

Organismo	PDB	Sequência
Coelho	1mrb	- - K S G C S C C P P G A - - - - -
Humano	1mhu	- - K S C C S C C P V G C A - - - - -
Rato	4mt2	- - K S G C S C C P V G C A - - - - -
Rato	1mrt	- - K S G C S C C P V G C A - - - - -
Camundongo	1dfs	- - K S C C S C C P V G C S - - - - -
Camundongo	1ji9	- - K S G C S C C P A G C E - - - - -
Carangueijo	1dmc	- - - S P C Q K T S G - - - - -
Lagosta	1j5l	- - - - P C E K T S G - - - - -
Equinoderma	1qjk	- P D V K C V C T E G K E - - - - -
Bactéria	1jjd	- T L V K C A E P L C N V D P S K A I D - - - - -

Determinação da Estrutura e Estudo da Função da Metalotioneína de *Synechococcus* com Ferramentas da Bioinformática

Goran Neshich¹

Andrea Guelfi²

Silvia Maria Guerra Molina³

As metalotioneínas (MTs) são proteínas pequenas (56 a 65 aminoácidos), ricas em cisteína, encontradas em quase todos os organismos e que apresentam a capacidade de quelar metais pesados (Romero-Isart & Vasak, 2002; Robinson et al., 2001; Riek et al., 1999; Braun et al., 1992). Existem mais de 400 seqüências de metalotioneína (MT) disponíveis no banco de dados *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), sendo que 19 destas têm estruturas resolvidas e depositadas no banco de dados *Protein Data Bank* (PDB), oriundas de mamíferos, equinodermas, crustáceos, fungos e bactérias (Munoz et al., 2002; Blindauer et al., 2001; Oz et al., 2001; Riek et al., 1999; Zangger et al., 1999; Peterson et al., 1996; Narula et al., 1995; Braun et al., 1992; Messerle et al., 1990; Arseniev et al., 1988; Schultze et al., 1988). Devido à sua capacidade de seqüestrar metais, estas proteínas apresentam um elevado potencial para a biorremediação de áreas contaminadas por metais pesados ou a biorremoção de metais valiosos (Cobbett et al., 2002; Sriprang et al., 2002; Yoshida et al., 2002; Valls et al., 2000; Chen et al., 1997; Winge et al., 1985). Até a data presente, a MT foi encontrada experimentalmente, em duas cianobactérias, *Synechococcus* PCC7942 (Huckle et al., 1993) e *S.*

vulcans (Shimizu et al., 1992) e outras quatro foram deduzidas dos genomas de *Pseudomonas aeruginosa* (Stover et al., 2000), *P. putida* linhagem KT2440 (Nelson et al., 2000), *Anabaena* PCC 7120 (Takakazu et al., *in press*) e *Escherichia coli* (P38398) (Robinson et al., 2001). A única estrutura depositada de bactéria, no banco de dados PDB refere-se à cianobactéria *Synechococcus* PCC 7942 com o código 1jjd.pdb (Blindauer et al., 2001). Esta proteína não apresenta identidade significativa, em termos de seqüência, com nenhuma outra MT de outros organismos, ou seja, as MTs de outros organismos apresentam seqüências de aminoácidos muito diferentes (como pode ser observado na Fig. 2) (Blindauer et al., 2001; Valls et al., 2001; Romero-Isart & Vasak et al., 2002).

Este trabalho corrobora com o recente artigo de Miller & Attwood (2003), no qual salientam a importância da bioinformática como uma ferramenta essencial para se analisar os dados gerados e disponibilizados na rede Internet, bem como para se compreender a estrutura e função das proteínas. Assim, este trabalho abordou a análise estrutural das MTs a fim de se modelar esta proteína e com isso compreender melhor o funcionamento da mesma. O conhecimento da cianobactéria e uma completa análise da MT poderia

¹ Ph.D. em Biofísica, Pesquisador da Embrapa Informática Agropecuária, Caixa Postal 6041, Barão Geraldo - 13083-970 - Campinas, SP. (e-mail: neshich@cnptia.embrapa.br)

² M.Sc. em Genética, Doutoranda no Departamento de Genética da ESALQ/USP, Bolsista do CNPq, Caixa Postal 9 - 13418-970 - Piracicaba, SP. (e-mail: andrea@esalq.usp.br)

³ Ph.D. em Genética, Professora do Departamento de Genética da ESALQ/USP, Caixa Postal 9 - 13418-970 - Piracicaba, SP. (e-mail: smgmolin@esalq.usp.br)

ser muito útil em um estudo de utilização desta na técnica da biorremediação para remover metais pesados do solo e da água decorrentes das práticas agrícolas atuais.

