inducción relativa de los genes MTs (RT-PCR cuantitativa) obtenidos en cepas adaptadas a metales tras mantenerlas durante 1 (-1M) ó 6 meses (-6M) en el medio PP210 sin metal y volverlas a exponer a la MCT correspondiente durante 1 ó 24h

Gen MTT1							
Cepa	Tratamiento	Cd 1h	Cd 24h	Cu 1h	Cu 24h	Pb 1h	Pb 24h
Cepas adap (-1M)		4,049,05 ± 590,9	6,895,7 ± 1,024	32,13 ± 11,5	7,32 ± 0,28	5,54 ± 0,25	8,83 ± 2,08
Cepas adap (-6M)		89,79 ± 36,3	448,42 ± 24,26	10,15 ± 2,32	17,69 ± 11,3	8,76 ± 1,14	45,98 ± 1,74
Gen MTT3							
Cepa	Tratamiento	Cd 1h	Cd 24h	Cu 1h	Cu 24h	Pb 1h	Pb 24h
Cepas adap (-1M)		204,06 ± 29,87	626,72 ± 130,5	64,4 ± 23,04	4,02 ± 0,21	10,19 ± 0,89	10,43 ± 1,51
Cepas adap (-6M)		134,5 ± 12,55	170,32 ± 14,37	67,11 ± 16,8	30,19 ± 5,24	0,27 ± 0,03	6,37 ± 0,13
Gen MTT5							
Cepa	Tratamiento	Cd 1h	Cd 24h	Cu 1h	Cu 24h	Pb 1h	Pb 24h
Cepas adap (-1M)		231,65 ± 33,75	15,429 ± 2,427	18,28 ± 5,16	13,23 ± 1,68	7,89 ± 0,09	16,97 ± 5,48
Cepas adap (-6M)		162,45 ± 11,12	523,22 ± 131,9	11,99 ± 2,76	20,89 ± 5,54	23,29 ± 4,91	626,71 ± 23,9
Genes MTT2/4							
Cepa	Tratamiento	Cd 1h	Cd 24h	Cu 1h	Cu 24h	Pb 1h	Pb 24h
Cepas adap (-1M)		34,68 ± 6,73	15,57 ± 2,33	93,7 ± 19,31	5,68 ± 0,91	5,41 ± 0,36	0,95 ± 0,24
Cepas adap (-6M)		60,87 ± 3,94	89,55 ± 5,73	40,52 ± 9,26	43,7 ± 11,33	2,95 ± 0,25	2,25 ± 0,04

Cada cepa adaptada (Cd-ADAP, Cu-ADAP o Pb-ADAP) (adap), tras mantenerse durante 1 (-1M) ó 6 meses (-6M) en el medio PP210 sin el metal correspondiente, se volvió a exponer a la máxima concentración tolerada (MCT) del metal al que se adaptó) durante 1 ó 24h. La normalización de los valores de expresión génica se llevó a cabo utilizando el gen de la β-actina como control endógeno. Se muestran los valores medios ± la desviación estándar obtenidos a partir de dos o tres experimentos diferentes. Las concentraciones de metales así como las condiciones de cada tratamiento se indican en la Tabla 9.

Tabla A10. Cálculo del número de copias/ μ l de cada uno de los genes codificantes de MTs en diferentes cepas de *T. thermophila*

Cepa	Gen	<i>MTT1</i>	<i>MTT3</i>	<i>MTT5</i>	<i>MTT2/4</i>	<i>CYCLIC</i>	β -actina
Control (SB1969)		1,13 \pm 0,02	0,98 \pm 0,03	1,12 \pm 0,02	2,33 \pm 0,09	1,21 \pm 0,03	0,76 \pm 0,03
Control (CU428)		1,06 \pm 0,04	1,29 \pm 0,03	0,72 \pm 0,02	2,26 \pm 0,06	1,57 \pm 0,04	0,77 \pm 0,02
Control (SB210)		1,45 \pm 0,06	1,38 \pm 0,03	0,81 \pm 0,02	2,19 \pm 0,06	1,79 \pm 0,02	0,54 \pm 0,02
GFPMTT1		1,21 \pm 0,02	1,13 \pm 0,02	0,55 \pm 0,02	1,92 \pm 0,04	1,31 \pm 0,02	0,77 \pm 0,02
Cd-ADAP		5,30 \pm 0,07	5,35 \pm 0,08	0,75 \pm 0,02	2,26 \pm 0,05	5,94 \pm 0,07	1,01 \pm 0,02
Cd-ADAP (-1M)		2,60 \pm 0,06	2,69 \pm 0,01	0,91 \pm 0,02	3,09 \pm 0,05	2,95 \pm 0,03	0,89 \pm 0,02
Cd-ADAP (-7M)		1,33 \pm 0,03	1,29 \pm 0,02	0,67 \pm 0,013	2,17 \pm 0,06	1,44 \pm 0,01	0,6 \pm 0,02
Cd-ADAP (-10M)		1,02 \pm 0,01	1,62 \pm 0,03	0,88 \pm 0,02	2,36 \pm 0,04	1,46 \pm 0,01	0,76 \pm 0,01
Cd-ADAP (-10M + 1 semana con Cd)		2,86 \pm 0,02	2,9 \pm 0,01	0,68 \pm 0,003	2,28 \pm 0,01	3,38 \pm 0,01	0,8 \pm 0,015
Cu-ADAP		0,81 \pm 0,01	1,5 \pm 0,02	1,08 \pm 0,01	2,49 \pm 0,09	1,38 \pm 0,03	0,94 \pm 0,03
Pb-ADAP		1,4 \pm 0,03	1,39 \pm 0,01	0,67 \pm 0,02	2,75 \pm 0,07	1,24 \pm 0,04	1,12 \pm 0,03
MTT1KO		0,0005 \pm 0,00003	1,12 \pm 0,03	0,63 \pm 0,02	1,81 \pm 0,06	1,34 \pm 0,05	1,06 \pm 0,04
MTT5KD		2,64 \pm 0,03	1,04 \pm 0,009	0,01 \pm 0,0001	2,57 \pm 0,01	1,5 \pm 0,02	0,91 \pm 0,02
MTT1KO + MTT5KD		0,001 \pm 0,00008	0,69 \pm 0,01	0,07 \pm 0,001	1,92 \pm 0,02	1,2 \pm 0,005	0,8 \pm 0,02
MTT5KD (1 semana sin Pm)		2,32 \pm 0,05	1,16 \pm 0,03	0,55 \pm 0,02	2,16 \pm 0,05		0,93 \pm 0,02
MTT1KO+MTT5KD (1 semana sin CHX)		0,00009 \pm 0,000004	0,92 \pm 0,01	0,61 \pm 0,009	1,6 \pm 0,005		0,95 \pm 0,008

Los genes de la β -actina y *CYCLIC* (TTHERM_00241620) se utilizan como controles internos del experimento. El número medio de copias/ μ l para cada gen en cada una de las cepas analizadas se calcula utilizando la siguiente ecuación: $Ct = \text{slope} \times \log(\text{number of copies}/\mu\text{l}) + \text{y-intercept}$. Cada valor indicado en esta tabla se corresponde con el valor medio del número de copias/ μ l \pm la desviación estándar y se obtienen a partir de al menos cuatro experimentos independientes. En rojo se indican los valores que muestran diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,01$) respecto de la cepa control SB1969.

Tabla A11. Valores de inducción relativa obtenidos por RT-PCR cuantitativa para los cuatro genes codificantes de factores de transcripción AP-1 en *T. thermophila*

Gen <i>TthebZIP1</i>								
Cepa	Tratamiento	Cd 1h	Cd 24h	Cu 1h	Cu 24h	Pb 1h	Pb 24h	MCT
Control SB1969		2,06 ± 0,59	2,84 ± 0,70	2,00 ± 0,36	1,58 ± 0,31	1,19 ± 0,20	5,7 ± 0,39	-
Cd-ADAP		1,52 ± 0,62	4,92 ± 0,28	2,68 ± 0,14	2,21 ± 0,29	0,07 ± 0,02	0,60 ± 0,05	5,48 ± 0,48
Cu-ADAP		2,68 ± 0,62	2,90 ± 0,68	0,80 ± 0,16	0,44 ± 0,10	0,01 ± 0,004	0,15 ± 0,04	0,46 ± 0,07
Pb-ADAP		0,38 ± 0,03	0,46 ± 0,085	0,38 ± 0,02	1,004 ± 0,15	0,10 ± 0,01	0,04 ± 0,002	0,26 ± 0,09
GFPMTT5		2,70 ± 0,32	7,44 ± 1,37	1,14 ± 0,085	2,71 ± 0,42	0,15 ± 0,004	2,32 ± 0,32	-
GFPMTT1		1,16 ± 0,25	1,37 ± 0,27	0,67 ± 0,10	0,59 ± 0,15	0,01 ± 0,002	0,30 ± 0,06	-
MTT1KO		3,18 ± 0,08	1,63 ± 0,13	1,69 ± 0,25	3,03 ± 0,22	1,99 ± 0,27	1,46 ± 0,45	-
MTT5KD		15,18 ± 2,98	17,97 ± 5,50	1,09 ± 0,11	4,47 ± 0,89	1,11 ± 0,03	9,37 ± 1,49	-
MTT1KO+MTT5KD		1,06 ± 0,09	1,90 ± 0,12	0,91 ± 0,06	1,15 ± 0,14	1,11 ± 0,18	2,26 ± 0,24	-
Gen <i>TthebZIP2</i>								
Cepa	Tratamiento	Cd 1h	Cd 24h	Cu 1h	Cu 24h	Pb 1h	Pb 24h	MCT
Control SB1969		1,04 ± 0,33	2,19 ± 0,40	1,20 ± 0,24	0,99 ± 0,13	0,96 ± 0,17	5,37 ± 0,45	-
Cd-ADAP		1,01 ± 0,39	2,45 ± 0,13	2,30 ± 0,05	63,43 ± 7,36	0,81 ± 0,3	2,05 ± 0,16	1,12 ± 0,13
Cu-ADAP		1,77 ± 0,42	16,70 ± 4,01	0,85 ± 0,13	0,28 ± 0,05	0,11 ± 0,03	0,29 ± 0,04	0,35 ± 0,06
Pb-ADAP		1,78 ± 0,10	35,03 ± 5,96	2,75 ± 0,26	0,27 ± 0,04	3,53 ± 0,21	0,91 ± 0,03	0,90 ± 0,34
GFPMTT5		2,91 ± 0,61	8,25 ± 1,79	1,91 ± 0,26	0,89 ± 0,18	0,79 ± 0,13	1,87 ± 0,44	-
GFPMTT1		1,54 ± 0,36	15,01 ± 2,48	3,77 ± 0,32	0,78 ± 0,24	0,15 ± 0,007	1,42 ± 0,31	-
MTT1KO		2,81 ± 0,31	2,95 ± 0,07	1,29 ± 0,21	3,69 ± 0,27	3,12 ± 0,40	1,30 ± 0,40	-
MTT5KD		0,84 ± 0,15	1,02 ± 0,30	0,61 ± 0,06	1,06 ± 0,24	0,65 ± 0,001	0,84 ± 0,14	-
MTT1KO+MTT5KD		1,06 ± 0,08	8,06 ± 0,41	1,02 ± 0,07	0,96 ± 0,12	1,05 ± 0,06	2,18 ± 0,19	-
Gen <i>TthebZIP3</i>								
Cepa	Tratamiento	Cd 1h	Cd 24h	Cu 1h	Cu 24h	Pb 1h	Pb 24h	MCT
Control SB1969		2,10 ± 0,70	2,68 ± 0,49	1,44 ± 0,33	1,44 ± 0,35	1,17 ± 0,40	8,25 ± 0,64	-
Cd-ADAP		1,55 ± 0,46	9,29 ± 0,61	4,97 ± 1,78	2,23 ± 0,51	0,27 ± 0,08	2,08 ± 0,30	4,55 ± 1,28
Cu-ADAP		3,61 ± 0,87	7,21 ± 1,82	1,05 ± 0,14	0,84 ± 0,15	0,08 ± 0,02	0,35 ± 0,04	0,62 ± 0,09
Pb-ADAP		0,44 ± 0,05	1,30 ± 0,36	0,49 ± 0,03	0,68 ± 0,17	0,25 ± 0,01	0,12 ± 0,05	0,38 ± 0,14
GFPMTT5		5,99 ± 1,06	6,32 ± 0,84	1,66 ± 0,36	2,20 ± 0,48	0,34 ± 0,02	2,21 ± 0,45	-
GFPMTT1		2,46 ± 0,59	1,42 ± 0,34	0,20 ± 0,03	0,62 ± 0,13	0,07 ± 0,02	0,43 ± 0,08	-
MTT1KO		2,40 ± 0,06	2,69 ± 0,06	1,23 ± 0,20	2,60 ± 0,18	2,10 ± 0,27	1,76 ± 0,54	-
MTT5KD		5,56 ± 0,97	6,33 ± 1,76	1,03 ± 0,09	3,33 ± 0,66	0,88 ± 0,09	3,45 ± 0,55	-
MTT1KO+MTT5KD		1,10 ± 0,07	7,10 ± 0,35	0,63 ± 0,03	2,27 ± 0,29	0,95 ± 0,02	3,40 ± 0,30	-
Gen <i>TthebZIP4</i>								
Cepa	Tratamiento	Cd 1h	Cd 24h	Cu 1h	Cu 24h	Pb 1h	Pb 24h	MCT
Control SB1969		2,15 ± 0,96	2,39 ± 0,36	2,2 ± 0,12	4,55 ± 0,18	1,11 ± 0,23	1,34 ± 0,37	-
Cd-ADAP		1,86 ± 0,49	8,54 ± 0,38	8,53 ± 0,22	5,37 ± 0,33	0,17 ± 0,04	2,38 ± 0,18	3,13 ± 0,20
Cu-ADAP		2,84 ± 0,64	5,14 ± 1,26	2,12 ± 0,19	0,96 ± 0,18	0,01 ± 0,003	0,20 ± 0,016	0,54 ± 0,08
Pb-ADAP		0,68 ± 0,05	1,03 ± 0,09	0,49 ± 0,03	0,32 ± 0,16	0,10 ± 0,005	0,12 ± 0,006	0,45 ± 0,17
GFPMTT5		1,47 ± 0,16	2,31 ± 1,09	4,22 ± 1,60	0,38 ± 0,13	0,25 ± 0,01	1,20 ± 0,17	-
GFPMTT1		0,75 ± 0,19	0,77 ± 0,11	0,69 ± 0,22	0,70 ± 0,14	0,05 ± 0,002	0,36 ± 0,04	-
MTT1KO		2,45 ± 0,34	2,85 ± 0,09	1,68 ± 0,25	2,68 ± 0,20	2,05 ± 0,30	1,43 ± 0,45	-
MTT5KD		5,67 ± 1,002	4,92 ± 1,37	1,11 ± 0,11	3,28 ± 0,67	1,43 ± 0,03	3,01 ± 0,48	-
MTT1KO+MTT5KD		0,95 ± 0,07	3,50 ± 0,12	0,58 ± 0,03	1,25 ± 0,28	0,63 ± 0,07	1,30 ± 0,23	-

(-): datos no calculados. MCT (máxima concentración tolerada) en las cepas adaptadas. Se muestran los valores medios ± la desviación estándar derivados de dos o tres experimentos diferentes. En rojo se señalan aquellos valores que superan el valor de inducción mínimo considerado (≥ 2) (véase el texto). Las concentraciones de metales y las condiciones de cada tratamiento se indican en la Tabla 9.

ANEXO II. Secuencias de los ADNc completos de las nuevas MTs

En cada uno de los ADNc se distinguen: la potencial secuencia codificante (ORF), que aparece subrayada (con los codones de inicio y “stop” en negrita), y las regiones 5' y 3' UTRs, que se muestran en cursiva. En éstas últimas, los motivos del tipo MTCM1 se somborean en morado, las cajas TATA en verde, las dos potenciales señales canónicas de poliadenilación están subrayadas o sombreadas en gris y las posibles señales de degradación del ARNm se muestran en color rojo. El extremo 3' termina con la cola poliA.

TborMTT1 (CdMT):

5'AAAAAGAATAAAATTTAACAGATTTAAAGGATTAGTAATGATAAAAATACTAAAAAGGCAGTAAATATAAAT
 AAAAGGTATTATAAACTAAATATTACTAGGGTTATTTAATATAATGTTTTAAATATTAGTATATTTTAATTATTAA
 ATTATTTAATTGCTTGCATTATGGATT**TAATAA**GTAAATTAATTTCAAAGAGTTATGTAGAGGAATTTTTCTAA
 AAAATCCAAAGTGAATGCTAAATGA**ATCTGATTAATGATT**AGTATTTTTCTTAAAGTAAATTAGAAATGAATACT
 AAAATAAAAAATAAGATTTTGAATAATGATAAGTCTTATTATTATATGAAATAATATCTTAGCATTAAAGTAAAAATA
 AATCTAAATTTTAAATGAGTTAAATAAAATAGATGGAAGTTAATCCATTATATAATTTAATTGAAATAAAATTTAT
 TTTTTACACTTAATCATTTAAAACTTTATTTATTTTAAAGAGTTGAAGTAGATGAAATCTTACTTGAAATAGA
 AGTATTTT**TAATAA**TTTTATAAAATTAATCCATCTTACTTTCAAATAATTTAAAAGTTGGTATATAGTCCTATATCAT
 GTATTCCTATAGAATTTAAAAAGAAAAATTTATAAATTTGCCATGTCATTAATATAATTATAGTGATGCAATAATCTT
 TGAGACTCCTAACTTTAAAGTGATTCCTCATTTCCTTAA**TAATAA**ATTAATAAAATTTATCAGAAAATTGTTAATT
 TGTAATTAATAATCCTGAAATCAAATA**CAGTGATTCATAAGC**AACTCCTAAATTTCTAAGAAAAATTAATCAGTATA
 AGTAGTCTATTTCAAGTCGTAA**AGTGATTCATGAAG**AGATCATGAATTTTCAAATATATCTATTATGAAACAATT
 TTTATACTTTAATTGCAAGAGTGACTCTT**AGGTTGATCATGAAC**CATAACTTTACTATATTACTATAAAATTTGATGGTAT
 CAAAATGATATAATCTAATCAATCAAGTAAATTAATAAAATTAAGCAAACTCAATAAATTAATACTTATT
 AGAAAAAA**ATG**GATAAAAACCTCTTGTGTTGTGGTGAAAATGCCAAGCCTTGCTGCACTGATCCTAACAGTGGAT
 GCTGTTGCTCTAGCAAGACTAACAACTGCTGTTAATCTGATACTAAATAATGCTGCACAGGAACAGGACCAGGCTG
 CAAATGACTAGTTGCAATGCTGCTAACCTGCTACTTGCTGTTGTGGTGATAAGGCTAAGCCCTGTTGCACAGAT
 CCTAATAGTGGATGTTGCTGTGTAAGTAAACTAATAACTGTTGCAAGCCTGACTAAATAATGCTGCACAGGTA
 CTGGTGATGCTTGAAATGTACAGGATGCCAATGTTGCAACAAT**TGA**AATATAAAATGAGGATTAATAAATTTTA
 TGTATTGAAGTTATGTATA**ATTTA**TATAGTATTTTATCTTAATTTTATTTTATTTGAAAGAAAAAAAAAAAAAAAAA
 A 3'

TborMTT2 (CdMT):

5'TTTTAGAAATACCAATTTTATTTAACTTCAATTTTCATAAATCTATTTTAAATTTGGTATTACTAAAGTTATTTATAA
GAATTTTCTACTTTAATAGATTATTGATTCATTCTAAATATCATCTTATTACTCTATACAATTTTCAATAGTATTGAAT
CATACTTCCTATTTTTGAATCAACAATAAAATTTTAAATTAATGAATAGAGGATTTAATTTAAATGATAAGGATATC
CCCTTAGAATAACTAAAATGATACTAATGCAGTAGAATAGATATTCTTTATTTTCGTTTCATAAGGATACAAATGT
TTAGAGAAAATGAAGATAATTCTAAATTTAGTCAAGTAATATATACTTCTGGATTTTAGAATAAGGAGTGATTCCT
TTATTTATAAATACTCAATTATTTAATATTTCATGAATTTAGCTTTTTTCTTAATTTAAATAATTGACTCATT
CAAAATAATTTCTAACTTGAAAAATTTATCAGAATTTCTTTCTATTTTATTTATTAGTGATTCATTAATTTTTT
TTAAAAATCTTTTATATTTCTATTTTAAAAATTTCTAATTTTACTGATATTCAAATTATGATATGTGTACCTACTTTT
TGTTGCCTATAAATGCTCTAAGTAAAAAGCCATATAATTAATAAATAATCAATCAATCAAATAAATAAAAAATAA
ACAAAATATCAATCTTCAAAAAACAATTAAAAAAAAATGGGATACTGTTAATCAAAGTGTTGCTCTAGTGGAACT
AAGACTTGTGCAATGATCCTAAATGTCAATGTTGTTGTGTAAGCAAGGAAGACAGTTGCTGTAAAACTAACACTA
AAGGATGCTGTAGTTCATCAACTGAAAGCTGTAAATGTACTTGTCTAAGTGTGTAACCTTAAGCTGCTTGTGTT
TGTGCTCCCACTAAAGCTTGTGTTAAGATCCTAATTGTGGATGTAATGTGCAAACAAAGCAAATAACTGCT
GCTGCAAAGGTGACTCTAAATAATGCTGTAAAATAACTGGTAAAGAATGCAAGTGTACTGACTGTGAATGCTGTA
AGCCCGTAAAAGCTGGATGTTGTTGTGGTGATAAGGCTAAGGCATGTTGCACAGATCCTAATAGTGGGTGTTGTT
GCTCTAGTAAGACTAATTAGTGTGTAATTCTACTGAAAAGAAAGACTGCAATCAATGTATTTGCTGCAAGTGAAT
ATTTTAAATAATATTATATAAATCTACTATGTTTAAATTTATGTCTTTTTGTAAAATTAGACTCTTAATAAAATTTT
CTTGATTAATAAAATAAAAAAATAAAAAAATAAAAAA3'