O grupo de Bioinformática Estrutural da Embrapa Informática Agropecuária colabora com grupos de pesquisa interessados em utilizar ferramentas da Bioinformática nos seus problemas biológicos. Este projeto está sendo desenvolvido em colaboração com o Departamento de Genética da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" (ESALQ/USP) e parte da bioinformática foi realizada no Núcleo de Bioinformática (NBI).

Primeiramente, foram determinados estruturalmente os sítios ativos e os principais aminoácidos responsáveis pela atividade da metalotioneína na bactéria *Synechococcus* PCC7942, os quais foram posteriormente comparados com a MT de outros organismos. E segundo, através do uso de ferramentas da bioinformática, foram determinados os aminoácidos que deverão ser mutados para induzir a troca de atividade, com conseqüente mudança de afinidade pelos íons metálicos, de uma metalotioneína para outra.

Material e Métodos

As seqüências de MT foram obtidas no site *National Center for Biotechnology Information* (NCBI, 2003) com a busca realizada no banco de proteínas usando a palavra-chave "*metallothionein*".

As estruturas de proteínas MT foram encontradas no banco de dados PDB (Berman et al., 2000) e classificadas no *Structural Classification of Proteins* (SCOP) (Murzin et al., 1995).

O alinhamento das seqüências lineares de proteínas foi feito usando o software ClustalW (Thompson et al., 1994). Este software foi desenvolvido para fazer o alinhamento múltiplo de seqüências de DNA ou de proteína.

As análises dos sítios de ligação foram obtidas no programa STING (*Sequence To and withIN Graphics*) Millennium Suíte (SMS) (Neshich et al., 1998), o qual pode ser acessado pela URL <http://www.cbi.cnptia.embrapa.br/SMS/>. O STING Millennium é composto por uma série de programas, disponibilizados na Internet, que começa com a visualização da estrutura molecular e promove uma série extensiva de análises estruturais da molécula.

As tentativas de alinhamento estrutural foram realizadas no software PrISM (*Protein informatics system for modeling*) (Yang & Honig, 1999). Este software foi desenvolvido para analisar seqüências e estruturas de proteínas, seu papel principal é de prever estruturas tridimensionais das proteínas.

Resultados e Discussão

A primeira etapa do trabalho consistiu na busca das estruturas resolvidas de metalotioneína (MT) depositadas no banco de dados do PDB e classificadas no SCOP. Os resultados são apresentados na Tabela 1. Foram discriminados os organismos, o método de obtenção da estrutura, o número correspondente no PDB, o tipo de isoforma, o tipo de domínio, o ligante utilizado no PDB, os resíduos envolvidos e a afinidade de cada metalotioneína por íons de metais pesados. Como pode-se observar na Tabela 1, a maioria dos organismos se refere aos mamíferos, os quais possuem três isoformas com estruturas resolvidas, a MT-1, MT-2 e MT-3. Exceto no fungo e na bactéria, todas as estruturas apresentam os dois domínios, denominados alpha e beta, numa mesma molécula e apresentam afinidade pelo metal pesado cádmio. O fungo apresenta somente o domínio beta com afinidade pelos íons monovalentes (cobre ou prata), enquanto a bactéria apresenta exclusivamente o domínio alpha com afinidade pelos íons bivalentes (cádmio ou zinco).

Os domínios alpha e beta foram depositados em PDBs diferentes, para aquelas estruturas resolvidas por NMR, provavelmente para uma maior facilidade de análise. Assim, a comparação foi feita para cada domínio, mesmo porque estes domínios apresentam conformações espaciais típicas. Uma forma usual de relacionar as diferentes MTs nos organismos é através da comparação do número de metais presentes no sítio de ligação e o número de aminoácidos envolvidos na ligação (Tabela 1, coluna Ligante).