TborMTT3 (CuMT):

5'ATAATAAAGTAAATACTTCATAAAAAACATCAAATATAACTAAACAATGGATTCTGAAATTCAAACAAAGCTTA
CTTCAGTTGCAAATGCAATACTTGCAAGTGCTTACCCTCTGTAAATGTGGTACTACCTCATCGTGAATTGTTAG
CCTTGTAAAAACTGTGATGCTTGTTCATGTAATCCTTGAATTGTAGTGCTTAAAAATGCAGTATCTCTTAAGTGTGT
AGATAGATTCCACTTCTGATTCTAATACTTATGCCTCACAGAAGTGATAACTTAAATTTAAATTAATCATATAAGTCT
ATATTATCATGACTAAATAATATTCAATTTATTTTACTTATCAATTATGTTGTTAATTGTATATTACATGATATA
GTTATGCTTATTATATTAATTTAAATTTCACTATTAATAATCCTATCAATCTACTATATTATTTTCCAAAAATTAC
TTCATTCTTAATTCGATCATAATTGTTTACCATAGATTATTAGTAAAATGGAATAAAAAAATGAATCCACTCTAATT
GATAAATAATTTGAGGGGAAGTAATATACATATAAAGAGGTATTAACTCTATTTATAAATTTTATTAAGAATATT
ACTGACATAGTTGATGTTTCTTTTAAATATAATTAATTTAATTTTGAAGTAAAGTATTTAAATCATGTGT
AAATATTTATAAACTTTCTTCTGTTTTATATAATACATTTAATTTTATTTTCTATATACTAATTAGATTTGCAAGT
GCTTAATGAATTTTATCTAATAATAAATGTTTAAATAATTTGTTTATTTTCTAATTTAAATTTTAAAAATTAAT
TTTAGTGATCTCAATCAAAATAACTATAGTTTCTGATTTAGGTTTGTGAAGTAGTTATCAAGTATGTGGGATTTT
TTGAGAATTTTGAATATACACTCACTGCACACATTATTAAGAATATCTAAATGTTTGTATCTAAATTTATGGTAAAT
TTCAATTTAAATTTGTTTATAATTTTAAATACTCAAATTTGTAAAAAATAATTTATAAATCAAAGGAGTGATTC
CTTAAAAATAATTACATATTTTCTAGACCTCAATAAACCTTATAAAAAACCAATCTAAGAAATTTAATTTTGGGTA
TAAATTAGGAAGATTAATATCTGGATAATTAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAA
AAACAACATAAATAAAAACTTCTAAATGGGATACTCAAATCAAATAACTCACTCAAGGATGTTCTTGCAACCCCT
GCAAATGCTAACCTCTCTGTAAATGTGCTACTACCTCTGCATGCAATTGCTAAGCTAGTAAAAATAGTGATGCCTGT
GCATGCAATCCTTGAAGTGTGGAGTCTCTGGTACATGCAAATGCAATCCATGCTAATGTGTTGACTGTAATGTG
GTACTGCTTCTCAATAAATGTTGGCTGCAAGTGCAGTACTTGTGCATGCAACCTTGTAGGTGCGGTGTTTCTGA
TGCTTGTAAATGCAATACTTGTAAAGTGTGGAGACTGTAAATGTGGTAGTGTCTTAAATAGACTGCTGGTTGCAAA
TGCAATCCTTGACATGCAATAATTGTAAGTGTGGTGTCTGCTTCTGCAAATGTAATCCTTGTAAATGTGCTGA
CTGTAATGTTCTGGTTCTGAATCTTGTCTGCTAAAAGTAGTGAATTAGCTATTCAACCTTGAACATAAATAAATAA
ATTAATTTAAAAATTTACTCTTATTTGTAATTAATTTACTGATTATATTATATTCTATATAAAGTTGTATCTATTA
TATTATAATAAAACATACATTAAAAAAATAAAAAAATAAAAAA3'

TmalaMTT2 (CdMT):

5'AAGTTTTTAAAAATAAATTAAATTGATTTTCAAACATTTTCTTTCTTTCTTTTAAAAAGAGAAAAATAAGTATTATCAT
TTAATTTTTGATATGTTTTATAAAAAATTTTATTCCATTCATCTTAAATTATTAAGCTAAAACTTATTTCTAAATATAG
GAGAATAGGAAAAATAAATATTAAAAAAAGAATGTTAAATTGATTGTTGTTCTTA **TAATAAA**ATACACATTTT
AGAATATTAATTAATAAATCTTTTATCTTATATAGATATTCCTATTTGTTGATGATTTTTATTGT **TAATAAA**ACATAAA
ATATAATTTGACATTTTGATAATTGATTATAATTATTAGTATTAATAAATTGAAATTATATCCATTCAGTATTTTTTAT
TTTCATATAATTTTTCTTTGTTAAATACAATATTCTATCAATCCCTTCTAAGTAAAAG **TAATAAA**ATTTATTTTTGAAAA
AAGTAATGAGAATGATTATTCATGGTGAATCAAGAGTCAATTTATAATTTTTCTATTCTATAAATAACATTTAATT
CTTGAATTATTCATAAATATTTAGAAAAATTTAGATTTTGGATAAATGTAAC **AACTAACTCATGATT**TAATTATAT
TTAACTAAGTTCTCATAAAAAATAAAAAAATATTAACCTAAAAATGATGAATTATAATTTTATTCTATTACAACTCT
ACTACAAAAATTTATTTTTTTTATCTAAAATTAATTTTAACTCCTGAATTATTCATAAATATTTGGTAAAAATATAGA
TTACTGATAAATTTTTACAACCTCATGATTAATTTGAAATATATAAAGAAAACCTCCATAAAAAATAACAATGTATGA
AATTTAAAAAATGAAATTTCTATTTAAATCTACTACCAAATCTAATTTTTAAAAATTATGCATATTTTTTTGATTTTTT
GTACTTTTTAGAAAAATTTCTACATCTTAAATATCTAAGCTTTAGAAAATCTGTTTGTGCGATTATTGATAAGAAAT
AAAGTAAAAAATTTATTGAAATTTTCAATAAAAAATACTATACCTATGTAAAATAGAAGTAAAAATTTAATTCTAAAAA
TAGATTGTTAGAAAAACATAAAAAATAAAAAATAAATAAA **TAATAAA**CTCTTATAAAGAATATTAATTTGATCTGTT
CATTAAT **TAATAAA**CTAAAATTTT **TAATAAA**AAAATGATTTTTCTAATTTTTATTATTTAATTATTTAAAAATAAAA
TATAATTTCAATAATCAACAATTAGCT **TAATAAA**TATAAAAAATGATATTTTCTTATTTTTAATTTTTAAAGTC
TAATTTAACTGTAAAAATCTCAAAATAAATTAATTTTTATTTTACTAATTGTCTACTCTTTATTTTAGGTGCGATT
CTTGAATTTTTCATCAAACTTTCTAATTAATGTTATAGATTAATTACTGATAAAAAATAAAAAATTTA **GCAAGACT**
CATGATGAAATCGAGAGTCAATTTTTCAAATCTATTATTAATCTATAAATTTGAATTACTTATAGATATTTAGTAA
ATTTTAGCTTCTGATCAATTCCTATCTCATAAATATGATTTAATTTTCAGATTAGTTAAATAGAGTATAAATACA
TTGATATTTTTATTAATATATAAATTAATTA **TAATAAA**ACATT **TAATAAA**AGCTCACATAAAAAAGAAAAAA **TAAT**
AAACATAAAAA **TAATGGATAAAGTTAACAATGTTGCTGTGGTTAAATGCTAACCTCTGCTGTACAGATCCAAATA**
TTGGATGCTGCTATGCTAGTAAACTGATAATTGCTGCAAAAATGATACAAAGGAATGCTGTACTGGTACCGAAAT
AGAAGGATGCAAATGTATTAATTGCACGTGCTGCAAACCTCAAACAATTTGTTGCTGTGGAATTAATGCAAACCC
TGCTGTTAAATCCTAATAGTGGATGTTGCTGTGTTAGTAAAGCTAATAACTGTTGTAATCAGATACTAAAGAATA
TACTGGTTCTGCAGAGGGAAGTAAATGCACTAATTGTTTATGTTGCTAACCTTACAATCAGGATGCTGCTGTGGA
GATAAAGCTAAGGCTGCTGTACTGATCCGAATAGTGGATGCTGCTGCTCAAGCAAAGTAAATAAATGTTGCGAT
GCTACTTAAAAGCAAAGTAAATCTTGTAGTGTGTAATGAATATAAATCAAAATTTATTACTAGTATCTA
TATTCAT **ATTTA**CATAAAATTAATTAATAGTACTTTTTTAAATTTGATACTGATTTTAAAAAATAAAAAAATTTT **3'**

TmalaMTT3 (CdMT):

5'ATTAACGAA**ATG**GATAAAACTTCTTAAGAAAGCTCTAAAACCTGTTGCAAACTGAAGAGAAATGGTGTCTGCTG
CCCTAGTGAAACTTAAAATGCTGCAACTCTGACGATAAGCAATGTTGTGTTGGTGAAGGGGAAGGATGCATATA
TGATGCTGTAAGTGTGTAAGGTTAAAGCTGAATGCAATTGTTGGACCTAACGCTAAATACTGCTGTATTGATCCT
AATACTGGAACCTGTTGTGTATGTAAAATAAATTTGCAGCAAATCAGATTCTACCTGCAAAAAAATGAAGAGA
AATGGTGTCTGCTCCTAGTGAATTTAAAATGTTGCAACTCTGATGATAAGTAAATGTTGTGTTGGTTAAGGAGA
AGGATGTATATATGTATGCTGCAAGTGTGTAAGGCTCAAGCTGAATGTAAGTGTGGACCTAATGCTAAATACTGC
TGTATAGATCCAAATACTGGAAACTGTTGTGTATGTAAAACCAAATTTTGCAGTAAATCAGATTCTAAAGAATGCT
GTCCTGGAGGCAAATGCT**GAA**ACTATTAATCTAAAAACAATCTAACTTAGGCAATGAAAT **ATTTAA**ATATTCTTGG
AATAAAAAATAAT **ATTTA**CACTAAAAATAAATGATAAATAAATATGCTATTTTCAATTTTAAATTTGTAATTTTAC
ATATGAATATTGAGTTGATTTTTTTTTTCCAATAATTAATAAAAAAATAAAAAAATTTT **3'**

TmalaMTT4 (CdMT):

5'AATTAGTAACTTATAAATTAACGAA**ATG**GATAAAACTTCTTAAGAAAGCTCTAAAACCTGTTGCAAACTGA
AGAGAAATGGTGTCTGCTGCCCTAGTGAACCTTAAAATGTTGCAACTCTGAAGGTAATAATGCTGTGTTGGCTAA
GGAGAAGGATGCATATATGTATGCTGCAAGTGTGTAAGGCTTAAGCTGAGTGAAGTGTGGACCTAATGCTAAA
TACTGCTGTATAGATCCAAGTACTGGAACTGTTGTGTATGTAAAATAAATTTTGTAGTAAATCAGATTCTAAGG
AATGCTGTCTGGAGGTAATGTT**GAA**AGTATGTATCGAATAACTATGCAGCTAAAGCTATGAAAAATATTTTTTA
AAATTTTCTAATGATGA **ATTTA**AGATAATTAAGCAAGATTAGCTTGTAAAGATAGTATATAAACTTTTTTAAAT
ATCAAAATAAATTTGATTATGAGTTTCAAAATAATTTCAATAAT **ATTTAATTTA**AAAAATGGATAAATATGTATTTT
AGTGCAATTTTGTATGTAAGCTGTATGATAATTTGATATTTTTATTATTAATTAATAAAAAAATAAAAAAATTTT **3'**

TamerMTT1 (CdMT):

5'CAATAAAGCTCTAATAAAAATAAATAATAACTAACTTAAAAATAATGGAATAAGTTAATAGCTGTTGCTGTGGT
GTAAATGCTAAACCTGCTGCTTTGATCCCAATAGTGGATGTTGCTGTGTTAGTAAAATAAATACTGTTGTAATC
TGATACTAAAGAATGCTGTACTGGTACTGGAGAAGGATGCAAATGTACAAGTTGCTAATGCTGCAAACCTGTTTAA
TAAGGATGTTGTTGTGGTGATAAAGCTAAGGCTTGCTGTACTGATCCAAACAGTGGATGTTGCTGCTCAAATAAG
GCAAATAAATGCTGTGATGCTACTTCAAAGCAAGAGTGTTAGACTTGTTAATGTTGTAATGAAATAAATATGTTA
ATTAAAATTTAAAATATGTTGATGTTGTAATTCATAATTGCATAAAATCAGTTTCGTATTTTATTAAAACTTTAATA
TTATCATCCTAAAAA3'

TamerMTT2 (CdMT):

5'AATTGTTGTTGCGGTGAGAATGCTAAGCCATGCTGCACAGACCCTAACAGCGGATGTTGCTGCGTAAGTAAGAC
TGATAATTGCTGCAAATCTGACACAAAGGAATGTTGCACTGGTACAGGAGAGGGATGCAAATGTGTTAATTGCAA
GTGCTGCAAACCTCAAGCAAATTGTTGCTGTGGAGTTAATGCTAAACCTGCTGCTTTGATCCCAATAGTGGATGT
TGCTGTGTTAGTAAAATAAATACTGTTGTAATCTGATACTAAAGAATGCTGTACTGGTACTGGAGAAGGATGCA
AATGTACAAGTTGCTAATGCTGCAAACCTGTTAATAAGGATGTTGTTGTTGGTGATAAAGCTAAGGCTTGCTGTAC
TGATCCAAACAGTGGATGTTGCTGCTCAAATAAGGCAAATAAATGCTGTGATGCTACTTCAAAGCAAGAGTGTTA
GACTTGTTAATGTTGTAATGAAATAAATATGTTAATTAATTTAAAATATGTTGATGTTGTAATTCATAATTGCA
TAAATCAGTTTCGTATTTTATTAAAACTTTAATATTATCAAAAAA3'

TamerMTT3 (CuMT):

5'AGCGGGGAATTAATAAAAAATAACAAAAACAACCTTAAAAAACAACAAAAACAACATAAAAAATAA
ATGGACTCAAACTCAAATAAGGCTACTGTTGGATGCTCTTGCAACCCTGCAAATGCCAACCTCTGCAAAT
GTGGAACACTGCTGCTTGCAATTGCCAACCTGCGAAAACCTGCGATCCCTGCTCTGTAATCCCTGCAAATGTGGT
GCTACTGAAAGCTGTGGCTGCAATCCTGCAAGTGTGCTGAATGCAAATGTGGATCTCACACTGAAAAGACTTCTG
CTTGCAAATGCAATCCTTGCTTGAATCCTGCAATTGCGGTTCTACTTCCAACCTGTAATGTAATCCTTGCAAAT
GTGCTGAATGCAAATGCTGAATTAATCAATCTTGAATTTAAGCAATAAAATAAATAAAATTATCTGTTATAAATTAACC
TAAAAATAATTTTAACCAAATTTAAATTATTGAATGATTTTTATTGAGAAGATATGTTAAGTCTACTTATTAATTG
TATCTTTCTTTCTAAATTTAAATATCTTAAAAA3'

MTT1a (presente exclusivamente en la cepa MTT5KD de *T. thermophila*):

5'ATGGAATAAGTTAATAGCTGTTGCTGTGGTGTAAATGCTAAGCCATGCTGCACAGACCCTAACAGCGGATGTTG
CTGCGTAAGTAAGACTGATAATTGCTGCAAATCTGATACTAAAGAATGCTGTACTGGTACTGGAGAAGGATGCAA
ATGTACAAGTTGCTAATGCTGCAAACCTGTTAATAAGGATGTTGTTGTTGGTGATAAAGCTAAGGCTTGCTGTACT
GATCCAAACAGTGGATGTTGCTGCTCAAATAAGGCAAATAAATGCTGTGATGCTACTTCAAAGCAAGAGTGTTAG
ACTTGTTAATGTTGTAATGAAATAAATATGTTAATTAATTTAAAATATGTTGATGTTGTAATTCATAATTGCAT
AAAAATCAGTTTCGTATTTTATTAAAACTTTAATATTATCATCCTAAAAA3'

MTT1b (presente exclusivamente en la cepa MTT5KD de *T. thermophila*):

5'ATGGAATAAGTTAATAGCTGTTGCTGTGGTGTAAATGCTAAGCCATGCTGCACAGACCCTAACAGCGGATGTTG
CTGCTCAAATAAGGCAAATAAATGCTGTGATGCTACTTCAAAGCAAGAGTGTTAGACTTGTTAATGTTGTAATGAA
ATAAATATGTTAATTAATTTAAAATATGTTGATGTTGTAATTCATAAAATCAGTTTCGTATTTTAT
AAAAACTTTAATATTATCATCCTAAAAA3'

RESEARCH ARTICLE

Open Access



The *Tetrahymena* metallothionein gene family: twenty-one new cDNAs, molecular characterization, phylogenetic study and comparative analysis of the gene expression under different abiotic stressors

Patricia de Francisco¹, Laura María Melgar², Silvia Díaz¹, Ana Martín-González¹ and Juan Carlos Gutiérrez^{1*}

Abstract

Background: Ciliate metallothioneins (MTs) are included in family 7 of the MT superfamily. This family has been divided into two main subfamilies: 7a or CdMTs and 7b or CuMTs. All ciliate MTs reported have been isolated from different *Tetrahymena* species and present unique features with regard to standard MTs. Likewise, an expression analysis has been carried out on some of MT genes under metal stress, corroborating their classification into two subfamilies.

Results: We isolated 21 new cDNAs from different *Tetrahymena* species to obtain a wider view of the biodiversity of these conserved genes. Structural analysis (cysteine patterns) and an updated phylogenetic study both corroborated the previous classification into two subfamilies. A new CuMT from a *Tetrahymena*-related species *Ichthyophthirius multifiliis* was also included in this general analysis. We detected a certain tendency towards the presentation of a CdMT tri-modular structure in *Borealis* group species with respect to *Australis* group. We report for the first time a semi-complete paralog duplication of a CdMT gene originating a new CdMT gene isoform in *T. malaccensis*. An asymmetry of the codon usage for glutamine residues was detected between Cd- and CuMTs, and the phylogenetic implications are discussed. A comparative gene expression analysis of several MT genes by qRT-PCR revealed differential behavior among them under different abiotic stressors in the same *Tetrahymena* species.

Conclusions: The *Tetrahymena* metallothionein family represents a quite conserved protein structure group with unique features with respect to standard MTs. Both Cd- and CuMT subfamilies present very defined and differentiated characteristics at several levels: cysteine patterns, modular structure, glutamine codon usage and gene expression under metal stress, among others. Gene duplication through evolution seems to be the major genetic mechanism for creating new MT gene isoforms and increasing their functional diversity.

Keywords: *Tetrahymena* metallothioneins, cDNAs, Structural characterization, Gene duplication, Phylogeny, Gene expression

* Correspondence: juancar@bio.ucm.es

¹Departamento Microbiología-III, Facultad de Biología. C/José Antonio Novais, 12, Universidad Complutense de Madrid (UCM), 28040 Madrid, Spain
Full list of author information is available at the end of the article



© 2016 de Francisco et al. **Open Access** This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

Background

Metallothioneins (MTs) constitute a superfamily of small ubiquitous cytosolic proteins (25–82 aa, 2.5–8.0 KDa) which are able to bind metal cations through their numerous cysteine (Cys) residues (18–23 Cys organized in conserved domains). Several functions have been proposed for these proteins [1], such as protection from toxic metals and oxidative stress [2], essential-metal homeostasis [3] and protection against xenobiotics [4]. Likewise, they have been implicated in protection against neurodegenerative diseases [5], apoptosis and the biology of aging [6], as well as in processes of development and cellular differentiation [7]. This is the reason why these proteins are considered to be multifunctional proteins, involved in many diverse cellular processes.