Como pode ser observado na Tabela 1 (colunas: Ligante e Resíduo envolvido), nos mamíferos e no equinoderma (ouriço-do-mar), o domínio alpha contém 4 íons de Cd^{2+} no sítio de ligação e apresenta 11 cisteínas diretamente envolvidas neste contato. O contato é estabelecido entre o íon de metal e o radical tiol da cisteína numa ligação de comprimento médio de 2,53 Å para o cádmio e 2,32 Å para o zinco. Por outro lado, o domínio beta contém 3 íons de Cd^{2+} e 9 cisteínas em contato com o metal (Blindauer et al., 2001; Oz et al., 2001; Riek et al., 1999; Zangger et al., 1999; Braun et al., 1992; Messerle et al., 1990; Arseniev et al., 1988; Schultze et al., 1988).

Nos crustáceos (lagosta e carangueijo), os dois domínios, alpha e beta contêm 3 íons de Cd^{2+} com 9 cisteínas em cada domínio (Munoz et al., 2002; Narula et al., 1995). No fungo a relação metal/cisteína foi de 7 íons de Cu^{1+} ou Ag^{1+} para 10 cisteínas (Peterson et al., 1996). Na bactéria a MT apresenta característica semelhante ao domínio alpha de mamíferos, a relação se manteve nos 4 íons de metal bivalente (Cd^{2+}) para 11 aminoácidos, mas a diferença consiste no tipo de aminoácido, ao invés de apresentar somente cisteínas no sítio de ligação, a bactéria apresenta 9 cisteínas e 2 histidinas (Blindauer et al., 2001).

Tabela 1. Metalotioneínas resolvidas por difração de raios X ou RMN, dados extraídos do PDB.

Organismo	Método	PDB	Isoforma	Domínio	Ligante no PDB	Resíduos envolvidos	Afinidade	Referência
Rato	X-ray	4mt2	MT-2	alpha + beta	Cd ₅ +Zn ₂	20 Cis	Zn/Cd/Cu	Braun et al., 1992
Rato	NMR	1mrt 2mrt	MT-2 MT-2	alpha beta	Cd ₄ Cd ₃	11 Cis 9 Cis	Zn/Cd/Cu	Schultze et al., 1988
Coelho	NMR	1mrb 2mrb	MT-2 MT-2	alpha beta	Cd ₄ Cd ₃	11 Cis 9 Cis	Zn/Cd/Cu	Arseniev et al., 1988
Camundongo	NMR	1ji9 1dfs 1dft	MT-3 MT-1 MT-1	alpha alpha beta	Cd ₄ Cd ₄ Cd ₃	11 Cis 11 Cis 9 Cis	Zn/Cd/Cu	Oz et al., 2001 Zangger et al., 1999 Zangger et al., 1999
Humano	NMR	1mhu 2mhu	MT-2 MT-2	alpha beta	Cd ₄ Cd ₃	11 Cis 9 Cis	Zn/Cd/Cu	Messerle et al., 1990
Ouriço-do-mar	NMR	1qjk 1qjl	- -	alpha beta	Cd ₄ Cd ₃	11 Cis 9 Cis	Cd Cd	Riek et al., 1999
Carangueijo	NMR	1dmc 1dme	MT-1 MT-1	alpha beta	Cd ₃ Cd ₃	9 Cis 9 Cis	Zn/Cd/Cu	Narula et al., 1995
Lagosta	NMR	1j5l 1j5m	MT-1 MT-1	alpha beta	Cd ₃ Cd ₃	9 Cis 9 Cis	Cd Cd	Munoz et al., 2002
Fungo	NMR	1aqr 1aoo	- -	beta beta	Cu ₇ Ag ₇	10 Cis 10 Cis	Cu Ag	Peterson et al., 1996
Bactéria	NMR	1jjd	-	alpha	Cd ₄	9Cis+2His	Cd/Zn	Blindauer et al., 2001

A segunda etapa consistiu no alinhamento das seqüências de MTs, utilizando o software ClustalW, e na verificação dos prováveis sítios de ligação. A homologia observada nas seqüências do domínio alpha (Fig. 1) apresenta a seqüência CCxCC ou CxCC, exceto para a bactéria que espacialmente comporta-se como domínio alpha porém sem homologia na seqüência de aminoácidos. O domínio beta (Fig. 2) apresenta um padrão (CxC)n, onde: C é o aminoácido

cisteína, x um aminoácido qualquer e n o número de repetições do padrão. Além disso, o posicionamento dos domínios podem variar para cada MT, o domínio alpha corresponde ao C-terminal para os mamíferos e crustáceos e N-terminal para o equinoderma. Conseqüentemente o domínio beta corresponde ao N-terminal para os mamíferos e crustáceos e C-terminal para o equinoderma (Riek et al., 1999).

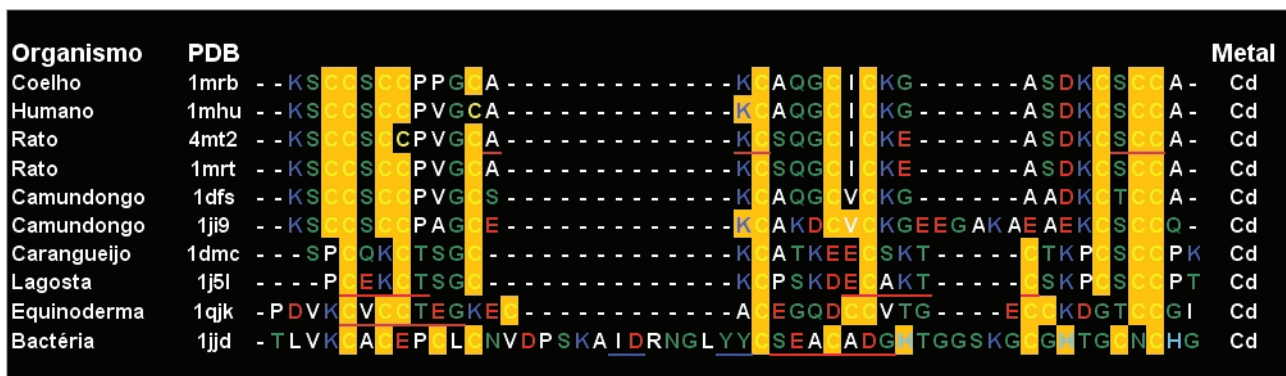


Fig.1. Alinhamento do domínio alpha. Legenda das cores: Fundo amarelo, sítio de ligação; Letras brancas, aminoácidos apolares, Letras verdes, polar sem carga; Letras vermelhas, carga negativa; Letras azuis, carga positiva; Azul-claro, histidina; Amarelo, cisteína. Os traços vermelhos correspondem às alpha hélices da estrutura e os traços azuis correspondem às folhas beta pregueadas.

Algumas informações importantes podem ser retiradas das Fig. 1 e 2, as cores com fundo amarelo correspondem aos sítios potenciais de ligação, definido pelo programa *Sting Millenium Suite* (SMS). Pode-se observar que todas as cisteínas foram responsáveis pela ligação com o metal, conforme descrito na literatura (Blindauer et al., 2001; Riek et al., 1999; Peterson et al., 1996; Braun et al., 1992; Messerle et al., 1990; Arseniev et al., 1988; Schultze et al., 1988), exceto os pdb's 1mhu e 4mt2 que não incluíram uma cisteína. Além disso, na bactéria (1jld) as duas histidinas assinaladas também estão de acordo com a referência (Blindauer et al., 2001). No entanto, os aminoácidos como a serina (S) (pdb: 2mrt), glutamina (Q) (pdb's: 1aqr e 1aoo), valina (V) (pdb: 1ji9) e lisina (K) (pdb's: 4mt2, 1mhu e 1ji9) também foram associadas ao sítio de ligação, devido à distância destes aminoácidos estarem no intervalo de 2,8 a 3,2 Å, sem no entanto participar ativamente da ligação com o íon de metal. Os domínios alpha da MT de lagosta (pdb: 1j5l), do equinoderma (pdb: 1qjk) e de rato (pdb: 4mt2) apresentaram alpha hélices, como pode ser observado nos grifos em vermelho da Fig. 1, sendo as únicas a apresentarem algum tipo de estruturas secundárias detectadas pelo software SMS. Curiosamente a MT de rato obtida por raios X com resolução de 2,0 Å (pdb: 4mt2) diferiu ligeiramente no SMS da mesma seqüência obtida por NMR (pdb: 1mrt), embora em Braun et al., (1992), as duas estruturas tenham apresentado arquiteturas moleculares idênticas.