Since 1957, when the first MT was described [8], more than 20,000 articles have been dedicated to the study of the structure, biochemical or functional features and gene expression analysis of MTs [9]. MTs have been reported in both eukaryotic organisms (protists, yeasts, phylamentous fungi, higher plants and animals) and prokaryotic cells (cyanobacteria, γ - and α -Proteobacteria and some Firmicutes) [10, 11]. To date, the presence of MTs has been reported among ciliated protozoa in only two genera (*Tetrahymena* and *Paramecium*) [12–17]. However, with regard to the putative *Paramecium* MT gene, no experimental data has been reported on its gene expression under metal stress [17]. Experiments on expression are therefore needed in order for it to be considered as a real MT. Attempts to classify MTs have been made by different authors. In 1999, Binz and Kägi [18] proposed a classification based on 15 families, defining one MT family for each main taxonomic group of organisms except fungi, to give six different sets. In this classification ciliate MTs are included in family 7, which has been subsequently divided into two main subfamilies: 7a or cadmium-binding MTs (CdMTs) and 7b or copper-binding-MTs (CuMTs) [19]. At present, subfamily 7a includes 14 CdMTs from different *Tetrahymena* species: two from *T. pyriformis* (TpyrMT-1 and TpyrMT-2) [14, 20], three from *T. thermophila* (TtheMTT1, TtheMTT3 and TtheMTT5) [19, 21], one from *T. tropicalis* (TtroMTT1) [22], one from *T. rostrata* (TrosMTT1) [23], one from *T. pigmentosa* (TpigMT-1) [15], one from *T. vorax* (TvorMT1), one from *T. mobilis* (TmobMT1) and four from *T. hegewischi* (ThegMT1, ThegMT2, ThegMT3 and ThegMT4) [16]. Subfamily 7b contains 7 CuMTs: two from *T. thermophila* (TtheMTT2 and TtheMTT4) [19, 24], one from *T. pigmentosa* (TpigMT-2) [15], two from *T. tropicalis* (TtropMT1 and TtropMT2), one from *T. rostrata* (TrosMTT2) [23] and one from an unspecified *Tetrahymena* sp1.7 (sp1.7-MT1). The two subfamilies differ mainly in their typical Cys residue clustering [12, 13].

Tetrahymena MTs have unique features with respect to MTs from other organisms. Their lengths (78–191 aa) and molecular masses (8.2–20 KDa) are higher than MTs from vertebrates (25–82 aa; 2.5–8.0 KDa); therefore, they have a considerably higher number of Cys residues and a potentially larger metal binding capacity per MT molecule [12, 13, 25]. As detected in other organisms, a remarkably regular and hierarchical modular structural organization has been observed in *Tetrahymena* MTs, mainly CdMTs [12, 13, 16, 19]. Several authors have proposed evolutionary history models for these MT genes, based on their modular and submodular structure and gene duplication as the main mechanism involved in MT evolution [12, 16, 19, 26, 27]. In general, MT genes can be induced by an extensive range of different environmental biotic or abiotic stressors, such as metal(loid)s, oxidative agents, heat or cold shocks, hormones, cytokines, pH changes, starvation, and a large variety of organic chemicals or drugs. Likewise, *Tetrahymena* MT gene expression can be induced by very diverse stressors [12, 13, 19, 20, 23, 24].

In this study we report the cloning and characterization of 21 new MT genes (cDNAs) isolated from five *Tetrahymena* species never before analysed: *T. borealis*, *T.elliotti*, *T.americana*, *T. patula* and *T. malaccensis*, selected from the two main taxonomic *Tetrahymena* groups (*australis* and *borealis*) [28]. Thereby increasing the CdMT sequences by about 46 % and the CuMT sequences ~ 56 % in the *Tetrahymena* MT family, to give us a broader view of these highly conserved molecules. Furthermore, a new putative CuMT from the *Tetrahymena* related species and fish parasite *Ichthyophthirius multifiliis* has been incorporated into the actual *in silico* analysis of the MT sequence list (after exploration of its already sequenced macronuclear genome). Owing to the high nucleotide sequence identities among these MT genes, it has only been possible to analyze six of them by quantitative RT-PCR under different metal(loid)s and other environmental stressors.

Results and discussion

New Cd- and CuMTs from different *Tetrahymena* species

At present, there are about 42 known species of the genus *Tetrahymena*. These have been classified into two main groups: *australis* and *borealis*, according to the small subunit ribosomal gene (SSrRNA, 17-18S) [28]. At the same time, the *borealis* group is divided into three groups or ribosets: RSA1, RSA2 and RSB. In order to isolate new MT genes, *Tetrahymena* species from the SSrRNA phylogenetic tree were selected [28] to obtain a broader wide view of the biodiversity of these conserved genes. Table 1, shows all the *Tetrahymena* MTs reported up to now, including the new MTs isolated in this study. So far, 13 *Tetrahymena* species have been analyzed (~31 % of the total known species): 9 from the *Borealis* group and 4 from the *Australis* group. From these, a total of 26 CdMT and 15 CuMT sequences

Table 1 Present ciliate metallothioneins

Taxonomic group	Ciliate species	CdMT	CuMT	Total
<i>Borealis</i> (RSA2)	<i>T. borealis</i>	TborMTT1 ^a	TborMTT3 ^a	7
		TborMTT2 ^a	TborMTT4 ^a	
			TborMTT6 ^a	
			TborMTT7 ^a	
			TborMTT8 ^a	
<i>Borealis</i> (RSA2)	<i>T. elliotti</i>	TelliMTT1 ^a	TelliMTT6 ^a	4
	TelliMTT2 ^a	TelliMTT8 ^a		
<i>Borealis</i> (RSA1)	<i>T. malaccensis</i>	TmalaMTT1 ^a	TmalaMTT5 ^a	5
		TmalaMTT2 ^a		
		TmalaMTT3 ^a		
		TmalaMTT4 ^a		
<i>Borealis</i> (RSA2)	<i>T. mobilis</i>	TmobMT1	?	1
<i>Borealis</i> (RSB)	<i>T. pyriformis</i>	TpyrMT-1	?	2
		TpyrMT-2		
<i>Borealis</i> (RSA2)	<i>T. rostrata</i>	TrosMTT1	TrosMTT2	2
<i>Borealis</i> (RSA1)	<i>T. thermophila</i>	TtheMTT1	TtheMTT2	5
		TtheMTT3	TtheMTT4	
		TtheMTT5		
<i>Borealis</i> (RSA2)	<i>T. tropicalis</i>	TtroMTT1	TtropMT1	3
			TtropMT2	
<i>Borealis</i> (RSB)	<i>T. vorax</i>	TvorMT1	?	1
<i>Australis</i> (RSC)	<i>T. americanis</i>	TamerMTT1 ^a	TamerMTT3 ^a	3
		TamerMTT2 ^a		
<i>Australis</i> (RSC)	<i>T. hegewischi</i>	ThegMT-1	?	4
		ThegMT-2		
		ThegMT-3		
		ThegMT-4		
<i>Australis</i> (RSC)	<i>T. patula</i>	TpatMTT1 ^a	?	2
		TpatMTT2 ^a		
<i>Australis</i> (RSC)	<i>T. pigmentosa</i>	TpigMT-1	TpigMT-2	2
<i>Ichthyophthiriidae</i>	<i>I. multifiliis</i>	?	ImMTT2 ^a	1
Total	14	26	16	42

^aNew Cd- or CuMTs reported in this study. RS: riboset. ? : unknown

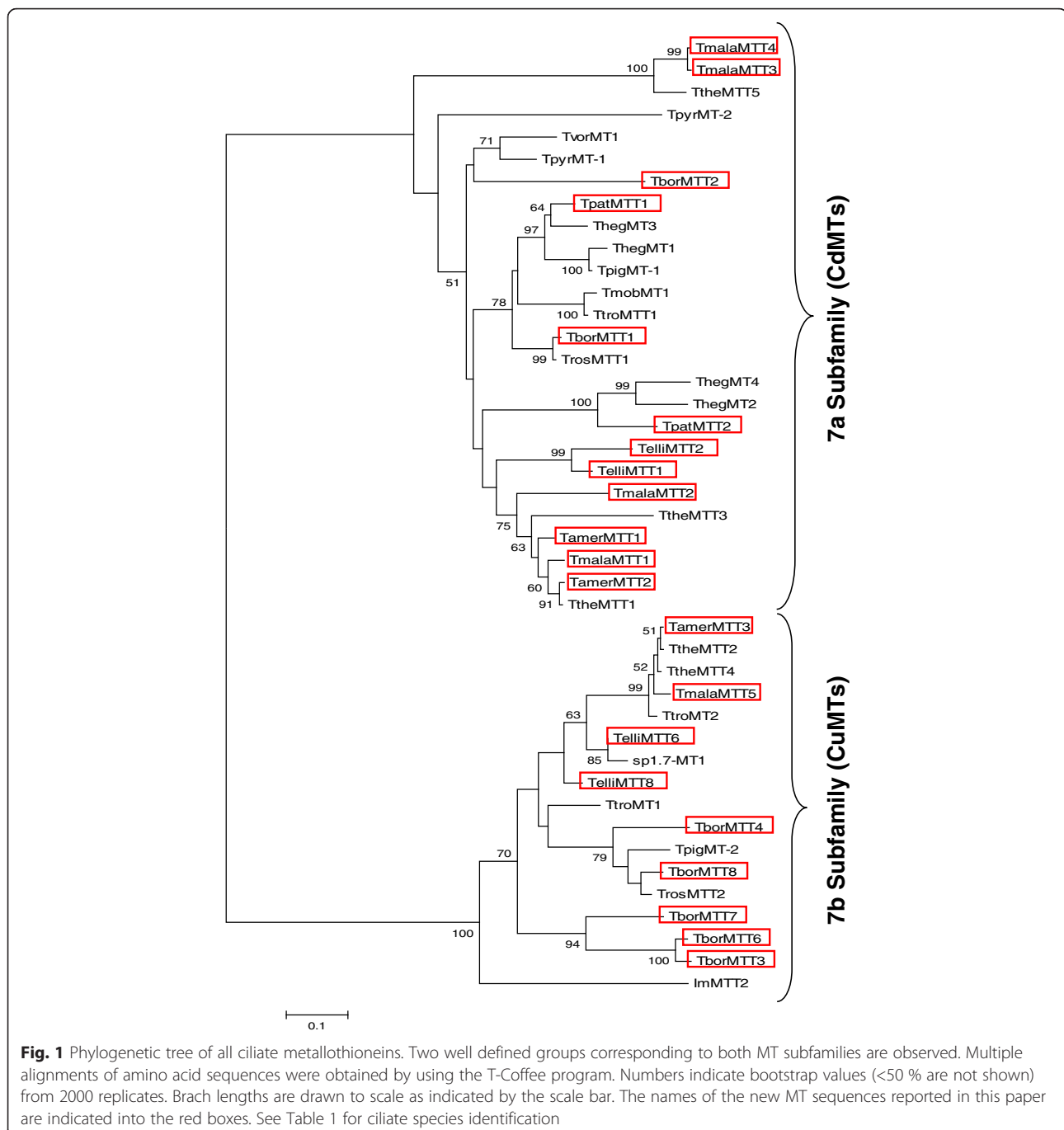
have been reported (Table 1). In the present study, we incorporated 12 new CdMT cDNA sequences (~46 % more) and 9 new CuMT cDNA sequences (~56 % more), so thereby considerably increasing our knowledge of these conserved genes. Also included in this analysis was a new CuMT sequence from the ciliate parasite (that causes white spot disease in fresh water fishes) *Ichthyophthirius multifiliis* (taxonomically related to *Tetrahymena*, because both are located in the same *Hymenostomatia* subclass), giving a total of 16 CuMT sequences considered in this study (Table 1). Of the new CdMT cDNA sequences, one (*TmalaMTT1*) is identical to the previously reported *TmalMT1*,

also isolated from the *T. malaccensis* [16]. However, in this putative cDNA [GenBank: HQ166894] 5' or 3'UTRs have not been reported, while our *TmalaMTT1* cDNA already presents both UTR regions [GenBank: KU167646].

Ciliate MTs (family 7) [18] have been divided into two subfamilies: 7a (CdMTs) and 7b (CuMTs) [19]. An updated phylogenetic tree drawn up to include the new inferred amino acid sequences from all the new ciliate MT genes (Fig. 1), confirms the previous classification into two large groups or subfamilies: CdMTs and CuMTs. This is due to the strict Cys residue patterns or modular configuration of these proteins in both MT groups (Figs. 2 and 3). Although the CuMT sequence from *I. multifiliis* (ImMTT2) is clearly separated from the rest of the *Tetrahymena* CuMTs, it is completely integrated in the CuMT group or subfamily (Fig. 1). In general, MTs from the same *Tetrahymena* species are located close together in the tree, although this is not always the case. This may indicate a certain convergent evolution of these genes into the *Tetrahymena* genus, or a common ancestor gene structure which originated very similar proteins through the different *Tetrahymena* species.

Cysteine patterns

Cysteine (Cys) residues are the main amino acids in MT composition because they are the chelating points for metals, forming metal-thiolate clusters [29, 30]. The total amount of *Tetrahymena* MT Cys residues is considerable (up to 54 residues for CdMTs) (Table 2), due to the longer length of these molecules with respect to standard MTs. However, the average Cys percentage of these MTs lies within the average Cys percentage values for standard MTs (7–21 Cys residues) (Table 2). Traditional Cys (C) clusters appear in *Tetrahymena* CdMTs as in standard MTs, such as: XCCX (34.94 %), CXC (10.72 %) and XXCXX or non-clustered Cys (4.16 %) (Table 2). In addition, they have other Cys clusters that are almost exclusive to *Tetrahymena* CdMTs: CCC (32.44 %), CXCC (16.91 %) or CXCXC (0.83 %) (where "X" is any other amino acid different to Cys) (Table 2). These unusual Cys clusters also appear in the MTs of certain other organisms, such as the annelid *Eisenia foetida* (CCC) [GenBank: P81695], the yeast *Yarrowia lipolytica* (CCC) [GenBank: Q9HFD0], the arthropod *Callinectes sapidus* (CCC and CXCC) [GenBank: AAF08966], the mollusk *Crassostrea virginica* (CCC and CXCC) [GenBank: AAZ94898], the American lobster *Homarus americanus* (CXCC) [GenBank: P29499], the amphibious *Xenopus laevis* (CXCC) [GenBank: AAB60616], the yeast *Saccharomyces cerevisiae* (CXCXC) [GenBank: AAA66061], the nematode *Caenorhabditis elegans* (CXCXC) [GenBank: P17511] and the purple sea urchin *Stroglyocentrotus purpuratus* (CXCC) [GenBank: P04734]. In *Tetrahymena* CdMTs, CCC and XCCX are the most abundant clusters (Table 2). However, in ciliate CuMTs CCC, CXCC and CXCXC clusters are almost



absent (Table 2). On the other hand, the predominant cluster in these CuMTs is CXC (92.34 %), as in MTs from other organisms.

Another structural feature differentiating both *Tetrahymena* MT subfamilies is the relation between Lys and Cys residues along the polypeptide backbone. Lys residues also seem to have an important role in these proteins because Cys reactivity depends on the proximity of these basic amino acids. In ciliate CuMTs (subfamily

7b), as in mammalian MTs, Lys (K) residues are usually contiguous to Cys residues. Furthermore, the great majority of CXC motifs in CuMTs are CKC clusters (Fig. 2). On the other hand, in *Tetrahymena* CdMTs (subfamily 7a) the CKC clusters are less frequent and normally limited to the C-terminal regions of the type 2 submodules (Fig. 3). At physiological pH, Lys residues are positively charged, and it has been reported [31] that the presence of these adjacent basic residues considerably decreases

CuMTs		Length
TpigMT-2	MDTQTQTKLTTACKNPKCKOPLCKCGTTSAACNCQPCPE-----	38
TtheMTT2	MDTQTQTKVTVGCSNPKCKOPLCKCGTTAAACNCQPCPE-----	38
TtheMTT4	MDTQTQTKVTVGCSNPKCKOPLCKCGTTAAACNCQPCPE-----	38
TrosMTT2	MDTQTQTKLTTGCKNPKCKOPLCKCGTTAAACNCQPCPE-----	38
TtropMT1	MDTQTQTKLTVACKNPKCKOPLCKCGTTSAACNCQPCPE-----	38
TtropMT2	MDTQTQTKVTVGCSNPKCKOPLCKCGTTAAACNCQPCPE-----	38
sp1.7-MT1	MDTQTQTKLTVGCKNPKCKOPLCKCGTTSSNCQPCPE-----	38
TborMTT3	MDTQIQTKLTTGCSNPKCKOPLCKCATTSAACNCQASE-----	38
TborMTT4	MPTSFASVVP-----LPAACNCQPCPE-----	20
TborMTT6	MDTQIQTKLTTGCSNPKCKOPLCKCGTTSAACNCQASE-----	38
TborMTT7	MDTQTQTKLTSGTNPKCKOPLCKCGTTSAACNCQASV-----	38
TborMTT8	MDTQIQAKLTTGCKNPKCKOPLCKCGTTAAACNCQPCPE-----	38
TamerMTT3	MDTQTQTKVTVGCSNPKCKOPLCKCGTTAAACNCQPCPE-----	38
TelliMTT6	MDTQTQTKLTVGCKNPKCKOPLCKCGTTSSNCQPCPE-----	38
TelliMTT8	MDPQTQNKLTGCKNPKCKOPLCKCGTTSAACNCQPCPE-----	38
TmalamTT5	MDTQTQTKVTVGCSNPKCKOPLCKCGTTAAACNCQPCPE-----	38
ImMTT2	MESLSK---TAAACKNPKCNPKCKCGTTAKNKNNCQCNPKCKGTTAAACKNPKCGNPKCKGTTAAQC	64
TpigMT-2	NCDPCSNNPKCKGTSACKNPKCKCTDCKCAA-----	32
TtheMTT2	NCDPCSNNPKCKGATESCGNPKCKAECKGSSITEK-----	36
TtheMTT4	NCDPCSNNPKCKGVTESSCGNPKCKAECKGSSITEK-----	36
TrosMTT2	NCDPCNPNPKCKGVSDGCKNPKCKADCKCT-----	31
TtropMT1	NCDPCSNNPKCKGTSSEACKNPKCKAECKGSSATDK-----	36
TtropMT2	NCDPCSNNPKCKGVTESSCGNPKCKAECKGSSITEK-----	36
sp1.7-MT1	NCDPCSNNPKCKGATESCGNPKCKAECKCTIAVK-----	36
TborMTT3	NSDACANPKCKGVSGTCKNPKCKOVDCKCGTASQNVGCKCDTCAKNPKCKGVSDAQCNTPCKCKGD	67
TborMTT4	NCDPCNPNPKCKGVSDGCKNPKCKADCKCT-----	31
TborMTT6	NSDACTNNPKCKGVSGTCKNPKCKGVSDGCKNPKCKADCKCT-----	67
TborMTT7	DNEACSNPKCKGVTESSCGNPKCKGDCRKGAVSVTAGCKNPKCKGVSDAQCNTPCKCKGD	67
TborMTT8	NCDPCNPNPKCKGVSDGCKNPKCKADCKCT-----	31
TamerMTT3	NCDPCSNNPKCKGATESCGNPKCKAECKGSSITEK-----	36
TelliMTT6	NCDPCSNNPKCKGATESCGNPKCKAECKGTHDVKTSACKCDPCSNNPKCKGVTSQCNTPCKCAE	67
TelliMTT8	NCDPCSNNPKCKGATENCQCNPKCKAECKGTHAAK-----	36
TmalamTT5	NCDPCSNNPKCKGATESCGNPKCKAECKGSSIAEK-----	36
ImMTT2	NCTNCCNPKCKGTTAAQCKNPKCKGNPKCKGTTAAQ-----NCTNCCNPKCKG	49
TpigMT-2	-----SAGCKSPNCTDCKTGTESCKC-----OKQ	26
TtheMTT2	-----TSACKNPKCACNPKCKGTSNCKNPKCKAECKCK	34
TtheMTT4	-----TSACKNPKCACNPKCKGTSNCKNPKCKAECKCK	34
TrosMTT2	-----GTXSKC-----OKK	9
TtropMT1	-----STACKNPKCACTECCNCGATSN-----CKC-----OKQ	26
TtropMT2	-----TSACKNPKCACNPKCKGTSNCKNPKCKAECKCK	34
sp1.7-MT1	-----TSACKCDPCSNNPKCKGVTSQCNTPCKCAECKCK	34
TborMTT3	CKCGSVSQTAGCKNPKCTNCKGVSSASCKNPKCKADCKCKSGSESCKC-----OKQ	53
TborMTT4	-----GTESCKC-----OKN	9
TborMTT6	CKCGSVSQTAGCKNPKCTNCKGVSSASCKNPKCKVDCCKSGSESCKC-----OKQ	53
TborMTT7	CKCGTVSQATVCGCKNPKCTNPKCKGVSSASCKNPKCKGANCKNS	44
TborMTT8	-----GTESCKC-----OKN	9
TamerMTT3	-----TSACKNPKCACNPKCKGTSNCKNPKCKAECKCK	33
TelliMTT6	CKCGTISASTSACKNPKCTNPKCKGVTSNCKNPKCKGSECKCK	43
TelliMTT8	-----TSACKNPKCGSECKCK	16
TmalamTT5	-----TSTCKNPKCTNPKCKGTSNCKNPKCKAECKCK	34
ImMTT2	-----TTAQCKNPKCKGNPKCKGTTAAQCNCTNCCNPKCKGTTDNCCKGNGCCNPKCK	54

Fig. 2 Molecular structure of subfamily 7b (CuMTs). Multiple alignments were made using the T-Coffee program, followed by visual inspection and manual adjustment. The new CuMT sequences reported in this paper are indicated with colored (orange) names. Yellow shaded regions indicate conserved Cys (C) residues. Blue and grey shaded regions indicate Lys (K) or Gln (Q) residues, respectively. His (H) residues are indicated by red shading. See the text for further explanation

the pK value thus decreasing the reactivity of Cys residues. Therefore, it is possible that *Tetrahymena* CuMTs may have a certain metal buffering capacity that differs from the one theoretically assigned to them.