Os alinhamentos do domínio alpha (Fig. 1) e beta (Fig. 2) apresentaram uma elevada homologia entre as MTs de mamíferos, bem como entre os crustáceos (lagosta e carangueijo). No entanto, o equinoderma (ouriço-do-mar), fungo e bactéria diferiram entre si e das demais seqüências. Este fato pode ser explicado pela distância filogenética que estes organismos apresentam. Kagi e colaboradores (Kagi et al., 1979; Kagi et al., 1987) determinaram o alinhamento de seqüências entre mamíferos, e entre crustáceos, mas não incluíram um alinhamento contendo estes dois grupos juntos, nem mesmo as bactérias e fungos. Esta informação, no entanto, é importante para justificar o fato destas seqüências serem classificadas em famílias diferentes para cada classe de organismos, mesmo quando apresentam funções semelhantes.

Finalmente, a terceira etapa consistiu na verificação do alinhamento estrutural das proteínas, incluindo a MT da *Synechococcus*. No entanto, um problema foi encontrado no decorrer desta fase. Como em sua maioria as MTs não apresentam estruturas secundárias bem determinadas, ficou muito limitada, senão inviabilizada a possibilidade de uma maior exploração desta proteína em softwares como o PrISM. Até que sejam desenvolvidas novas versões deste software, ou de qualquer outro, que permitam análises estruturais sem a informação da estrutura secundária, a análise estrutural da MT não pode ser realizada, pois o software PrISM utiliza as próprias estruturas secundárias para executar o alinhamento estrutural.

Organismo	PDB																	Metal																					
Coelho	2mrb	M	D	P	N	S	S	A	A	A	G	-	-	D	S	T	A	N	S	T	K	A	-	-	-	-	-	-	C	K	C	T	S	C	K	Cd			
Humano	2mhu	M	D	P	N	S	S	A	A	A	G	-	-	D	S	T	A	G	S	C	K	K	E	-	-	-	-	-	-	C	K	C	T	S	C	K	Cd		
Rato	4mt2	E	M	D	P	N	S	S	A	T	D	-	-	G	S	S	S	A	G	S	C	K	K	-	-	-	-	-	-	C	K	C	T	S	C	K	Cd/Zn		
Rato	2mrt	M	D	P	N	S	S	A	T	D	-	-	G	S	S	S	A	G	S	C	K	K	-	-	-	-	-	-	-	C	K	C	T	S	C	K	Cd		
Camundongo	1dft	M	D	P	N	S	S	A	T	G	-	-	G	S	T	T	S	S	A	C	K	-	-	-	-	-	-	-	-	C	K	C	T	S	C	K	Cd		
Lagosta	1j5m	P	G	P	C	C	K	D	K	E	-	-	-	A	E	G	G	K	T	S	C	K	C	T	-	-	-	-	-	C	R	C	A	-	-	-	Cd		
Carangueijo	1dme	P	G	P	C	C	N	D	K	V	-	-	-	Q	E	G	G	K	A	G	Q	Q	T	-	-	-	-	-	-	C	R	C	S	-	-	-	Cd		
Fungo	1aqr	Q	N	E	G	H	E	Q	Q	Q	G	S	-	-	K	N	N	E	Q	Q	K	S	S	C	P	T	G	-	N	S	D	D	K	P	C	G	N	-	Cu
Fungo	1aoo	Q	N	E	G	H	E	Q	Q	Q	G	S	-	-	K	N	N	E	Q	Q	K	S	S	C	P	T	G	-	N	S	D	D	K	P	C	G	N	-	Ag
Equinoderma	1qjl	I	-	-	T	N	A	A	-	-	K	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Cd	

Fig. 2. Alinhamento do domínio beta.