Modular/submodular structure of the subfamily 7a (CdMTs)

The highly conserved Cys residue locations in *Tetrahymena* CdMT sequences define a strict modular/submodular structure in all of these proteins [19] (Fig. 3).

Each module was initially defined by the rule that every segment (with several exceptions) carries a CXCCX motif at its C-terminus, the last “X” being a Lys (K) or Glutamine (Q) residue (Fig. 3). Module lengths vary from 32 to 63 amino acids and are separated by linkers of 2–9 amino acids (Fig. 3). The number of modules per MT molecule is from 2 to 5, so at present 9 CdMTs have only two modules (bi-modular structure): TpyrMT-1, TtheMTT5, TrosMTT1, TpigMT-1, ThegMT1, TborMTT1, TmalamTT4, TpatMTT1 and TamerMTT1. The majority (13)

CdMTs	-----Module-----				Length	
	Module	Linker	Submodule type 1	Submodule type 1		Submodule type 2
TpigMT-1	mod 1	MDKQ---T	CCCGENAKPCCFDPSNG	CCSSKTNKCCSDTKE	CCSG-DQENGKCTSKKCOO	59
TpyrMT-1	mod 1	MDKVN---N	CCCGENAKPCCDTPNSG	CCCVSETNNCCSDRKE	CCGTG-TG--EGKCTGKCKCE	59
TpyrMT-2	mod 1	MDKVN---N	CCCVESTOTCCSGVASC	-----	-----CCQTNCCCK	35
TheMTT1	mod 1	MDKVN---S	CCCGVNAKPCCTDPSNG	CCCVSKTDNCCSDTKE	CCGTG-TG--EGKCVNCKCKC	58
TheMTT3	mod 1	MDKIN---N	SCCGENTKPCCTDLNRQ	CNCAKTDNCCKPEPNE	CCTD-TL--EGKCVDCCKCK	58
TheMTT5	mod 1	MDKIS---S	---GESTKIGSKTEEKW	CCCPSETQNCNSDDKKQ	CCVG-SG--EGKIYVCCCKCK	54
TtroMTT1	mod 1	MDKN---S	CCCGENAKPCCDTPNSG	CCSSKTNKCCSDTKE	CCGTG-TG--FGKCTSKCKCK	57
TmobMT1	mod 1	MDKV---T	CCCGENAKPCCDTPNSG	CCSSKTNKCCSDTKE	CCGTG-TG--GGKCTGCKCKE	57
TvorMT1	mod 1	MDKVS---N	CCCGENAKPCCDTPNSG	CCCVSKTNKCCSDTKE	CCTNKTG--EGKCTGCKCKE	60
ThegMT1	mod 1	MDKVENKOT	CCCGENAKPCCFDPSNG	CCSSKEDNCCSDTKE	CCSG-DKQENGKCTSKKCOO	63
ThegMT2	mod 1	MDKVDNKT	CCCGENAKPCCFDPRTG	CSCASKDNNCCSTENQ-	-----GNCKNCLCOO	52
ThegMT3	mod 1	MDKVN---N	CCCGENAKPCCDTPNSG	CCSSKDNKCCADTKE	CCDGNKQ--GKCTSKCKCE	62
ThegMT4	mod 1	MDKV---KOT	CCCGENAKPCCFDPRSG	CCSSKDNKCC-----	-----TDKSGKGNCKNCKCOO	52
TborMTT1	mod 1	MDKN---S	CCCGENAKPCCDTPNSG	CCSSKTNKCCSDTKE	CCGTG-TG--FGKCTSKCKCK	57
TborMTT2	mod 1	MDTVN---QK	-ECSSGKTCCNDPCKQ	CCCVSKEDSCKTNTKQ	CCSSSTE--SKCTSKCKCK	58
TelliMTT1	mod 1	MDKVS---K	CCCGVNAKPCCTDPSNG	CCCVSKTDNCCSDTKE	CCGTG-TG--EGKCTSKCKCK	58
TelliMTT2	mod 1	MDKVS---K	CCCGVNAKPCCTDPSNG	CCSSKTNKCCSDTKE	-----ECQNKCKCK	49
TmalaMTT1	mod 1	MDKVN---N	CCCGENAKPCCDTPNSG	CCCVSTNNCCSDTKE	CCGTG-TG--EGKCVNCKCKC	58
TmalaMTT2	mod 1	MDKVN---N	CCGLNANLCCDTPNIG	CCYASKTDNCCNDTKE	CCGTG-TE--IEGKCKINCTCK	59
TmalaMTT3	mod 1	MDKTS---S	---ESSKTCCKTEEKW	CCCPSETQNCNSDDKKQ	CCVG-EG--EGKIYVCCCKCK	54
TmalaMTT4	mod 1	MDKTS---S	---ESSKTCCKTEEKW	CCCPSETQNCNSEGKQ	CCVG-QG--EGKIYVCCCKCK	54
TpatMTT1	mod 1	MDKQ---T	CCCGENAKPCCDTPNSG	CCSSKDNKCCSDTKE	CCGTG-DNQ-SGKCTSKCKCOO	59
TpatMTT2	mod 1	MDKQ---T	CCCGENAKPCCDTPNSG	CCSSKDNKCCSDTKE	N-----KDNCKNCKCOO	52
TamerMTT1	mod 1	MDKVN---S	CCCGVNAKPCCTDPSNG	CCCVSKTNKCCSDTKE	CCGTG-TG--EGKCTSKCKCK	58
TamerMTT2	mod 1	MDKVN---S	CCCGVNAKPCCTDPSNG	CCCVSKTDNCCSDTKE	CCGTG-TG--EGKCVNCKCKCK	53
TpigMT-1	mod 2	---PTKAT	CCCGDKAKPCCDTPNSG	CCSSKDNKCCSDTKE	CCDGD--KSVDAKCKRTCTCOO	59
TpyrMT-1	mod 2	---PAKSG	CCCGDKAKPCCDTPNSG	CCSSKTNKCCSDTKE	-----ECQTECKCK	48
TpyrMT-2	mod 2	---KTVSN-	CCCAQNIKCCSSSNEG	-----	-----CKCTNCCCK	33
TheMTT1	mod 2	---FOAN	CCCGVNAKPCCTDPSNG	CCCVSKTNKCCSDTKE	CCGTG-TG--EGKCTSKCKCK	56
TheMTT3	mod 2	---SIVT	CCCGVNAKPCCTDPSNG	YCAASKTDNCCSDTKE	CCGTG-TE--EGKCTNCCQYK	56
TheMTT5	mod 2	---VQAE	CCCGENAKPCCTDPSNG	NCVYKTFKFSKSDSKE	CCPGGKQ	45
TtroMTT1	mod 2	---PAT	CCCGDKAKPCCDTPNSG	CCCVSKTNKCCSDTKE	CCGTG-TGDA--CKCTGQCCCKQ	56
TtroMTT2	mod 2	---PVKAD	CCCGVNAKPCCTDPSNG	CCSSKTNKCCSDTKE	CCGTG-TGQ--GGKCTGCKCKE	57
TmobMT1	mod 2	---PVKAD	CCCGVNAKPCCTDPSNG	CCSSKTNKCCSDTKE	CCGTG-TGQ--GGKCTGCKCKE	57
TvorMT1	mod 2	---EPVSVKADQ	CCCGDKAKPCCDTPNSG	CCCVSKTNKCCSDTKE	CCTNKTG--EGKCTGCECOO	61
ThegMT1	mod 2	---PTKAI	CCCGDKAKPCCDTPNSG	CCSSKDNKCCSDTKE	CCDGDK--KCKRTCTCOO	59
ThegMT2	mod 2	---PTNKT	CCCGDKAKPCCDTPNSG	CSCASKDNNCCSTENKQ	-----TCNKL-QO	48
ThegMT3	mod 2	---PTKAT	CCCGDKAKPCCDTPNSG	CCSSKDNKCCSDTKE	CCDGDN--EGKCTSKCKCE	58
ThegMT4	mod 2	---PTKNT	CCCGDKAKPCCDTPNSG	CSCATKSNCCSTENKQ	-----TCNKL-QO	46
TborMTT1	mod 2	---PQAA	CCCAAPNTKCCDPPNCG	CKANKANNCCCKGDSK	CCCKITGKE--CKCTDCECK	57
TelliMTT1	mod 2	---PQOQG	CCCGDKAKPCCDTPNSG	CCSSKTNKCCSDSCK	-----ECQNKCKCE	48
TelliMTT2	mod 2	---PQOQG	CCCGDKAKPCCDTPNSG	CCSSKTNKCCSDSCK	-----ECQNKCKCE	48
TmalaMTT1	mod 2	---FOAT-	CCCGVNAKPCCTDPSNG	CCCVSKTNKCCSDTKE	CCGTG-TG--EGKCTSKCKCK	56
TmalaMTT2	mod 2	---FOATT	CCCGVNAKPCCTDPSNG	CCCVSKANNCCSDTKE	---YTGSA--EGSKTNLCOO	55
TmalaMTT3	mod 2	---VQAE	CCCGENAKPCCTDPSNG	NCVYKTFKFSKSDSKE	CCPGGKQ	39
TmalaMTT4	mod 2	---AQAE	CCCGENAKPCCTDPSNG	NCVYKTFKFSKSDSKE	CCPGGKQ	45
TpatMTT1	mod 2	---PTKAT	CCCGDKAKPCCDTPNSG	CCSSKDNKCCSDTKE	CCTEEGQNA--KCKTCCOCC	58
TpatMTT2	mod 2	---PSQNTT	CCCGDKAKPCCDTPNSG	CSCADKNDCCSTENKQ	-----TCNKL-QO	48
TamerMTT1	mod 2	---PVOQG	CCCGDKAKPCCDTPNSG	CCSSKTNKCCSDTKE	-----ECQTECKCK	48
TamerMTT2	mod 2	---FOAN-	CCCGVNAKPCCTDPSNG	CCCVSKTNKCCSDTKE	CCGTG-TG--EGKCTSKCKCK	56
TpyrMT-2	mod 3	---DNKTI	CCCSQNNKCCSNSNEE	-----	-----CKCTNCCCK	32
TheMTT1	mod 3	---PVOQG	CCCGDKAKPCCDTPNSG	CCSSKTNKCCSDTKE	-----ECQTECKCK	48
TheMTT3	mod 3	---AQOQG	CCCGDKAKPCCDTPNSG	CCSSKTNKCCSDTKE	-----ECQTECKCK	48
TtroMTT1	mod 3	---PVOAG	CCCGDKAKPCCDTPNSG	CCSSKTNKCCSDTKE	-----DTECECK	42
TmobMT1	mod 3	---PVOAG	CCCGDKAKPCCDTPNSG	CCSSKTNKCCSDTKE	CCGTG-TGKD--CKCTGCECKK	58
TvorMT1	mod 3	---EVTG	CCCGDKAKPCCDTPNSG	CCSSKTNKCCSDTKE	-----ECQTECKCK	48
ThegMT2	mod 3	---TT	CCCGDKAKPCCDTPNSG	CSCASKDNNCCSTENKQ	-----TCNKL-QO	44
ThegMT3	mod 3	---PTKAT	CCCGDKAKPCCDTPNSG	CCSSKDNKCCSDTKE	CCDGNKQ--GKCTSKCKCE	58
ThegMT4	mod 3	---CQOTT	CCCGDKAKPCCDTPNSG	CSCATKSNCCSTENKGT	-----CQNKCCOQ	48
TborMTT2	mod 3	---PVOAG	CCCGDKAKPCCDTPNSG	CCSSKTNKCCSDTKE	-----ECQTECKCK	48
TelliMTT1	mod 3	---PEOQG	CCCGDKAKPCCDTPNSG	CCSSKTNKCCSDSCK	-----ECQNKCKCE	48
TelliMTT2	mod 3	---PEOQG	CCCGDKAKPCCDTPNSG	CCSSKTNKCCSDSCK	-----ECQNKCKCE	48
TmalaMTT1	mod 3	---PAQTG	CCCGDKAKPCCDTPNSG	CCSSKTNKCCSDTKE	-----ECQTECKCK	48
TmalaMTT2	mod 3	---PSQSG	CCCGDKAKPCCDTPNSG	CCSSKTNKCCSDTKE	-----ECQTECKCK	48
TmalaMTT3	mod 3	---TEEKW	-----	CCCPSETQNCNSDDKKQ	CCVGQEGE--KIYVCCCKCK	41
TpatMTT2	mod 3	---TT	CCCGDKAKPCCDTPNSG	CSCADKNDCCSTENKQ	-----DNKTKCKNCKCOO	48
TamerMTT2	mod 3	---PVOQG	CCCGDKAKPCCDTPNSG	CCSSKTNKCCSDTKE	-----ECQTECKCK	48
TpyrMT-2	mod 4	---TETKSN	CCCSQNNKCCGKKNQ	-----	-----CTCQNCNCK	33
ThegMT2	mod 4	---TT	CCCGDKAKPCCDTPNSG	CSCASKDNNCCSDTKE	-----KNNCKNCKCOO	47
ThegMT4	mod 4	---NT	CCCGDKAKPCCDTPNSG	CSCASKDNNCCSDTKE	-----KNNCKNCKCOO	47
TmalaMTT3	mod 4	---AQAE	CCCGENAKPCCTDPSNG	NCVYKTFKFSKSDSKE	CCPGGKQ	45
TpyrMT-2	mod 5	---QVQVG	CCCGDKAKPCCDTPNSG	CCSSKTNKCCSDTKE	-----CQDTECKCK	48

Consensus X₂₋₉ C₂₋₃X₆C₁₋₂X₆ C₂₋₃X₆C₁₋₂X₆ C₂X₆₋₈+CX₆XC₁₋₂X₆C₁₋₂X₁₋₂
 sm1 sm1 ½ sm1 + C-ter = sm2

Fig. 3 Modular structure of subfamily 7a (CdMTs). Multiple alignments were made using the T-Coffee program, followed by visual inspection and manual adjustment. The new CdMT sequences reported in this paper are indicated with colored (orange) names. Yellow shaded regions indicate conserved Cys (C) residues. Blue and grey shaded regions indicate Lys (K) or Gln (Q) residues, respectively. His (H) residues are indicated by red shading. sm1: submodule-1, sm2: submodule-2. See the text for further explanation

have a tri-modular structure: TheMTT1, TheMTT3, TtroMTT1, TvorMT1, TmobMT1, ThegMT3, TborMTT2, TelliMTT1, TelliMTT2, TmalaMTT1, TmalaMTT2, TpatMTT2 and TamerMTT2; only 3 of them (TmalaMTT3, ThegMT2 and ThegMT4) have four modules (tetra-modular), and only one (TpyrMT-2) has five modules (penta-modular) (Fig. 3). As shown in Fig. 4, the 18S rRNA phylogenetic tree of the 13 *Tetrahymena* species analysed

separates them into *Borealis* and *Australis* groups. Although the species analyzed from the *Australis* group are still scarce, we detect a certain tendency towards a CdMT tri-modular structure in the *Borealis* group species with respect to the *Australis* group (Fig. 4). This could mean that the CdMT tri-modular structure might be more similar to the ancestral CdMT common structure for the *Tetrahymena* genus.

Table 2 Distribution of Cys clusters among *Tetrahymena* MTs

CdMT	CCC	CXCC	CXCXC	XCCX	CXC	XXCXX	Total Cys	% Cys ^(a)	Length
TpigMT-1	4	2	0	6	2	0	34	28.81	118
TpyrMT-1	4	2	0	5	1	1	31	28.97	107
TpyrMT-2	6	5	0	6	4	1	54	29.83	181
TtheMTT1	6	3	0	8	2	1	48	29.63	162
TtheMTT3	2	2	1	9	3	3	42	25.93	162
TtheMTT5	1	1	0	5	1	6	24	24.24	99
TrosMTT1	4	2	0	6	2	0	34	30.09	113
TtroMTT1	6	3	0	8	2	0	47	30.13	156
TmobMT1	6	3	0	9	3	0	51	29.65	172
TvorMT1	6	3	0	8	2	1	48	28.40	169
ThegMT1	4	2	0	6	2	0	34	27.87	122
ThegMT2	4	1	0	8	7	4	49	25.65	191
ThegMT3	6	3	0	9	3	0	51	28.65	178
ThegMT4	5	1	0	8	6	4	50	25.91	193
TborMTT1	4	2	0	6	2	0	34	30.09	113
TborMTT2	5	2	2	9	1	2	49	30.06	163
TelliMTT1	6	3	0	7	1	2	45	29.22	154
TelliMTT2	6	3	0	6	0	3	42	28.97	145
TmalaMTT1	6	3	0	8	2	1	48	29.63	162
TmalaMTT2	5	3	0	8	1	2	44	27.16	162
TmalaMTT3	2	2	0	12	2	6	46	25.70	179
TmalaMTT4	1	1	0	7	1	3	25	25.25	99
TpatMTT1	4	2	0	6	2	0	34	29.06	117
TpatMTT2	4	2	0	6	3	3	39	26.35	148
TamerMTT1	4	2	0	5	1	1	31	29.25	106
TamerMTT2	6	3	0	8	2	1	48	30.57	157
Total Cys ^(b)	351	183	9	378	116	45	1082	28.27	147
% Cys ^(c)	32.4	16.9	0.8	34.9	10.7	4.1	100		
CuMT									
TpigMT-2	0	0	0	1	12	2	28	29.17	
TtheMTT2	0	0	0	0	15	2	32	29.63	96
TtheMTT4	0	0	0	0	15	2	32	29.63	108
TrosMTT2	0	0	0	1	9	2	22	28.21	108
TtroMT1	0	0	0	1	12	2	28	28.00	78
TtroMT2	0	0	0	0	15	2	32	26.63	100
sp1.7-MT1	0	1	0	0	14	1	32	26.63	108
TelliMTT6	0	0	0	0	21	2	44	29.73	108
TelliMTT8	0	0	0	0	12	2	26	28.89	148
TmalaMTT5	0	0	0	0	15	2	32	29.63	90
TborMTT3	0	0	0	1	21	0	44	27.85	108
TborMTT4	0	0	0	1	6	2	16	26.67	158
TborMTT6	0	0	0	1	21	0	44	27.85	60
TborMTT7	0	0	0	0	21	0	42	28.19	158
TborMTT8	0	0	0	1	9	2	22	28.21	149

Table 2 Distribution of Cys clusters among *Tetrahymena* MTs (Continued)

TamerMTT3	0	0	0	0	14	3	31	28.97	78
ImMTT2	0	0	0	0	27	0	54	32.34	107
Total Cys ^(b)	0	3	0	14	518	26	561	28.60	167
% Cys ^(c)	0	0.5	0	2.5	92.3	4.6	100		113

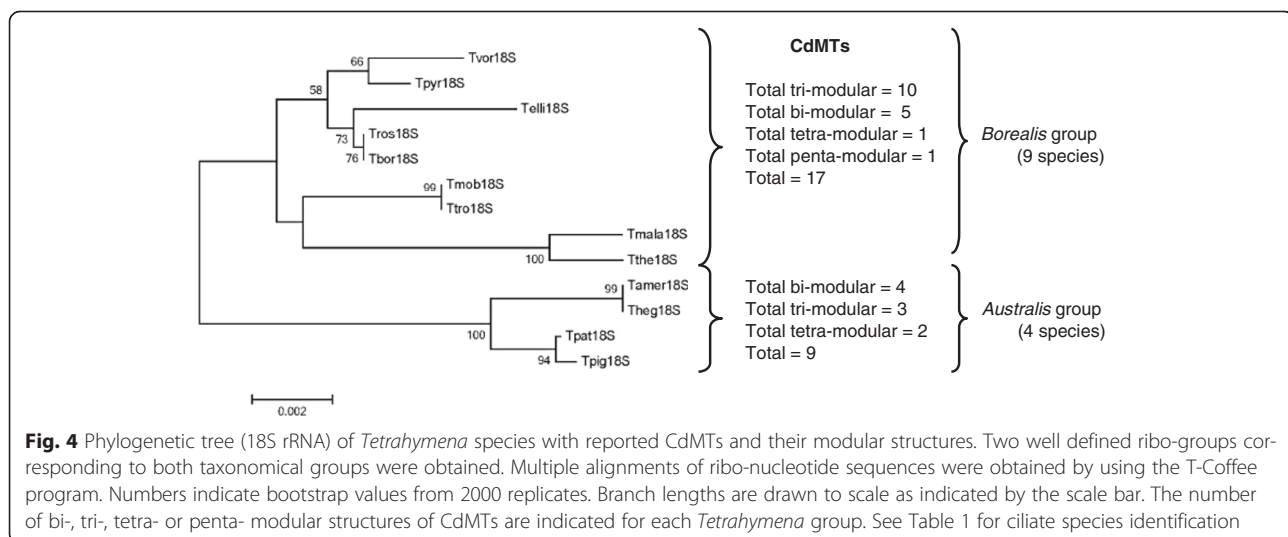
New MTs reported in this study are in bold text. A cluster is defined as any group of contiguous residues in which any two Cys residues are separated from one another by, at most, any other amino acid (X). ^(a) Percentage of Cys residues in the complete MT. ^(b) Total Cys residues/cluster type. ^(c) Percentage of Cys residues/cluster type

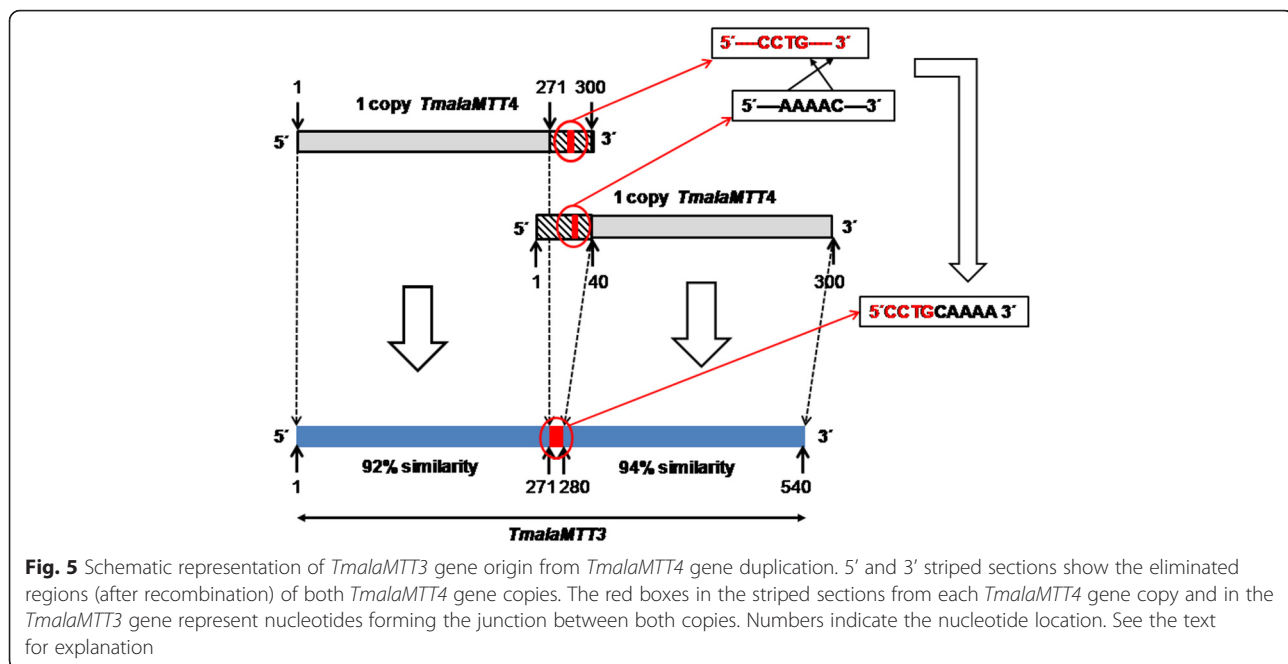
These modules are made up of two types of submodules: Type 1 submodules (sm1) have the consensus sequence $C_{2-3}X_6C_{1-2}X_6$ (with few exceptions), while complete Type 2 submodules (sm2) can be represented as $C_2X_{6-8} + CXCXXC_{1-2}XXC_{1-2}X_{1-2}$ (Fig. 3). Sm2 represents approximately the final half of the Type 1 submodules (C_2X_{6-8}), plus a quite conserved C-terminal region, where the last “X” is K (Lys) ~ 55 %, Q (Gln) ~ 36 %, E (Glu) ~ 7 % or N (Asn) ~ 1.5 %. Approximately 47 % of sm2 are incomplete; 42 % only present the C-terminal region, while ~ 5 % of them have only half the sm1 ($\frac{1}{2}$ sm1) (Fig. 3). In most cases (~54 %), these modules are made up of two complete sm1 and one complete sm2, but a ~ 34 % of them present incomplete modules, such as TpyrMT-2 (with four modules formed by only one sm1 and half of sm2). Despite the fact that *Tetrahymena* CuMTs do not present such clear modular structure, their consensus sequence CKCX₂₋₅CXC is repeated multiple times (where in a few cases Lys (K) may be substituted by another amino acid) (Fig. 2). Therefore, a structural organization based on these repeats should also be considered [13].

Gene duplication is one of the main phases in the generation and evolution of new genes and seems to be the main mechanism involved in the evolution of these

proteins, as several authors have noted [32–34]. Given the clear modular structure of *Tetrahymena* CdMTs and the highly conserved Cys repeats in both subfamilies, we might suppose that successive gene duplication events and subsequent specialization could be the main mechanisms involved in the evolution of these ciliate MTs. Therefore, the gene duplication hypothesis, already considered for *Tetrahymena* MTs [12, 13, 19, 26, 27], is the most credible mechanism for explaining the evolution of these proteins. A model that attempts to explain the evolutionary history of *Tetrahymena* MTs has been described in [12]. It is based on the hypothesis that both MT subfamilies were constructed from an ancestral module, containing the C_3X_6 motif (half of sm1), which was duplicated many times as a result of episodes of gradual environmental pollution. Therefore, both paralog duplications into the same species (several CdMT or CuMT gene isoforms are present in each species) and many orthologs could have been created in different related *Tetrahymena* species, giving rise to those MT isoforms that are currently known to us.

An example of a probable semi-complete duplication of a CdMT gene originating a new CdMT isoform in the same species, can be observed in CdMT genes from *T. malaccensis* (Fig. 5). Two copies of the *TmalaMTT4* gene isoform





(300 bp of length) seem to have been involved in the creation of the *TmalaMTT3* gene (540 bp). A recombination process seems to have occurred between a 29 bp region from the 3' end of one *TmalaMTT4* gene copy and a 40 bp region from the 5' end of a second copy of this same gene, together with the elimination of 60 bp from both gene copies, resulting in the origination of the junction area (9 bp) between both *TmalaMTT4* gene copies (Fig. 5). This 9 bp new sequence is formed by four nucleotides from one *TmalaMTT4* copy (3' end) and 5 inverted nucleotides from the other gene copy (5' end). Therefore, the *TmalaMTT3* gene is composed of a first uncompleted copy (271 bp) of the *TmalaMTT4* gene, a junction region (9 bp) originated after recombination and elimination, and a second uncompleted copy (260 bp) of the *TmalaMTT4* gene (Fig. 5). Through evolution, these uncompleted *TmalaMTT4* copies have suffered some degree of gene diversification, so each of them currently presents 92 and 94 % identity, respectively, with respect to the corresponding section of the original *TmalaMTT4* gene sequence (Fig. 5).

Asymmetry of the codon usage for glutamine residues: phylogenetic implications

Glutamines (Q) are important residues for MTs because they are also involved in stabilizing the metal-protein complex [35]. Ciliates use a particular genetic code, because the UAA and UAG codons, which are universal stop codons in many organisms, codify the amino acid glutamine (Gln), UGA being the only stop codon used by these eukaryotic microorganisms (barring some exceptions) [36, 37]. Almost all ciliate MTs (except TpyrMT-1) contain Q residues (from 2 in TborMTT4 to 17 in ThegMT-4) (Table 3). In general,

Tetrahymena CdMTs have more Q residues than CuMTs (Table 3). In a previous study [12] it was hypothesized that Gln residues were only codified by CAA codons in *Tetrahymena* CuMTs. However, after analyzing 10 new ciliate CuMTs, we have detected that this is not necessarily the case. Although the universal CAA codon is predominant in CuMTs (61.32 %), it is not the only one encoding Gln (29.24 % UAA, 7.55 % UAG and 1.89 % CAG) (Table 3). On the other hand, *Tetrahymena* CdMTs mainly use the UAA codon to codify this amino acid (53.93 %), together with other codons (29.21 % CAA; 17.17 % UAG and 1.69 % CAG) (Table 3). Moreover, in CdMTs these UAA codons are primarily located in liker regions (30.3 %) and at the end of sm2 (40.5 %). The total ratio of non-canonical (UAA + UAG)/canonical (CAA + CAG) Gln codons for *Tetrahymena* CdMTs is $123/55 = 2.23$ (that is, almost twice as many non-canonical as canonical codons). The opposite is true for CuMTs, however, where this ratio is $39/67 = 0.58$ or the inverse $67/39 = 1.71$ (almost twice as many canonical as non-canonical codons). Interestingly, only two CdMTs sequences (TtheMTT3 and ThegMT4) use the four possible Gln codons (Table 3). This drastic asymmetry in codon usage for Gln residues again corroborates the fact that *Tetrahymena* CuMTs are more similar to standard MTs. Likewise, it shows another important difference between both MT subfamilies.

From a phylogenetic point of view, which we reported in a previous review article [12], it seems CuMTs are diverged earlier than CdMTs as it has been reported that rather than resulting from a single ancient event, these genetic code deviations arose independently several times within the phylum Ciliophora [36, 37]. Also, if

Table 3 Distribution of glutamine codons in both ciliate MT subfamilies

CdMT	Glutamine codons				Total
	CAA	UAA	UAG	CAG	
TpigMT-1	3	1	0	0	4
TpyrMT-1	0	0	0	0	0
TpyrMT-2	2	10	2	0	14
TtheMTT1	2	4	1	0	7
TtheMTT3	2	5	1	1	9
TtheMTT5	2	1	0	0	3
TrosMTT1	2	2	0	0	4
TtroMTT1	3	1	0	0	4
TmobMT1	4	1	0	0	5
TvorMT1	4	0	0	0	4
ThegMT1	2	2	0	0	4
ThegMT2	2	4	2	0	8
ThegMT3	1	3	0	1	5
ThegMT4	1	10	5	1	17
TborMTT1	2	4	0	0	6
TborMTT2	3	3	1	0	7
TelliMTT1	1	6	2	0	9
TelliMTT2	3	5	3	0	11
TmalaMTT1	1	5	1	0	7
TmalaMTT2	3	3	1	0	7
TmalaMTT3	2	5	0	0	7
TmalaMTT4	0	5	0	0	5
TpatMTT1	2	4	1	0	7
TpatMTT2	2	4	5	0	11
TamerMTT1	1	4	1	0	6
TamerMTT2	2	4	1	0	7
Total (%)^a	52 (29.21 %)	96 (53.93 %)	27 (15.17 %)	3 (1.69 %)	178 (100 %)
CuMT					
TpigMT-2	6	0	0	0	6
TtheMTT2	4	0	0	0	4
TtheMTT4	4	0	0	0	4
TrosMTT2	5	0	0	0	5
TtroMT1	5	0	0	1	6
TtroMT2	2	0	1	1	4
Sp1.7-MT1	3	2	2	0	7
TelliMTT6	5	1	0	0	6
TelliMTT8	3	2	0	0	5
TmalaMTT5	3	1	0	0	4
TborMTT3	4	7	2	0	13
TborMTT4	2	0	0	0	2
TborMTT6	4	7	2	0	13
TborMTT7	5	2	1	0	8
TborMTT8	5	0	0	0	5

Table 3 Distribution of glutamine codons in both ciliate MT subfamilies (*Continued*)

TamerMTT3	4	0	0	0	4
ImMTT2	1	9	0	0	10
Total (%)^a	65 (61.32 %)	31 (29.24 %)	8 (7.55 %)	2 (1.89 %)	106 (100 %)

New MTs reported in this study are in bold text.^a Total glutamine residues using a type of codon and percentage

these changes occurred in the tRNA(Gln) gene(s) of an ancestral ciliate using the standard genetic code, we would have to assume that *Tetrahymena* CuMTs appeared before CdMTs (which use mainly UAA codons). This agrees with the assumption, supported by several authors, that two early MT lineages (Cu and Zn thioneins) were already present in the early phases of eukaryotic evolution [32]. It appears that early on in evolution, the primary function of MTs was to bind to physiologically important or essential metals (such as Cu or Zn). Accordingly, the appearance and evolution of MTs was probably not dictated by Cd, although with the evolution of higher life forms, MTs became more indispensable for protecting against Cd and other non-essential metals than for performing other suggested functions [4].

Other interesting features of *Tetrahymena* MTs

Tetrahymena MTs are considerably longer (60–193 aa) than standard ones (25–82 aa). Of the ciliate CdMTs and CuMTs, the longest are ThegMT4 (193 aa) and ImMTT2 (167 aa) or TborMTT3 and TborMTT6 (158 aa each), respectively (Table 2). The length they reach is therefore more than double that of the longest standard MTs. Despite having the longest MTs and a higher number of Cys residues, the Cys % lies within the range for standard MTs (16–32 %) (Table 2). However, because of their greater amount of Cys residues, they present a higher theoretical metal binding capacity than standard MTs. The calculation of this theoretical metal binding capacity takes into consideration that all Cys residues in vertebrate MTs are involved in heavy metal binding; therefore, the stoichiometry is Cd₇(Cys)₂₀ for CdMTs and Cu₁₂(Cys)₂₀ for CuMTs [4]. The 3D structure analysis of several MTs corroborates this stoichiometry [38]. We can assume that this stoichiometry is also applicable to *Tetrahymena* MTs and have calculated the theoretical binding capacity for all of them (Additional file 1). The shortest *Tetrahymena* CdMTs (TtheMTT5 and TmalMTT4) (Table 2) are able to bind 8 or 9 Cd²⁺/molecule and up to 19 Cd²⁺/molecule (Additional file 1) in the case of TpyrMT-2, which is one of the longest CdMT (181 aa) with the highest amount of Cys residues (54 residues) (Table 2). The average amount of the theoretical Cd binding capacity of these CdMTs is about 15 Cd²⁺/molecule (Additional file 1), which is more than double that of standard MTs (7 Cd²⁺/molecule). Some of these data have

been corroborated experimentally; for instance: 12 Cd²⁺ per mole of protein or 11 Cd²⁺ per polypeptide for TpyrMT-1 [39]. Likewise, a stable in vitro Cd₁₆(Cys)₄₈ complex has been suggested [40] for TtheMTT1 (a similar value to the theoretical one assigned to this CdMT) (Additional file 1), and Cd₁₁(Cys)₃₂ complex has also been suggested [40] for the CuMT TtheMTT2, with a metal-to-Cys residue ratio of about 1:3 for both *T. thermophila* MTs. In addition, it was found that Cu²⁺ cannot replace Cd²⁺ from the Cd₁₆-TtheMTT1 complex, but Cu²⁺ can replace Cd²⁺ from the Cd₁₁-TtheMTT2 complex [40]. This confirms the classification of the TtheMTT1 and TtheMTT2 as CdMT and CuMT, respectively. More recently, we have analysed the metal binding preference and abilities of the five MT isoforms from *T. thermophila* by electrospray mass spectrometry, circular dichroism and UV–vis spectrophotometry [25]. We conclude that both CdMT isoforms (TtheMTT1 and TtheMTT5) which yield unique Cd₁₇- and Cd₈- complexes, respectively, are optimal for Cd²⁺ coordination, thus corroborating the theoretical metal binding capacity values obtained for these CdMTs (Additional file 1). The MTT3 isoform showed poor binding abilities with both Cd²⁺ and Cu⁺, and yielded the best result with Zn²⁺. Although this MT, also considered as a CdMT, has a theoretical metal binding capacity value of about 15, the two Histidine (His) residues present in the protein enhance the relative affinity for Zn²⁺ through their imidazol rings [41, 42] in comparison with Cd²⁺. His residues, the most frequent Zn ligands in metalloenzymes, are also present in MTs (1–4 residues/molecule) from a variety of species (bacteria, fungi, plants and animals), thus increasing the affinity for this essential metal. Of the *Tetrahymena* MTs, only two CdMTs (TtheMTT3 and TpatMTT2) (Fig. 3) contain His residues, while CuMTs contain nine isoforms with one or two His (Fig. 2), coinciding with the general knowledge that this amino acid is more abundant in CuMTs than in CdMTs. In addition, His residues have an important role in MT proteins as they stabilize the formation of metal-protein complexes [43]. Both *T. thermophila* CuMTs (TtheMTT2 and TtheMTT4 isoforms), were found to form homometallic Cu-complexes (mainly Cu₂₀-MT) [25], which coincides with the theoretical metal binding capacity value obtained (19 Cu ions/molecule) (Additional file 1). Zn-MT complexes were only found in TtheMTT4 (mainly Zn₁₀-MTT4) [25]. These CuMTs (TtheMTT2 and TtheMTT4) differ in only one relevant amino acid

position (Asn⁸⁹/Lys⁸⁹), and it is interesting how this amino acid position change increases the CuMT character (higher affinity for Cu ions) of TtheMTT2 (Asn) in relation to TtheMTT4 (Lys) [25]. This special feature has also been reported in snail MTs, balancing in favour of Zn/CdMTs (Lys) or CuMTs (Asn) [44].

Another peculiar characteristic of MTs (including those from *Tetrahymena*) is the large asymmetry in the ratio of specific amino acids, such as the positively charged amino acids Lys and Arg. There is a considerably higher use of Lys residues with respect to Arg residues, and this asymmetry (Lys >> Arg) appears in all reported MTs. In ciliate MTs the Arg residues are almost absent of the CdMTs, only two (TtheMTT3 and ThegMT2) present one Arg residue (Fig. 3), and only two CuMTs (TborMTT3 and ImMTT2) have Arg residues, with one and two residues, respectively (Fig. 2). The location of these Arg residues is the same as those of Lys residues in other ciliate MT sequences. These two positively charged amino acids (Lys and Arg) are mostly exposed to the protein surface and play important roles in protein stability by forming electrostatic interactions. Arginine forms a higher number of electrostatic interactions compared to lysine. Experiments carried out on the green fluorescent protein (GFP), after changing lysine for arginine on the protein surface and retaining protein activity, have shown that the GFP variant was relatively more stable compared to the control GFP (in the presence of urea, basic pH or ionic detergents), but the thermal stability of the protein was similar to the control [45]. On the other hand, proteins with elevated solubility, a higher expression and abundant intracellular levels have an increased ratio of Lys content to Arg content [46]. In general, MTs have large number of Lys residues and null or very few Arg residues per molecule, preferring higher solubility and the avoidance of protein aggregates to higher stability by forming a larger number of electrostatic interactions (salt-bridges or hydrogen bonds). This could therefore mean that the asymmetry (Lys >> Arg) reported in all MTs is a basic requirement for forming proteins with an elevated solubility and high intracellular level to respond to metal stress.

Analysis of *Tetrahymena* MT cDNAs

After comparing all new isolated cDNAs of putative MT genes with the genomic DNA from the corresponding *Tetrahymena* species, we confirmed that none of these genes have introns in their open reading frames, which is also the case in all previously reported *Tetrahymena* MT genes [13]. The absence of introns could be related to a faster gene response to different environmental stressors. The presence of introns can delay regulatory responses and they are selected against in genes with transcripts requiring rapid adjustment in order to survive environmental changes [47].