Conclusões

A caracterização dos sítios ativos e dos respectivos aminoácidos das MTs foram obtidos com a informação do programa SMS e comparados com a literatura. De modo geral, houve uma concordância com o tipo de aminoácido responsável pela ligação com o metal pesado, essencialmente a cisteína e no caso da bactéria também a histidina. Os alinhamentos mostraram a semelhança entre as MTs de organismos filogene-

ticamente próximos e, em contrapartida, suas diferenças perante organismos mais distantes. A demonstração do alinhamento utilizando o SMS facilita a visualização dos tipos de aminoácidos, bem como favorece a observação conjunta do sítio ativo.

Apesar da obtenção de resultados positivos, o projeto não teve continuidade por dois motivos: primeiro em virtude de dificuldades de obtenção de maior número de estruturas desta família protéica e segundo, e mais

importante, pela ausência de estrutura secundária nesta proteína, a qual seria utilizada para os alinhamentos estruturais e posteriormente verificada com a técnica da mutação sítio-dirigida num laboratório de biologia molecular. Futuramente, se um número maior de estruturas forem obtidas, talvez se possa dar continuidade ao projeto.

Glossário

Alinhamento estrutural: alinhamento das proteínas baseados na sua estrutura buscando homologia.

Biorremediação: remediação de áreas contaminadas com agentes poluidores, como os metais pesados, utilizando microrganismos.

Biorremoção: remoção de metais valiosos do ambiente utilizando microrganismos.

Estruturas secundárias: conformação que os aminoácidos assumem em uma proteína. As conformações mais comuns são as alfa-hélices e as fitas beta.

Homologia: semelhança que as seqüências de proteínas apresentam entre indivíduos de mesma origem filogenética.

Isoformas: formas diferentes que uma proteína apresenta dentro de uma mesma família.

Metais pesados: metais que apresentam densidade maior que 5 g.ml⁻¹, como o cádmio, mercúrio, zinco, cobre, prata, ouro, entre outros.

Sítio ativo: local da proteína onde ocorre a ligação com o substrato.

Referências Bibliográficas

ARSENIEV, A.; SCHULTZE, P.; WORGOTTER, E.; BRAUN, W.; WAGNER, G.; VASAK, M.; KAGI, J. H.; WUTHRICH, K. Three-dimensional structure of rabbit liver [Cd7] metallothionein-2a in aqueous solution determined by nuclear magnetic resonance. *J. Mol. Biol.*, v.201, n.3, p.637-57, 1988.

BLINDAUER, C. A.; HARRISON, M. D.; PARKINSON, J. A.; ROBINSON, A. K.; CAVET, J. S.; ROBINSON, N. J.; SADLER, P. J. A Metallothionein Containing a Zinc Finger within a Four-Metal Cluster Protects a Bacterium from Zinc Toxicity *Proc.Nat.Acad.Sci., USA*, v.98, n.17, p.9593-8, 2001.

BRAUN, W.; VASAK, M.; ROBBINS, A. H.; STOUT, C. D.; WAGNER, G.; KAGI, J. H.; WUTHRICH, K. Comparison of the NMR solution structure and the x-ray crystal structure of rat metallothionein-2. *Proc Natl Acad Sci, USA*, v.89, n.21, p.10124-8, 1992.

CHEN, S. AND WILSON, D. B. Construction and characterization of *Escherichia coli* genetically engineered for bioremediation of Hg(2+)-contaminated environments. *Appl Environ Microbiol.*, v.63, n.6, p.2442-5, 1997.

COBBETT, C.; GOLDSBROUGH, P. Phytochelatin and metallothioneins: roles in heavy metal detoxification and homeostasis. *Annu. Rev. Plant Biol.*, v.53, p.159-82, 2002.

H.M. BERMAN, J. WESTBROOK, Z. FENG, G. GILLILAND, T.N. BHAT, H. WEISSIG, I.N. SHINDYALOV, P.E. BOURNE: The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Research*, v.28, p.235-242, 2000. disponível no site <http://www.rcsb.org/pdb/>

HUCKLE J. W., MORBY, A. P., TURNER, J. S., ROBINSON N. J. Isolation of a prokaryotic metallothionein locus and analysis of transcriptional control by trace metal ion. *Mol. Microbiol.*, v.7, p.177-187, 1993.

KAGI J.H., KOJIMA Y. Chemistry and biochemistry of metallothionein. *Experientia Suppl.*, v.52, p.25-61, 1987. Review.

KAGI J.H., KOJIMA Y., KISSLING M.M., LERCH K. Metallothionein: an exceptional metal thiolate protein. *Ciba Found Symp.*, v.72, p.223-37, 1979. Review.

MESSERLE, B. A.; SCHAEFFER, A.; VASAK, M.; KAEGI, J. H. R.; WUTHRICH, K. The Three-Dimensional Structure of Human [==113==Cd=7=] Metallothionein-2 in Solution Determined by Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy *J.Mol.Biol.*, v.214, p.765-779, 1990.

MILLER C.J., ATTWOOD T.K. Opinion: Bioinformatics goes back to the future. *Nat Rev Mol Cell Biol.*, v.4, n.2, p.157-62, 2003.

MUNOZ, A.; FORSTERLING, F. H.; SHAW III, C. F.; PETERING, D. H. Structure of the 113Cd3Beta Domains from *Homarus Americanus* Metallothionein-1: Hydrogen Bonding and Solvent Accessibility of Sulfur Atoms *J.Biol.Inorg.Chem.*, v.7, n.7/8, p.713-724, 2002.

MURZIN A. G., BRENNER S. E., HUBBARD T., CHOTHIA C. SCOP: a structural classification of proteins database for the investigation of sequences and structures. *J. Mol. Biol.*, v.247, p.536-540, 1995. Disponível no site <http://scop.mrc-lmb.cam.ac.uk/scop/>

NARULA, S. S.; BROUWER, M.; HUA, Y.; ARMITAGE, I. M. Three-dimensional solution structure of *Callinectes sapidus* metallothionein-1 determined by homonuclear and heteronuclear magnetic resonance spectroscopy. *Biochemistry*, v.34, n.2, p.620-31, 1995.

NCBI, 2003. Acessado em janeiro de 2003, no endereço: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