In general, the gene expression of *Tetrahymena* MT genes is very fast, as reported in a CdMT gene (*MT-1*) from *T. pigmentosa*, in which an approximately tenfold increase of this transcript was detected after 30 min Cd treatment [15]. An exception was reported in the gene isoform *MTT5* of *T. thermophila*, in which an intron was located in the 3'UTR of the corresponding cDNA. The existence of *MTT5* mRNAs with and without this intron supports the first case of alternative intron splicing reported in this ciliate [19]. In the *Tetrahymena* Comparative Database (Broad Institute, Cambridge, USA) the *MTT3* DNA sequence from *T. malaccensis* (registered as EIA_07390.2 hypothetical protein) shows a putative intron (60 nucleotides). After a more detailed analysis, we detected that the putative intron corresponds to the amino acid sequence of the second type 1 submodule from the second module, sequence that is quite conserved in almost all *Tetrahymena* CdMTs. The nucleotide sequence identified as an intron (EIA_07390.2) starts in GT and ends in AG (with a 68.3 % A + T), and therefore, it might be assumed that it would coincide with the ciliate consensus intron ends (5'GTAAG/TAG 3'). A similar situation in which no introns are observed is detected in *TamerMTT1* [KU052681] and *TpatMTT1* [KU167652] cDNAs. The GT pair corresponds to a Cys residue (tgt codon), while AG pair corresponds to Glu (E) residue (gag codon). The same occurs in the *TamerMTT1* and *TpatMTT1* CdMT sequences, but not in the rest of the *Tetrahymena* CdMTs, because the majority codon used for Glu residues is gaa. In addition, the A + T content of these regions has very similar values to the complete ORF sequences from all CdMTs reported to date (an average of 60.5 %). All of this corroborates that the putative intron reported in a CdMT from *T. malaccensis* (EIA_07390.2) is not a real intron but rather an error.

In general, MT genes are mainly regulated at transcriptional level [48]. As in a previous study using an *in silico* analysis [19], we identified several conserved motifs in both 5' and 3'UTR regions from the new isolated cDNA molecules, which may be related to the regulation of their gene expression and/or transcript processing. In the 5'UTR region or putative promoter we identified two types of motifs (Tables 4 and 5): a TATA box (TAATAA) with an average number of ≈ 3 motifs/cDNA in both Cd- and CuMTs, and motifs similar to MTCM1 [19] with an average number of ≈ 5 motifs/cDNA in CdMTs or ≈ 3 in CuMTs. This MTCM1 motif was identified in almost all *Tetrahymena* MT promoters (Tables 4 and 5), so these sequences might play an important role in the gene expression regulation of these MTs. Most MTCM1 motifs include the consensus sequence TGA(N)TCA or similar (where "N" means any nucleotide), which recalls to the sequence (TGA(G/C)TCA) binding the eukaryotic AP-1 transcription factors [49]. In *Saccharomyces cerevisiae* an AP-1

Table 4 Conserved motifs detected in 3' and 5' UTR regions of *Tetrahymena* CdMT genes

CdMT genes	5'UTR		3'UTR		Degradation signal (ATTTA)
	TATA box (TAATAA)	MTCM1 motif copies (canonical orientation)	Polyadenylation signals ATTAATA	AATAAAA	
<i>TelliMTT1^a</i>	6	GTT TGATTCAATCAAT TAT TCAGTCATGGGT CTG TGACTCATGAAT TTG TGACTCTTGATT	2	1	1
<i>TelliMTT2^a</i>	3	TGT TGAATCAGGCAA AT CAAACTCATGAAT TTG TGACTCTTGATT	2	1	2
<i>TmalaMTT1^a</i>	6	CTG TGATTCATGAAT TCAT TGAATCATTATT GAT TGACTCATGATT AAG TGAATCATGATT	2	1	0
<i>TmalaMTT2^a</i>	10	AACTAA CTCATGATT GCAAGACT TCATGATG	1	0	1
<i>TmalaMTT3^a</i>	0	?	2	3	1
<i>TmalaMTT4^a</i>	0	?	2	1	3
<i>TpatMTT1^a</i>	2	?	0	0	2
<i>TpatMTT2^a</i>	2	?	0	1	4
<i>TborMTT1^a</i>	3	ATCT TGATTAAATGATT CAG TGATTCATAAGC AAG TGATTCATGAAG AGGT TGATCATGAAC	0	0	1
<i>TborMTT2^a</i>	2	TATT TGATTCATTCTA TATT TGAATCATACTT TTTT TGAATCAACATAA GAT TGACTCATTCAAA TAG TGATTCATTAATT AAAT TCAATCAATCAA	0	2	1
<i>TamerMTT1^a</i>	2	?	2	1	1
<i>TamerMTT2^a</i>	?	?	2	0	1
<i>TtheMTT1</i>	2	ATG TGAATCATAAAT TTG TGATTCTTGAAAT GAT TGACTCATGATT (2) ^b ATG TGATTCTTGAAAT ACG TGATTCACGATT	2	1	1
<i>TtheMTT3</i>	2	ATG TGATTCTTGAAAT GACTAA TCAAGAGT	0	0	1
<i>TtheMTT5</i>	1	GTG TGATTCTTGAAAT ATG TGATTCATGAGT (2) ^b ATG TGAATCATGAGT GTG TGAATCATGAGT (4) ^b GAG TGAATCATGAGT (2) ^b GTG TGAATCATGAGG (2) ^b	0	2	4
<i>TpyrMT-1</i>	4	TAG TCATCATGAAT ATG TGATTCTTGAGC AAG TGATTCTTGAGC TAG TGATTCTTGAAAT AAG TGATTCTTGAGT AAG TGATTCTTGAGT	1	1	4

^aNew CdMT genes reported in this study. ^b Numbers in parenthesis indicate the copy number/motif. TCA and TGA trinucleotides are highlighted in blue and yellow to facilitate motif sequence comparisons and identifications of the AP-1 binding related element (TGANTCA). ? : unknown

Table 5 Conserved motifs described in 3' and 5'UTR regions of *Tetrahymena* CuMT genes

CuMT genes	5'UTR		3'UTR		Degradation signal (ATTTA)
	TATA box (TAATAA)	MTCM1 motif copies (canonical orientation)	Polyadenylation signals ATTTAA AATAA		
<i>TelliMTT6^a</i>	6	GAG TGA TTCT TGAGG	0	2	2
<i>TelliMTT8^a</i>	8	AACGAAC TCATGA AAT AGAAA ACTCATGAGT	1	2	1
<i>TmalaMTT5^a</i>	4	GTCT TCATCATTCA TT ATAT TGAATTTATCATT	0	1	2
<i>TborMTT3^a</i>	2	TATATTAT TCATGACC G TGA TCT TCATCAA A	3	2	2
<i>TborMTT4^a</i>	2	CAAAA ACTCATGAGC AGAT TCAATCATTAA C GTT TGATTCA GATAC AAT TCAATCATTACA	2	2	2
<i>TborMTT6^a</i>	6	ATTTGCAT TCATGATC AAT CAATTCAC TC CTTT CAATCAGCATA TATATTAT TCATGACC G TGATCTCAATCA	1	3	0
<i>TborMTT7^a</i>	1	TTAT TGATTTATGATA CTAAGACT TCATGACT	4	1	1
<i>TborMTT8^a</i>	1	AAT TCAATCATTACA CTAT TGAGTGATATTC GAG TGAATCTTGAGG AAAT TGATTCAAGATAA TGAGGCTCATGAT	2	2	2
<i>TamerMTT3^a</i>	0	?	0	2	2
<i>TtheMTT2</i>	1	AAT TCATATATGATA GAG TGATTCCTGAGG	?	?	?
<i>TtheMTT4</i>	3	ATTT TGATAATTGAAT CTAT TGATTCAAGAGT	?	?	?

^aNew CuMT genes described in this paper. TCA and TGA trinucleotides are highlighted in blue and yellow to facilitate motif sequence comparisons and identifications of the AP-1 binding related element (TGANTCA). ? : unknown

transcription factor (YAP-1) is involved in response to oxidative stress and metal resistance [50]. Transcription factors similar to AP-1 have been detected in the MT promoters of insects (*Drosophila melanogaster*) and mollusks (*Crassostrea virginica*) [51]. AP-1, also known as c-jun, is a member of the bZIP superfamily of eukaryotic DNA-binding transcription factors. In *T. thermophila* the number of MTCM1 motifs in the three CdMT putative promoters is correlated with the gene expression level of each gene therefore, the relative induction ranking of gene expression is: *TtheMTT5* >> *TtheMTT1* > *TtheMTT3* [19]. This motif is present 6 times in *TtheMTT1*, twice in *TtheMTT3* and 13 times in *TtheMTT5* promoter region (Table 4). The promoter of the *TtheMTT5* gene has a 416 bp tandem duplication (with 96 % identity to each other). Five copies of the MTCM1 motif are present in each duplication and another three copies are near to the start codon [19].

Quantitative gene expression analysis revealed that *TtheMTT5* is the gene most strongly induced by diverse environmental stressors (*TtheMTT5* >> *TtheMTT1* > *TtheMTT3*) [19]. The presence of the duplicated promoter region in *TtheMTT5* may be related to the high expression level of this CdMT gene when compared with the rest of *T. thermophila* CdMT genes. There is no direct and clear correlation between the number of MTCM1 motifs in the putative promoter regions of each *Tetrahymena* MT gene studied and their higher or lower expression level.

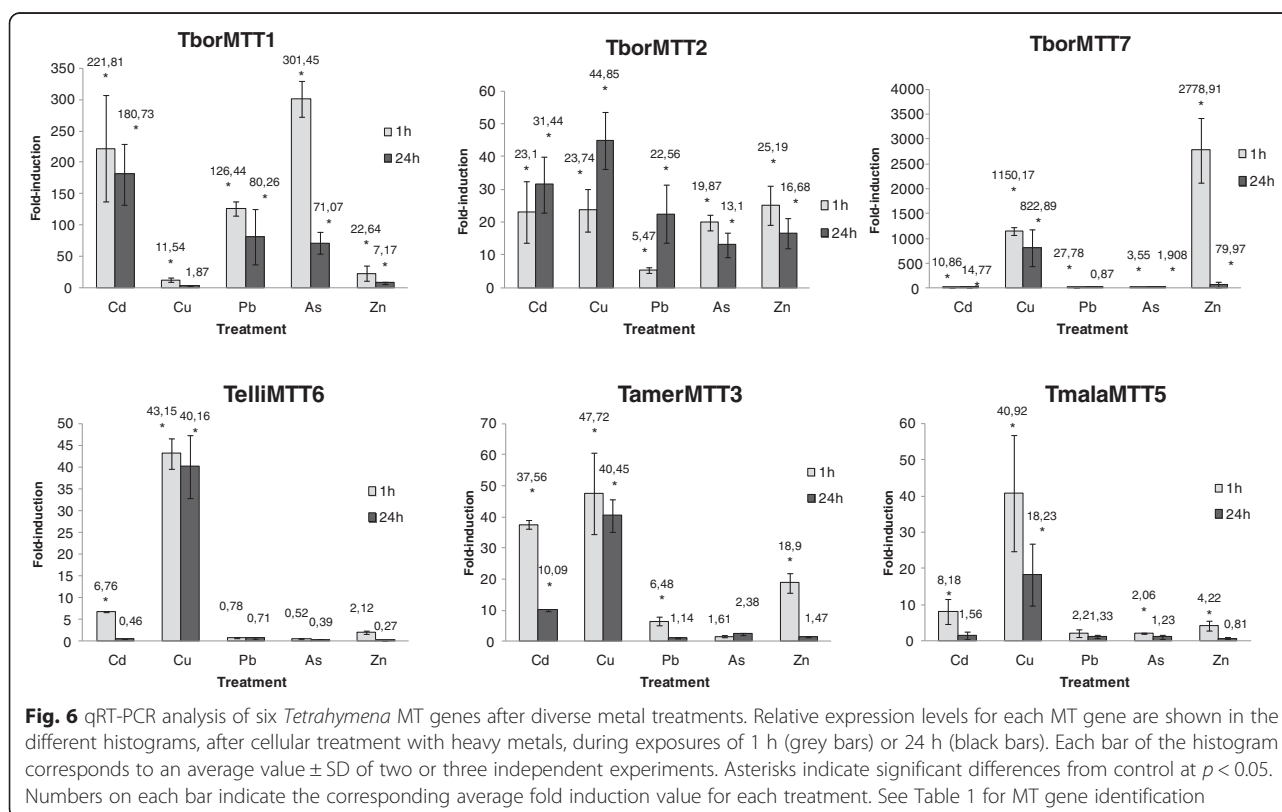
Two types of polyadenylation signals were detected on 3'UTR regions of these cDNAs (Tables 4 and 5). The average number of these polyA sites is about 3.2 for CdMTs, and 3.9 for CuMTs. Likewise, mRNA degradation signals (ATTTA) appear in almost all MT genes analyzed, with an average number of 1.7 (Tables 4 and 5).

Comparative analysis of the MT gene expression under several environmental stressors

Of the 21 new *Tetrahymena* MT genes only 6 were analyzed, using qRT-pCR, owing to the great similarity among MT gene nucleotide sequences isolated from the same *Tetrahymena* species, which makes it impossible to design specific primers to differentiate each gene. We studied the expression of two CdMT genes (*TborMTT1* and *TborMTT2*) and one CuMT gene (*TborMTT7*) from *T. borealis*. The rest of the MT genes isolated from this species have a great similarity; the *TborMTT3/TborMTT6* and *TborMTT4/TborMTT8* pairs have 96 and 98 % identity, respectively. One CuMT gene (*TelliMTT6*) from *T. elliotti* was analyzed because the *TelliMTT1/TelliMTT2* pair has 85 % identity, and although *TelliMTT8* is very similar to *TelliMTT6* the later is much longer, making it possible to design specific primers to amplify a fragment of the *TelliMTT6* 3' region. Only one CuMT gene (*TamerMTT3*) was analyzed from *T. americanis* because *TamerMTT1* and *TamerMTT3* are almost identical (99 %). Finally, one other CuMT gene expression (*TmalaMTT5*) was carried out from *T. malaccensis* because the *TmalaMTT1/TmalaMTT2* and *TmalaMTT3/TmalaMTT4* pairs have 84 and 94 % identity, respectively. Chang et al. (2014), used qRT-PCR to analyze the expression of a gene (*TmalMT1*) isolated from *T. malaccensis* under metal stress (Cd^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} or Pb^{2+}) [16], but this gene (which is the same as our

TmalaMTT1 gene) has 84 % identity with a second CdMT gene, *TmalaMTT2*, which we isolated from the same *Tetrahymena* species, this being the reason we were not able to analyze them by qRT-PCR. Therefore, the gene expression analysis carried out by Chang et al. (2014) [16] very probably corresponds to the sum of both CdMT gene expressions ($TmalMT1 = TmalaMTT1 + TmalaMTT2$). In the case of *T. patula* it was not possible to analyze the expression of any of the genes because both CdMT genes (*TpatMTT1* and *TpatMTT2*) have 91 % identity.

Figure 6 shows the relative fold induction values for each MT gene expression under five different metal(loid) stress treatments at 1 h (short exposure) or 24 h (long exposure). In general, the induction values are higher at 1 h of treatment than after 24 h of metal(loid) exposures, except for the CdMT gene *TborMTT2* under Cd^{2+} , Cu^{2+} or Pb^{2+} treatments (Fig. 6). Both putative CdMT genes from *T. borealis* (*TborMTT1* and *TborMTT2*) are induced by Cd^{2+} among other inorganic cations, but there are several differences in the expression patterns of each gene isoform. At both 1 and 24 h exposures of Cd^{2+} , Pb^{2+} or As^{5+} , the expression levels for *TborMTT1* are considerably higher than for the *TborMTT2* gene. On the other hand, the *TborMTT2* gene isoform seems to be induced later and more uniformly with these metal(loid)s. Therefore, under the same stress conditions, two differential gene expression behaviors are detected for these *T. borealis* CdMT isoforms;



the *TborMTT1* gene responds faster and with a higher level to most metal(loid) stress, while the *TborMTT2* gene responds later and with a lower level under the same stress conditions (Fig. 6). Both genes respond to arsenate (As^{5+}). After 1 h of treatment with this toxic metalloid, *TborMTT1* is induced about 300-fold while *TborMTT2* is only induced ≈ 20 -fold. The toxicity of arsenic depends on its chemical form and state of oxidation, and is generally assigned to its capacity to produce ROS (reactive oxygen species). Arsenic-induced ROS originate lipid peroxidation

and genotoxic damage [52]. Metallothioneins reduce arsenic toxicity, either because As^{5+} may interact with their thiol groups and to involve detoxification, or they may act as antioxidants to protect against the oxidative stress originated by As^{5+} [53]. In fact, arsenic induces MT gene expression [54], including some previously studied *Tetrahymena* MT genes (Table 6) [19, 23].

The rest of *Tetrahymena* MT genes analyzed are putative CuMTs, which are induced primarily but not exclusively by Cu^{2+} (Fig. 6), as is also the case in other

Table 6 Ranking of relative fold-induction values of *Tetrahymena* MT genes obtained by qRT-PCR analysis after different heavy metal treatments

MT gene	Subfamily	Relative fold-induction value ranking	Treatment	Reference
<i>TpyrMT-1</i>	CdMT	Cd > Cu > Zn > Hg	1 h	[12]
<i>TpyrMT2</i>	CdMT	Cd > Cu > Zn > Hg	1 h	[12]
<i>TtheMTT1</i>	CdMT	Cd > Hg > Cu > Zn	30 min	[14]
		Cd > Zn > Pb > Cu > Ni	1 h	[2]
		Cd > Pb > As > Cu > Zn > Ni	24 h	
<i>TtheMTT3</i>	CdMT	Zn > Cd > Pb > Ni > Cu	1 h	[2]
		Cd > Zn > As > Ni > Cu > Pb	24 h	
<i>TtheMTT5</i>	CdMT	Pb > Cd > Zn > Cu > Ni	1 h	[2]
		Pb > As > Cd > Cu > Zn > Ni	24 h	
<i>TrosMTT1</i>	CdMT	Cd > Pb > As > Cu > Zn	1 h	[17]
		Pb > Cd > As > Zn > Cu > Ni	24 h	
<i>TpigMT-1</i>	CdMT	Hg > Pb > Cd > Cu > Zn	1 h	[41]
<i>ThegMT1</i>	CdMT	Zn > Pb > Cd > Cu	1 h	[19]
		Pb > Cd > Zn > Cu	24 h	
<i>ThegMT2</i>	CdMT	Zn > Cd > Cu > Pb	1 h	[19]
		Pb > Zn > Cd > Cu	24 h	
<i>TmalMT1</i>	CdMT	Cd > Zn > Cu > Pb	1 h	[19]
		Cd > Zn > Cu > Pb	24 h	
<i>TmobMT1</i>	CdMT	Cd > Cu > Pb > Zn	1 h	[19]
		Cd > Pb > Cu > Zn	24 h	
<i>TborMTT1</i>	CdMT	As > Cd > Pb > Zn > Cu	1 h	This paper
		Cd > Pb > As > Zn > Cu	24 h	
<i>TborMTT2</i>	CdMT	Zn > Cd \approx Cu > As > Pb	1 h	This paper
		Cu > Cd > Pb > Zn > As	24 h	
<i>TrosMTT2</i>	CuMT	Cu > Pb > Cd > Zn > As	1 h	[17]
		Cu > Zn > Cd > Pb > Ni	24 h	
<i>TborMTT7</i>	CuMT	Zn > Cu > Pb > Cd > As	1 h	This paper
		Cu > Zn > Cd > As > Pb	24 h	
<i>TelliMTT6</i>	CuMT	Cu > Cd > Zn > Pb \approx As	1 h	This paper
		Cu > Pb > Cd \approx As \approx Zn	24 h	
<i>TamerMTT3</i>	CuMT	Cu > Cd > Zn > Pb > As	1 h	This paper
		Cu > Cd > As > Zn \approx Pb	24 h	
<i>TmalaMTT5</i>	CuMT	Cu > Cd > Zn > Pb \approx As	1 h	This paper
		Cu > Cd > Pb \approx As > Zn	24 h	

previously studied CuMT genes from other *Tetrahymena* species [23] (Table 6). The *TborMTT7* gene is enormously induced by Zn^{2+} and Cu^{2+} , especially after 1 h of treatment. This is considerably more than other CuMT genes (Fig. 6), so this MT may play an important role in essential metal (Zn^{2+} or Cu^{2+}) homeostasis, which might also occur in CdMTs, such as; *TtheMTT3* [19], *ThegMT1*, *ThegMT2* [16] and other CuMTs (Table 6). Almost all of these have His residues in their molecules (Figs. 2 and 3), which, as previously indicated, enhance the relative affinity for Zn^{2+} [41, 42] or Cu^{2+} .

Comparisons of the qRT-PCR values obtained by different authors is difficult because of the different experimental conditions used, but even when conditions are the same and identical samples are used, it is difficult to reproduce experiments from different laboratories [55]. However, after the qRT-PCR values from different *Tetrahymena* MT genes are compared (Table 6), some general considerations can be inferred: a) In general, *Tetrahymena* CdMT genes are mainly induced by Cd^{2+} ($Cd > Cu$), whereas CuMT genes are induced by Cu^{2+} ($Cu > Cd$). This difference corroborates their separation in two previously well-defined sub-families (7a or CdMTs and 7b or CuMTs) [19]. b) Induction by Zn^{2+} sometimes occupies first position in the ranking of relative fold-induction values for both Cd- or CuMT genes but only with 1 h metal treatments, indicating a possible metal homeostatic role. c) Occasionally, induction by Pb^{2+} replaces Cd^{2+} at the top of the ranking, as in the case of *TtheMTT5*, *TrosMTT1*, *ThegMT1* and *ThegMT2*. This is likely to be due to similarities between Pb^{2+} and Cd^{2+} in their chemical structure. MTs are induced by Pb^{2+} in rats, humans and fishes [56–58]. Pb^{2+} is second to Cd^{2+} in its ability to displace Zn^{2+} from hepatic ZnMT and is able to displace Cd^{2+} from the CdMT complex [59, 60]. A transcriptome study in plants has revealed that many genes respond similarly to Pb^{2+} and Cd^{2+} [61]. Other metals can also induce *Tetrahymena* MT gene expression, for instance: La^{3+} induces the expression of both *TtheMTT1* and *TtheMTT2* genes. Fluorescence analysis shows that La^{3+} binds to both *T. thermophila* MTs [40], and that the *TpigMT-1* gene is induced by Hg^{2+} [26].

MT gene expression, including both *Tetrahymena* Cd- and CuMT genes, is induced by oxidative stress originated by H_2O_2 or organic compounds, such as Paraquat (PQ) or Menadione (MD) [19–21, 23, 26]. However, the fold-induction values obtained after PQ treatment are generally very low or null (Fig. 7). On the other hand, fold-induction values for MD (1 h treatment) are generally significantly higher than those obtained with PQ treatment (Fig. 7). Both compounds are pro-oxidants generating superoxide anions through redox cycling [62, 63], and they are known to potentially activate the transcription of some MTs [64], such as CUP1 from *S. cerevisiae* [65]. Certain antioxidant ability

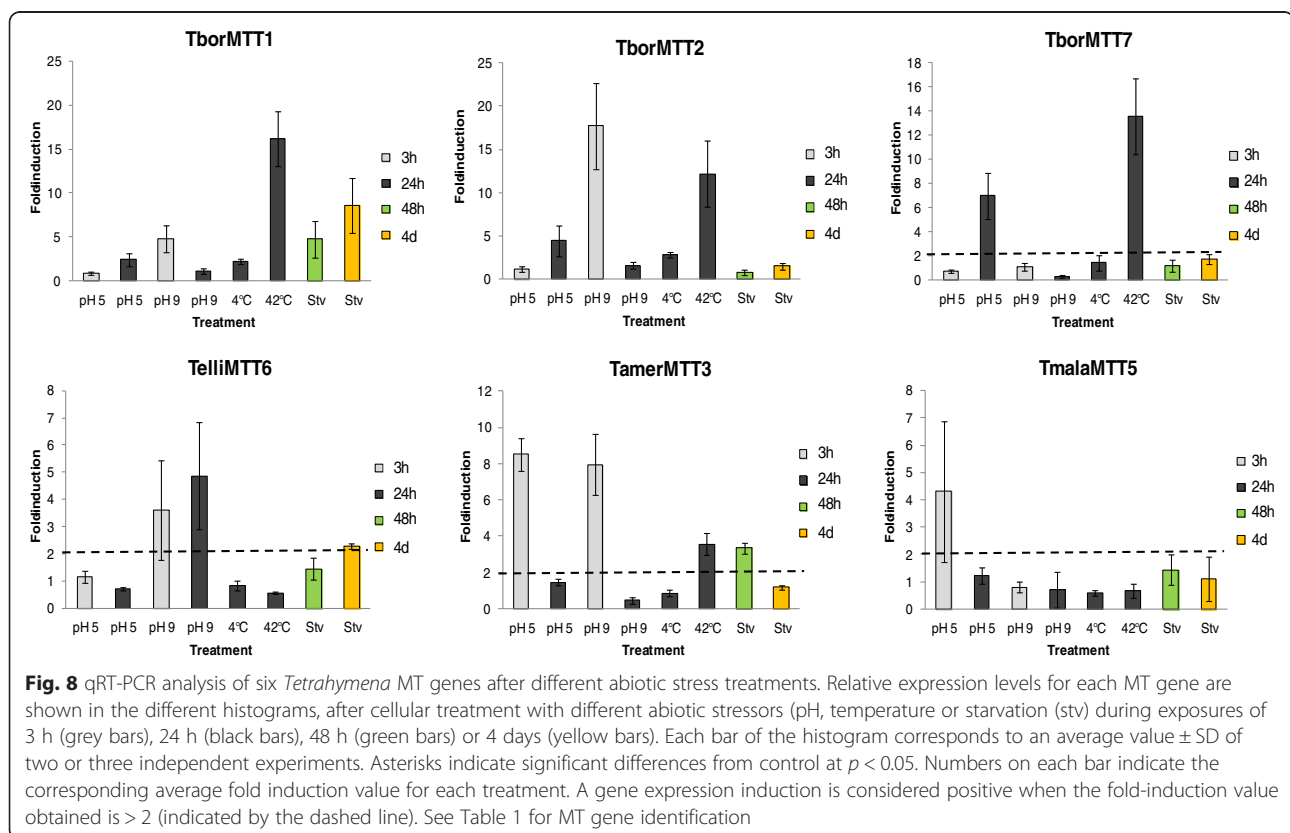
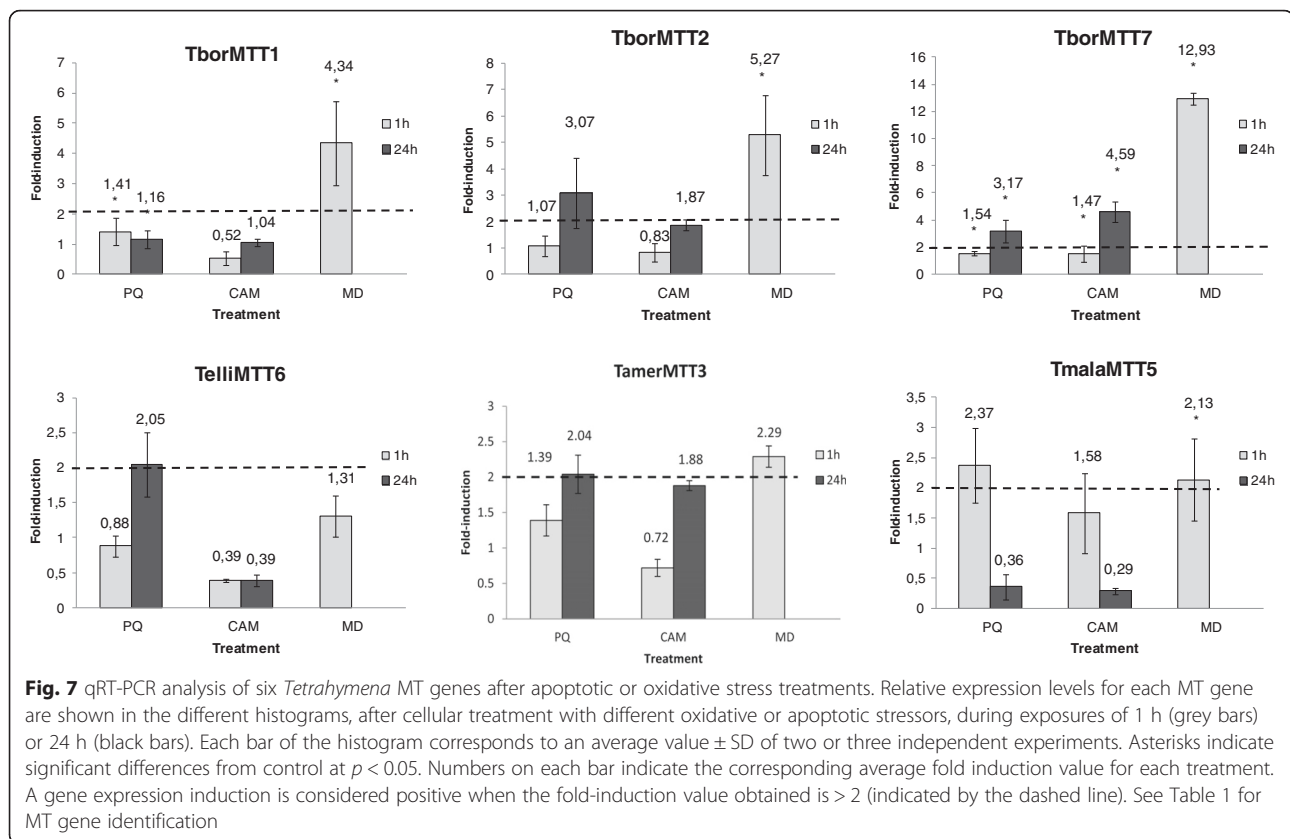
for both *T. thermophila* MTs (*TtheMTT1* and *TtheMTT2*) has been suggested, because of the appearance of disulfide bonds in CdMT complexes after in vitro reaction with NO [40]. However, as shown by both previous results and our own (Fig. 7), other *Tetrahymena* CdMT genes (*TpyrMT-2* and *TrosMTT1*) are not significantly induced by H_2O_2 or PQ [20, 23]. Likewise, the apoptosis inducer camptothecin (CAM) does not seem to be a good inducer of *Tetrahymena* MT gene expression, except in the case of the *TborMTT7* gene, which is slightly induced (≈ 4.5 - fold) after 24 h treatment (Fig. 7).

Other abiotic environmental stressors (pH, temperature and starvation) have been analyzed as inducers of *Tetrahymena* MT gene expression. As shown in Fig. 8, acid pH induces gene expression in some *Tetrahymena* MT species (at both 3 or 24 h treatments), mainly in CuMTs. Under basic pH stress, only four new *Tetrahymena* genes are induced (at 3 or 24 h treatments) with fold-induction values between ≈ 4.7 and 17.7. In general, pH changes induce a very wide and variable range of responses in *Tetrahymena* MT genes, from null [23] to a certain degree of induction irrespective of whether they are Cd- or CuMTs.

High temperature (42 °C) induces gene expression in the majority of *Tetrahymena* MT isoforms (Fig. 8). *T. rostrata* MTs seem to be quite sensitive to thermal stress, because both isoforms (Cd- and CuMT) are considerably induced by the 2 h heat-shock (42 °C) treatment [23]. Likewise, the three isoform genes analyzed from *T. borealis* are also induced by 42 °C (24 h treatment) (Fig. 8). According to several phylogenetic studies, both *Tetrahymena* species are very closely related [66] (Fig. 4) and both species belong to the RSA2 riboset of the *Borealis* group, although *T. rostrata* is a histophagous ciliate, whereas and *T. borealis* not [66].

However, other MT genes from the *Tetrahymena* species are not induced by high temperature [19] (Fig. 8), although it has been reported that the *TtheMTT1* gene is also induced (by about 8-fold) at 40 °C (30 min exposure) [21]. In general, a low temperature (4 °C) does not induce the gene expression of *Tetrahymena* MT genes.

One of the main and more common environmental stressor to which cells are subject is starvation. Among newly analyzed *Tetrahymena* MT genes, the *TborMTT1* gene has a higher fold-induction value, while the rest of the genes present very low or null induction values under starvation stress (Fig. 8). Previously studied of *Tetrahymena* MT genes have also shown induction (mainly after 24 h treatment) under starvation conditions [19, 23]. The *TtheMTT5* gene is expressed during ciliate conjugation (a sexual process induced and developed under starvation) [19], and the *S. cerevisiae* CUP1 metallothionein gene is induced under glucose starvation [67].



At present, this multi-stress character has been reported by the majority of expression analyses of MT genes under diverse abiotic stressors [68, 69]. The transcriptional induction of several MT genes by a variety of stress conditions suggests that cellular exposure to one type of stressor might lead to the acquisition of tolerance towards another different stressor. This cross-protection reported in some organisms suggests at least the partial existence of overlapping between genome responses to different types of stress [70]. This overlapping genome expression comprises general stress-responsive genes, such as heat-shock or MT genes.

Independent of this general multi-stress feature of MTs, a differential gene expression level exists under the same environmental stressor, in different MT gene isoforms from the same subfamily, the same *Tetrahymena* species or among different species, which also seems to exist in different mammalian MT isoforms [1, 48]. There are several examples in the same *Tetrahymena* species (Table 6): a) the three CdMT isoform genes from *T. thermophila* present differential expression patterns. Both TtheMTT1 and TtheMTT5 seem to be general stress and metal detoxification proteins. However, the gene expression induction values reached by *TtheMTT5* gene are considerably higher than the rest of the *T. thermophila* MT isoforms [19], and it responds preferably but not exclusively to Pb^{2+} . On the other hand, the *TtheMTT1* gene preferably responds, at a lower level, to Cd^{2+} [19]. In fact, according to a physicochemical analysis of these MTs recombinantly synthesized as metal-complexes [25], TtheMTT1 has a higher affinity or binding preference by Cd^{2+} than TtheMTT5 isoform. The transformed *T. thermophila* strain (GFPMTT5) with the $P_{MTT1}::GFP::MTT5$ plasmid construct (which includes the *TtheMTT1* promoter, the green fluorescent protein as a reporter gene, and the *TtheMTT5* open reading frame) has been shown to be about 10 times more resistant to Cd^{2+} with regard to the wild-type strain [71], indicating that the *TtheMTT1* promoter responds to Cd^{2+} and that an increase in the *TtheMTT5* gene dose (into a cytoplasm multi-copy plasmid) affects the Cd^{2+} LC_{50} value of this ciliate. A third His-containing CdMT isoform (TtheMTT3) has a higher affinity to Zn^{2+} [19], and could be involved in the intracellular homeostasis of this metal; b) two CdMT isoform genes from *T. hegewischi* (*ThegMT1* and *ThegMT2*) [16] show different gene expression induction patterns, although, as in other cases, these fold-induction values change depending on the metal time exposure (Table 6); c) likewise, the two new CdMT gene isoforms from *T. borealis* (*TborMTT1* and *TborMTT2*) also have different gene expression induction patterns (Table 6).

In the majority of organisms, several isoforms of MT genes are present, suggesting the existence of

differential cellular roles for them. The differential gene expression patterns reported from different MT isoforms under the same environmental stressor corroborate this idea. However, more extensive analysis needs to be done on the molecular behavior of each MT isoform and its relevance with respect to cellular response to a specific stress. Future analyses of knockout strains in one MT gene isoform and expression studies carried out on the rest will be of great importance for understanding the role of each MT isoform.

Conclusions

At present, a total of 42 MT gene isoforms from different *Tetrahymena* species have been reported, of which 21 have been isolated as new cDNAs and reported in this study. In addition, one more MT gene from the sequenced macronuclear genome of the *Tetrahymena*-related ciliate *Ichthyophthirius multifiliis* has been added to the ciliate MT analysis described in this paper. From analysis of the results, the following points can be conclude:

1. Two main *Tetrahymena* MT subfamilies (7a or CdMTs and 7b or CuMTs) were once more corroborated after the 21 new MT cDNAs isolated from different *Tetrahymena* species were analyzed. Both MT subfamilies are based on their protein structural organization (Cys residue patterns) and their preferential gene induction under Cd^{2+} or Cu^{2+} stress.
2. Among all the known MTs from most organisms, the *Tetrahymena* MTs have several unique features. For example, they are considerably longer in size ($\approx 67-74$ % for CdMTs and $\approx 24-57$ % for CuMTs), and therefore have higher molecular masses than standard MTs. CdMTs have relatively abundant CCC motifs with a strictly conserved modular-submodular structure and higher metal binding capacities.
3. Among the *Tetrahymena* CdMTs, the tri-modular structure seems to occur mainly in the *Borealis* group, while the bi-modular structure is found in the majority of species from the *Australis* group.
4. The remarkable asymmetry between *Tetrahymena* Cd- and CuMTs in codon usage for glutamine residues, corroborates the possibility that CuMTs could have diverged earlier than CdMTs in the *Tetrahymena* genus.
5. The gene expression patterns from the new *Tetrahymena* MT isoforms analyzed corroborate their multi-stress character. Likewise, a differential gene expression behavior among different MT isoforms is present in the same *Tetrahymena* species.

Methods

Tetrahymena species, culture conditions and stress treatments

The following five *Tetrahymena* species were used: *T. borealis* (SD 01609), *T. ellioti* 4EA (SD 01607), *T. americanis* (80C03), *T. patula* LFF (ATCC 50064), all supplied by ATCC (American Type Culture Collection) and *T. malaccensis* 436, supplied by the National *Tetrahymena* Stock Center (Cornell University). Cells were axenically grown in PP210 medium: 2 % v/v proteose peptone aqueous solution (Pronadisa) supplemented with 100 μ M FeCl₃ (Panreac), 200 μ g/ml of streptomycin sulfate (Calbiochem) and 200 μ g/ml of penicillin G (Sigma), maintained at a constant temperature (30 \pm 1 $^{\circ}$ C).

Before RNA isolation, cell cultures were exposed to different stress conditions. Heavy-metal treatments were carried out for 1 or 24 h: 44.5 μ M Cd²⁺ (CdCl₂) (except for *T. borealis*, which was treated with 10 μ M Cd²⁺), 315 μ M Cu²⁺ (CuSO₄ · 5 H₂O), 965 μ M Pb²⁺ (Pb(NO₃)₂), 100 μ M As⁵⁺ (Na₂HAsO₄) and 38.2 mM Zn²⁺ (ZnSO₄ · 7 H₂O) (Sigma). Metal concentrations were approximately half the LC₅₀ values calculated in *Tetrahymena thermophila* [72], resulting in insignificant cell mortality for each species used in this study, as it was checked by flow-cytometry (Additional file 2). Oxidative stress was induced by cell exposure (1 or 24 h) to 7.7 mM Paraquat (PQ) (Sigma) or 1 h to 2 mM Menadione (MD) (Sigma). As an apoptosis inducer, 100 μ M Camptothecin (CAM) (Calbiochem) was used at 1 or 24 h exposures. Temperature stress was carried out by maintaining cells for 24 h in a cold (4 $^{\circ}$ C) or hot (42 $^{\circ}$ C) environment. pH stress was applied for 3 or 24 h under basic (pH 9) or acid (pH 5) conditions. All these treatments were carried out in PP210 growth medium. Finally, starvation conditions were induced using a buffer (0.01 mM TrisHCl pH 6.8) for 48 h or 4 days. Ultrapure reagent grade H₂O was used in all experiments, with maximum conductivity of 18.2 MV obtained using a MILLI-Q water purification system (Millipore).

Total DNA and RNA isolations and cDNA synthesis

Exponential cell cultures (1–3 \times 10⁵ cells/ml) of the different *Tetrahymena* species were harvested by centrifugation at 2800 rpm for 3 min. Total DNA was isolated using the protocol described in [73] and samples were treated with 10 mg/ml RNase A (Thermo- Scientific) for 2 h at 37 $^{\circ}$ C. Total RNA samples were isolated from previously stressed exponential cell cultures using the TRIzol Reagent method (Invitrogen). RNA samples were treated with DNase I (Roche) for 30 min at 37 $^{\circ}$ C. DNA and RNA integrity was tested by agarose gel electrophoresis. MultiScribe Reverse Transcriptase 50 units/ μ l (Life Technologies) and oligo(dT)-adaptor primer (Roche) were used to synthesize the cDNAs from 3.5 μ g of the total RNA samples.

Standard PCR reactions, 5'/3' RACE and cloning

Convergent degenerate primers (*MET1/MET2* and *MTCU1/MTCU2*) were designed, using the amino acid sequence of the CdMT TpyrMT-1 [14] and the nucleotide sequence of the CuMT *TtherMTT2* [19] in order to amplify putative CdMTs or CuMTs from different *Tetrahymena* species (Additional file 3). Standard PCR was carried out using the *AmpliTaq Gold PCR Master Mix* and 1.25 U/reaction of the *AmpliTaq Gold DNA Polymerase* (Applied Biosystems). The following PCR program was applied: 7 min at 94 $^{\circ}$ C, 30 cycles of 1 min at 94 $^{\circ}$ C, 1 min at 50 \pm 3 $^{\circ}$ C and 2 min at 72 $^{\circ}$ C and finally, 5 min at 72 $^{\circ}$ C. The full-length of cDNA sequences was obtained using 3' or 5' RACE kits: *3' RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends* (Invitrogen) or *5' RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends* (Invitrogen). In the 3' RACE system an adaptor primer (AP) and the AUAP primer supplied with the kit was generally used but in some cases we designed a specific primer for a specific sequence. AAP primer (Invitrogen) was used in the 5' RACE, and we also designed a specific primer for each sequence (Additional file 3). PCR products were analyzed by standard 1.5 % agarose gel electrophoresis in TAE 1x buffer (40 mM Tris, 1 mM EDTA and 5.7 % glacial acetic acid) and stained with GelRed (Biotium) (3x in water). They were then cloned using the *TOPO TA Cloning Kit* (Invitrogen).