- NELSON *et al.*, *J. Environmental Microbiology* 4: 799-808 (2002). Disponível no site: <http://www.tigr.org/tdb/mdb/mdbcomplete.html>
- NESHICH G., TOGAWA R., VILELLA W. AND HONIG B. STING (Sequence To and withIN Graphics) PDB_Viewer. *Protein Data Bank Quarterly Newsletter*, v.84, July, 1998.
- OZ, G.; ZANGGER, K.; ARMITAGE, I. M. Three-Dimensional Structure and Dynamics of a Brain Specific Growth Inhibitory Factor: Metallothionein-3. *Biochemistry*, v.40, n.38, p.11433-41, 2001.
- PETERSON, C. W.; NARULA, S. S.; ARMITAGE, I. M. 3D solution structure of copper and silver-substituted yeast metallothioneins. *FEBS Lett.*, v.379, n.1, p.85-93, 1996.
- RIEK, R.; PRECHEUR, B.; WANG, Y.; MACKAY, E. A.; WIDER, G.; GUNTERT, P.; LIU, A.; KAEGI, J. H. R.; WUTHRICH, K. NMR Structure of the Sea Urchin (*Strongylocentrotus Purpuratus*) Metallothionein Mta. *J.Mol.Biol.*, v.291, n.2, p.417-28, 1999.
- ROBINSON N. J., WHITEHALL S. K., CAVET J. S. Microbial Metallothioneins. *Adv. Microb. Physiol.*, v.44, p.183-213, 2001.
- ROMERO-ISART, N. AND VASAK, M. Advances in the structure and chemistry of metallothioneins. *J Inorg Biochem.*, v.88, n.3/4, p.388-96, 2002.
- SCHULTZE, P.; WORGOTTER, E.; BRAUN, W.; WAGNER, G.; VASAK, M.; KAGI, J. H.; WUTHRICH, K. Conformation of [Cd7]-metallothionein-2 from rat liver in aqueous solution determined by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J Mol Biol.*, v.203, n.1, p.251-68, 1988.
- SHIMIZU T. T., HIYAM T., IKEUCHI M., INOUE Y. Nucleotide sequence of a metallothionein gene of the thermophilic cyanobacterium *Synechococcus vulcans*. *Plant Mol. Biol.*, v.20, p.565-567, 1992.
- SRIPRANG, R.; HAYASHI, M.; YAMASHITA, M.; ONO, H.; SAEKI, K.; MUROOKA, Y. A novel bioremediation system for heavy metals using the symbiosis between leguminous plant and genetically engineered rhizobia. *J Biotechnol.*, v.99, n.3, p.279-93, 2002.
- STOVER, K.C., X.Q. PHAM, A.L. ERWIN, *et al.* Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1: an opportunistic pathogen. *Nature*, v.406, p.959-964, 2000. Disponível no site: <http://www.pseudomonas.com>
- TAKAKAZU K.; YASUKAZU N.; WOLK C. P. *et al.* DNA Research *in press*. Disponível no site: <http://www.kazusa.or.jp/cyano/>
- THOMPSON J.D., HIGGINS, D.G. AND GIBSON, T.J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, v.22, p.4673-4680, 1994.
- VALLS, M.; ATRIAN, S.; DE LORENZO, V.; FERNANDEZ, L. A. Engineering a mouse metallothionein on the cell surface of *Ralstonia eutropha* CH34 for immobilization of heavy metals in soil. *Nat Biotechnol.*, v.18, n.6, p.661-5, 2000.
- VALLS, M.; BOFILL, R.; GONZALEZ-DUARTE, R.; GONZALEZ-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.*, v.276, n.35, p.32835-43, 2001.
- WINGE, D. R.; NIELSON, K. B.; GRAY, W. R.; HAMER, D. H. Yeast metallothionein. Sequence and metal-binding properties. *J Biol Chem.*, v.260, n.27, p.14464-70, 1985.
- YANG, A. S. & HONIG, B. Sequence to structure alignment in comparative modeling using PrISM. *Proteins Suppl.*, v.3, p.66-72, 1999.
- YOSHIDA, N.; KATO, T.; YOSHIDA, T.; OGAWA, K.; YAMASHITA, M.; MUROOKA, Y. Bacterium-based heavy metal biosorbents: enhanced uptake of cadmium by *E. coli* expressing a metallothionein fused to beta-galactosidase. *Biotechnique*, v.32, n.3, p.551-6, 2002.
- ZANGGER, K.; OZ, G.; OTVOS, J. D.; ARMITAGE, I. M. Three-Dimensional Solution Structure of Mouse [Cd7]-Metallothionein-1 by Homonuclear and Heteronuclear NMR Spectroscopy *Protein Sci.*, v.8, n.12, p.2630-8, 1999.

Comunicado Técnico, 43

Embrapa Informática Agropecuária Área de Comunicação e Negócios (ACN)

Av. André Tosello, 209
Cidade Universitária - "Zeferino Vaz"
Barão Geraldo - Caixa Postal 6041
13083-970 - Campinas, SP
Telefone (19) 3789-5743 - Fax (19) 3289-9594
e-mail: sac@cnptia.embrapa.br

1ª edição

2002 - on-line
Todos os direitos reservados

Comitê de Publicações

Presidente: José Ruy Porto de Carvalho
Membros efetivos: Amarindo Fausto Soares, Ivanilde Dispatto, Luciana Alvim Santos Romani, Marcia Izabel Fugisawa Souza, Suzilei Almeida Carneiro
Suplentes: Adriana Delfino dos Santos, Fábio Cesar da Silva, João Francisco Gonçalves Antunes, Maria Angélica de Andrade Leite, Moacir Pedroso Júnior

Expeditente

Supervisor editorial: Ivanilde Dispatto
Normalização bibliográfica: Marcia Izabel Fugisawa Souza
Capa: Intermídia Publicações Científicas
Editoração Eletrônica: Intermídia Publicações Científicas