Quantitative real-time RT-PCR

cDNA samples were amplified in duplicate in 96 microtiter plates (Applied Biosystems). Each PCR reaction (20 μ l) contained: 10 μ l of SBYR Green (Takara), 1 μ l of each primer (at 300 nM final concentration), 3 μ l of ultrapure sterile water and 5 μ l of cDNA. PCR primers (Additional file 3) were designed using the "Primer Quest and Probe Design" online-application of IDT (*Integrated DNA Technologies*). α -tubulin and β -actin were used as the endogenous control or normalizer genes. Primer specificity was tested, melting curves were obtained and each PCR product was confirmed by gel electrophoresis and sequencing. Real-time RT-PCR reactions were carried out in an iQ5 real-time PCR apparatus (Bio-Rad). The thermal cycling protocol was as follows: 5 min at 95 $^{\circ}$ C, 40 cycles (30 s at 95 $^{\circ}$ C, 30 s at 55 $^{\circ}$ C and 20 s at 72 $^{\circ}$ C), 1 min at 95 $^{\circ}$ C and 1 min at 55 $^{\circ}$ C. All controls were negative (no template control or RT minus control). Amplification efficiency (E) was measured by using 10-fold serial dilutions of a positive control PCR template. The efficiency requirement was met for all the tested genes (Additional file 4). Results were finally processed by the standard-curve method (http://www6.appliedbiosystems.com/support/tutorials/pdf/performing_rq_gene_exp_rtprcr.pdf).

DNA sequencing and *in silico* analysis of nucleotide and amino acid sequences

DNA sequences were obtained with the *ABI Prism 3730 DNA Analyser* sequencer (Applied Biosystem). In order to look for new MT sequences we also analyzed the macronuclear genomes of *T. malaccensis*, *T. borealis* and *T. elliotti* with the BLAST program on the *Tetrahymena Comparative Database* website (<http://www.broadinstitute.org/scientific-community/science/programs/genome-sequencing-and-analysis/update-our-microbial-eukaryotes>) and the macronuclear genome of *I. multifiliis* with the BLAST program on the *Ichthyophthirius Genome Database* website (<http://ich.ciliate.org/index.php/home/welcome>). Multiple sequence alignments were performed using T-Coffee online application (which uses the Clustal Wallis method) (Tree-based Consistency Objective Function for Alignment Evaluation) [74]. The phylogenetic trees of both *Tetrahymena* MTs and SSrRNAs were built using the maximum likelihood algorithm (MEGA 5.05, using the Poisson model). Phylogenetic trees (Newick) and alignments (FASTA) are available from TreeBase (<http://purl.org/phylo/treebase/phylo/study/TB2:S18773>, <http://purl.org/phylo/treebase/phylo/study/TB2:S18776>) with references: TB2:S18773 and TB2:S18776. Both, 5' and 3'UTR conserved motifs were searched, based on our previous research work [19].

Nucleotide sequence accession numbers

The 21 new cDNA sequences have been deposited in the GenBank Database. All GenBank accession numbers of MT genes referred on this article are shown in Additional file 5.

Availability of data and materials

The datasets supporting the conclusions of this article are included within the article (and its Additional file 5) and are available in the TreeBase repository (<http://purl.org/phylo/treebase/phylo/study>) with references: TB2:S18773 and TB2:S18776.

Additional files

Additional file 1: Theoretical metal binding capacity for *Tetrahymena* Cd- and CuMTs. (DOCX 16 kb)

Additional file 2: Heavy metal toxicity analysis. (DOCX 17 kb)

Additional file 3: Primers for standard PCR and qRT-PCR. (DOCX 16 kb)

Additional file 4: Quantitative RT-PCR standard-curve parameters. (DOCX 18 kb)

Additional file 5: Ciliate metallothionein GenBank accession numbers. (DOCX 17 kb)

Abbreviations

CdMTs: cadmium-binding MTs; CuMTs: copper-binding-MTs; LC₅₀: lethal concentration killing 50 % of cell population; MTs: metallothioneins;

ORF: open reading frame; qRT-PCR: quantitative reverse transcription polymerase chain reaction; SSrRNA: small subunit ribosomal RNA.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

PdF isolated and analysed most of the cDNAs and drew up the first draft of the manuscript. Other cDNAs were isolated by LMM. SD and AMG helped with the bioinformatic analysis. The project was conceived by JCG who provided overall supervision of the study and the drafting of the manuscript. All the authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

This research work was supported by the Santander/Complutense PR6/13-18856 grant to JCG. A PhD scholarship was awarded to PdF by the Spanish Ministry of Education (FPU12/02789).

Author details

¹Departamento Microbiología-III, Facultad de Biología. C/José Antonio Novais, 12, Universidad Complutense de Madrid (UCM), 28040 Madrid, Spain. ²Universidad Castilla-La Mancha, Campus Tecnológico de la fábrica de armas, Edificio Sabatini. Av. Carlos III, s/n. 45071 Toledo, Spain.

Received: 17 December 2015 Accepted: 22 April 2016

Published online: 10 May 2016

References

- Coyle P, Philcox JC, Carey LC, Roife AM. Metallothionein: the multipurpose protein. *Cell Mol Life Sci.* 2002;59:627–47.
- Viarengo A, Burlando B, Ceratto N, Panfoli I. Antioxidant role of metallothioneins: a comparative overview. *Cell Mol Biol.* 2000;46:407–17.
- Cousins RJ. Absorption, transport and hepatic metabolism of copper and Zn: special reference to metallothionein and caeruloplasmin. *Physiol Rev.* 1985;65:238–309.
- Klaassen CD, Liu J, Choudhuri S. Metallothionein: an intracellular protein to protect against cadmium toxicity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1999;39:267–94.
- Penkowa M, Carrasco J, Giralto M, Molinero A, Hernandez J, et al. Altered central nervous system cytokine-growth factor expression profiles and angiogenesis in metallothionein-I + II deficient mice. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2000;20:1174–89.
- Swindell WR. Metallothionein and the biology of aging. *Ageing Res Rev.* 2011;10:132–45.
- Vidal F, Hidalgo J. Effect of zinc and copper on preimplantation mouse embryo development in vitro and metallothionein levels. *Zygote.* 1993;1:225–9.
- Margoshes M, Vallee BL. A cadmium protein from the equine kidney cortex. *J Am Chem Soc.* 1957;79:1813–4.
- Capdevila M, Atrian S. Metallothionein protein evolution: a miniassay. *J Biol Inorg Chem.* 2011;16:977–89.
- Güirola M, Pérez-Rafael S, Capdevila M, Palacios O, Atrian S. Metal dealing at the origin of the *Chordata* phylum: the metallothionein system and metal overload response in amphioxus. *PLoS ONE.* 2012;7(8):e43299.
- Robinson NJ, Whitcill SK, Cavet JS. Microbial metallothioneins. In: Poole RK, editor. *Advances in microbial physiology.* New York: Academic; 2001. p. 183–213.
- Gutiérrez JC, Amaro F, Martín-González A. From heavy metal-binders to biosensors: ciliate metallothioneins discussed. *BioEssays.* 2009;31:805–16.
- Gutiérrez JC, Amaro F, Díaz S, De Francisco P, Cubas LL, Martín-González A. Ciliate metallothioneins: unique microbial eukaryotic heavy-metal-binder molecules. *J Biol Inorg Chem.* 2011;16:1025–34.
- Piccinni E, Bertagia D, Santovito G, Miceli C, Kraen A. Cadmium metallothionein gene of *Tetrahymena pyriformis*. *Gene.* 1999;234:51–9.
- Boldrin F, Santovito G, Irato P, Piccinni E. Metal interaction and regulation of *Tetrahymena pigmentosa* metallothionein genes. *Protist.* 2002;153:283–91.
- Chang Y, Liu G, Guo L, Liu H, Yuan D, Xiong J, et al. Cd-Metallothionein in three additional *Tetrahymena* species: intragenic repeat patterns and induction by metal ions. *J Eukaryot Microbiol.* 2014;61:333–42.
- Shuja RN, Shakoori AR. Identification and cloning of first cadmium metallothionein like gene from locally isolated ciliate, *Paramecium* sp. *Mol Biol Rep.* 2009;36:549–60.
- Binz PA, Kägi JHR. Metallothionein: Molecular evolution and classification. In: Klaassen C, editor. *Metallothionein IV.* Basel: Birkhäuser, Verlag; 1999. p. 7–13.

19. Diaz S, Amaro F, Rico D, Campos V, Benítez L, Martín-González A, et al. *Tetrahymena* metallothioneins fall into two discrete subfamilies. PLoS ONE. 2007;2:e291.
20. Fu C, Miao W. Cloning and characterization of a new multi-stress inducible metallothionein gene in *Tetrahymena pyriformis*. Protist. 2006; 157:193–203.
21. Dondero F, Cavaletto M, Chezzi AR, La Terza A, Banni M, Viarengo A. Biochemical characterization and quantitative gene expression analysis of the multi-stress inducible metallothionein from *Tetrahymena thermophila*. Protist. 2004;155:157–68.
22. Shuja RN, Shakoori AR. Identification, cloning and sequencing of a novel stress inducible metallothionein gene from locally isolated *Tetrahymena tropicalis lahorensis*. Gene. 2007;405:19–26.
23. Amaro F, De Lucas MP, Martín-González A, Gutiérrez JC. Two new members of the *Tetrahymena* multi-stress inducible metallothionein family: Characterization and expression analysis of *T. rostrata* Cd/Cu metallothionein genes. Gene. 2008;423:85–91.
24. Boldrin F, Santovito G, Formigari A, Bisharyan Y, Cassidy-Hanley D, Clark TG, et al. MTT2, a copper-inducible metallothionein gene from *Tetrahymena thermophila*. Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol. 2008;147:232–40.
25. Espart A, Marín M, Gil-Moreno S, Palacios O, Amaro F, Martín-González A, et al. Hints for metal-preference protein sequence determinants: different metal binding features of the five *Tetrahymena thermophila* metallothioneins. Int J Biol Sci. 2015;11(4):456–71.
26. Guo L, Fu C, Miao W. Cloning, characterization and gene expression analysis of a novel cadmium metallothionein gene in *Tetrahymena pigmentosa*. Gene. 2008;423:29–35.
27. Boldrin F, Santovito G, Negrisolo E, Piccini E. Cloning and sequencing of four new metallothionein genes from *Tetrahymena thermophila* and *T. pigmentosa*. Evolutionary relationships in *Tetrahymena* MT family. Protist. 2003;154:431–42.
28. Chantangsi C, Lynn DH. Phylogenetic relationships within the genus *Tetrahymena* inferred from the cytochrome c oxidase subunit 1 and small subunit ribosomal RNA genes. Mol Phylogenet Evol. 2008;49:979–87.
29. Henkel G, Krebs B. Metallothioneins: zinc, cadmium, mercury and copper thiolates and selenolates mimicking protein active site features-structural aspects and biological implications. Chem Rev. 2004;104:801–24.
30. Grüber C, Stürzenbaum S, Gehrig P, Sack R, Hunziker P, Berger B, et al. Isolation and characterization of a self-sufficient one-domain protein (Cd)-metallothionein from *Eisenia foetida*. Eur J Biochem. 2000;267:573–82.
31. Trinchella F, Riggio M, Filosa S, Parisi E, Scudiero R. Molecular cloning and sequencing of metallothionein in squamates: new insights into the evolution of the metallothionein genes in vertebrates. Gene. 2008;423:48–56.
32. Valls M, Bofill R, González-Duarte R, González-Duarte P, Capdevila M, Atrian S. A new insight into metallothionein (MT) classification and evolution: the in vivo and in vitro metal binding features of *Homarus americanus* recombinant MT. J Biol Chem. 2001;276:32835–43.
33. Bargelloni L, Scudiero R, Parisi E, Carginale V, Capasso C, Patarnello T. Metallothioneins in Antarctic fish: evidence for independent duplication and gene conversion. Mol Biol Evol. 1999;16:885–97.
34. Maroni G, Wise J, Young JE, Otto E. Metallothionein gene duplications and metal tolerance in natural populations of *Drosophila melanogaster*. Genetics. 1987;117:739–44.
35. Chiera NM, Rowinska-Zyrek M, Wiczorek R, Guerrini R, Witkowska D, Remelli M, et al. Unexpected impact of the number of glutamine residues on metal complex stability. Metallomics. 2013;5:214–21.
36. Baroin-Tourancheau A, Tsao N, Klobutcher LA, Pearlman RE, Adoutte A. Genetic code deviations in the ciliates: Evidence for multiple and independent events. EMBO J. 1995;14:3262–7.
37. Lozupone CA, Knight RD, Landweber LF. The molecular basis of nuclear genetic code change in ciliates. Curr Biol. 2001;11:65–74.
38. Peroza EA, Schmucki R, Güntert P, Preisinger E, Zerbe O. The β E-domain of wheat Ec-1 metallothionein: a metal-binding domain with a distinctive structure. J Mol Biol. 2009;387:207–18.
39. Domenech J, Bofill R, Tinti A, Torreggiani A, Atrian S, Capdevila M. Comparative insights into the Zn(II)-, Cd(II)- and Cu(II)-binding features on the protozoan *Tetrahymena pyriformis* MTT1 metallothionein. Biochim Biophys Acta. 2008;1784:693–704.
40. Wang Q, Xu J, Chai B, Liang A, Wang W. Functional comparison of metallothioneins MTT1 and MTT2 from *Tetrahymena thermophila*. Arch Biochem Biophys. 2011;509:107–76.
41. Tucker SL, Thornton CR, Tasker K, Jacob C, Giles G, Edgan M, et al. A fungal metallothionein is required for pathogenicity of *Magnaporthe grisea*. Plant Cell. 2004;16:1575–88.
42. Daniels MJ, Turner-Cavet JS, Selkirk R, Sun H, Parkinson JA, Sadler PJ, et al. Coordination of Zn²⁺ (and Cd²⁺) by prokaryotic metallothionein. Involvement of His-Imidazole. J Biol Chem. 1998;273:22957–61.
43. Blindauer CA. Metallothioneins with unusual residues: histidines as modulators of zinc affinity and reactivity. J Inorg Biochem. 2007;102:507–21.
44. Perez-Rafael S, Monteiro F, Dallinger R, Atrian S, Palacios O, Capdevila M. *Cantareus aspersus* metallothionein metal binding abilities: the unspecific CaCd/CuMT isoform provides hints about the metal preference determinants in metallothioneins. BBA-Proteins Proteomics. 2014;1844:1694–707.
45. Sokalingam S, Raghunathan G, Soundararajan N, Lee SG. A study on the effect of surface lysine to arginine mutagenesis on protein stability and structure using green fluorescent protein. PLoS ONE. 2012;7:e40410.
46. Warwicker J, Charonis S, Curtis RA. Lysine and arginine content of proteins: computational analysis suggests a new tool for solubility design. Mol Pharmaceutics. 2014;11:294–303.
47. Jeffares DC, Penkett CJ, Bahler J. Rapidly regulated genes are intron poor. Trends Genet. 2008;24:375–8.
48. Miles AT, Hawksworth GM, Beattie JH, Rodilla V. Induction, regulation, degradation and biological significance of mammalian metallothioneins. Crit Rev Biochem Mol Biol. 2000;35:35–70.
49. Shaulian E, Karin M. AP-1 as a regulator of cell life and death. Nat Cell Biol. 2002;4E:131–6.
50. Wu A, Wemmie JA, Edgington NP, Goebl M, Guevara JL, Moye-Rowley WS. Yeast bZIP proteins mediate pleiotropic drug and metal resistance. J Biol Chem. 1993;268:18850–8.
51. Jenny MJ, Warr GW, Ringwood AR, Baltzegar DA, Chapman RW. Regulation of metallothionein genes in the American oyster (*Crassostrea virginica*): ontogeny and differential expression in response to different stressors. Gene. 2006;379:156–65.
52. Shi H, Shi X, Liu KJ. Oxidative mechanism of arsenic toxicity and carcinogenesis. Mol Cell Biochem. 2004;255:67–78.
53. Qu W, Waalkes MP. Metallothionein blocks oxidative DNA damage induced by acute inorganic arsenic exposure. Toxicol Appl Pharmacol. 2015;282(3):267–74.
54. Ganger R, Garla R, Mohanty BP, Bansal MP and Garg ML. Protective effects of zinc against acute arsenic toxicity by regulating antioxidant defense system and cumulative metallothionein expression. Biol Trace Elem Res. 2015.
55. Bustin SA. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. J Mol Endocrinol. 2000;25:169–93.
56. Ikebuchi H, Teshima R, Suzuki T, Terao T, Yamane Y. Simultaneous induction of Pb-metallothionein-like protein and Zn-thionein in the liver of rats given lead acetate. Biochem J. 1986;233:541–6.
57. Church HJ, Day JP, Braithwaite RA, Brown SS. Binding the lead to a metallothionein-like protein in human erythrocytes. J Inorg Biochem. 1993;49:55–68.
58. Cheung A, Pok L, Vincent KLL, King MC. Tilapia metallothionein genes: PCR-cloning and gene expression studies. Biochim Biophys Acta. 2005;1731:191–201.
59. Waalkes MP, Harvey MJ, Klaassen CD. Relative in vitro affinity of hepatic metallothionein for metals. Toxicol Lett. 1984;20:33–9.
60. Erk M, Raspor B. Interference of Pb leaching from the pH electrode on Cd-metallothionein complex. Analitica Chimica Acta. 2001;442:165–70.
61. Kovalchuk I, Titov V, Hohn B, Kovalchuk O. Transcriptome profiling reveals similarities and differences in plant responses to cadmium and lead. Mutat Res. 2005;570:149–61.
62. Kappus H, Sies H. Toxic drug effects associated with oxygen metabolism: redox cycling and lipid peroxidation. Experientia. 1981;37:1233–41.
63. Thor H, Smith MT, Hartzell P, Bellomo G, Jewell SA, Orrenius S. The metabolism of menadione (2-methyl-1,4-naphthoquinone) by isolated hepatocytes. J Biol Chem. 1982;257:12419–25.
64. Bauman JW, Madhu C, McJim Jr JM, Liu Y, Klaassen CD. Induction of hepatic metallothionein by paraquat. Toxicol Appl Pharmacol. 1992;117:233–41.
65. Liu X, Thiele DJ. Oxidative stress induces heat shock factor phosphorylation and HSF-dependent activation of yeast metallothionein gene transcription. Genes Dev. 1996;10(5):592–603.
66. Strüder-Kypke MC, Wright ADG, Jerome CA, Lynn DH. Parallel evolution of histophagy in ciliates of the genus *Tetrahymena*. BMC Evol Biol. 2001;1:5.
67. Mager WH, Kruijff AJ. Stress-induced transcriptional activation. Microbiol Rev. 1995;59:506–31.

68. Yang M, Zhang F, Wang F, Dong Z, Cao Q, Chen M. Characterization of a type 1 metallothionein gene from the stresses-tolerant plant *Ziziphus jujuba*. *Int J Mol Sci*. 2015;16:16750–62.
69. Russo R, Bonaventura R, Matranga V. Time- and dose-dependent gene expression in sea urchin embryos exposed to UVB. *Mar Environ Res*. 2014;93:85–92.
70. Estruch F. Stress-controlled transcription factors, stress-induced genes and stress tolerance in budding yeast. *FEMS Microbiol Rev*. 2000;24:469–86.
71. Amaro F, Turkewitz AP, Martín-González A, Gutiérrez JC. Functional GFP-metallothionein from *Tetrahymena thermophila*: a potential whole-cell biosensor for monitoring heavy metal pollution and a cell model to study metallothionein overproduction effects. *Biometals*. 2014;27:195–205.
72. Gallego A, Martín-González A, Ortega R, Gutiérrez JC. Flow cytometry assessment of cytotoxicity and reactive oxygen species generation by single and binary mixtures of cadmium, zinc and copper on populations of the ciliated protozoan *Tetrahymena thermophila*. *Chemosphere*. 2007;68:647–61.
73. Martín-Platero AM, Valdivia E, Maqueda M, Martínez-Bueno M. Fast, convenient, and economical method for isolating genomic DNA from lactic acid bacteria using a modification of the protein “salting-out” procedure. *Anal Biochem*. 2007;366:102–4.
74. Notredame C, Higgins DG, Heringa J. T-Coffee: A novel method for fast and accurate multiple sequence alignment. *J Mol Biol*. 2000;302:205–17.

Submit your next manuscript to BioMed Central and we will help you at every step:

- We accept pre-submission inquiries
- Our selector tool helps you to find the most relevant journal
- We provide round the clock customer support
- Convenient online submission
- Thorough peer review
- Inclusion in PubMed and all major indexing services
- Maximum visibility for your research

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit

