

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA  
MOLECULAR

CARACTERIZACIÓN DE TRANSPORTADORES DE COBRE  
DE *ARABIDOPSIS THALIANA*: EFECTOS DE LA  
ALTERACIÓN DE SU EXPRESIÓN EN PLANTAS  
TRANSGÉNICAS

NURIA ANDRÉS COLÁS

UNIVERSITAT DE VALENCIA  
Servei de Publicacions  
2008

Aquesta Tesi Doctoral va ser presentada a València el dia 31 de Gener de 2008 davant un tribunal format per:

- D<sup>a</sup>. Carlota Poschenrieder Wiens
- D. Luis Carlos Romero González
- D<sup>a</sup>. Inmaculada Yruela Guerrero
- D. Fernando Aniento Company
- D<sup>a</sup>. Amparo Sanz Grau

Va ser dirigida per:

D<sup>a</sup>. Lola Peñarrubia Blasco

©Copyright: Servei de Publicacions  
Nuria Andrés Colás

---

Depòsit legal:

I.S.B.N.:978-84-370-7071-1

Edita: Universitat de València  
Servei de Publicacions  
C/ Artes Gráficas, 13 bajo  
46010 València  
Spain  
Telèfon: 963864115



UNIVERSITAT DE VALÈNCIA

Departament de Bioquímica i Biologia Molecular

# **Caracterización de transportadores de cobre de *Arabidopsis thaliana*:**

**EFFECTOS DE LA ALTERACIÓN DE SU EXPRESIÓN  
EN PLANTAS TRANSGÉNICAS**

**Nuria Andrés Colás**

**2007**



VNIVERSITAT ID VALÈNCIA

Departament de Bioquímica i Biologia Molecular

# **Caracterización de transportadores de cobre de *Arabidopsis thaliana*:**

**EFFECTOS DE LA ALTERACIÓN DE SU EXPRESIÓN  
EN PLANTAS TRANSGÉNICAS**

Memoria presentada por

**Nuria Andrés Colás**

para optar al grado de

**Doctora en Bioquímica**

Directora

**Lola Peñarrubia Blasco**



Valencia, 25 de Julio de 2007

LOLA PEÑARRUBIA BLASCO, Doctora en Ciencias Biológicas y Profesora Titular del *Departamento de Bioquímica y Biología Molecular* de la *Universitat de València*.

CERTIFICA: que la Licenciada en Bioquímica **NURIA ANDRÉS COLÁS** ha realizado, bajo su dirección y en el *Laboratorio de Plantas* del mencionado departamento, el trabajo titulado “Caracterización de transportadores de cobre de *Arabidopsis thaliana*: efectos de la alteración de su expresión en plantas transgénicas”.

para que así conste, firmo la presente.

Fdo. Lola Peñarrubia Blasco

VNIVERSITAT  
DE VALÈNCIA

Este trabajo ha sido realizado en el *Laboratorio de Plantas* de la *Universitat de València*, gracias a la beca predoctoral de *Formación de Personal Investigador* (FPI) *BES-2003-0158* asociada al proyecto *BIO2002-01125* del *Ministerio de Ciencia y Tecnología*. Financiación con cargo a la aplicación presupuestaria 20.10.542M.783 y, en su caso, con las aportaciones procedentes del *Fondo Social Europeo*, en el marco del programa nacional de potenciación de recursos humanos del *Plan Nacional de Investigación Científica, Desarrollo e Innovación Tecnológica*.

Agradecemos a los siguientes investigadores, laboratorios y servicios, la ayuda prestada en diferentes partes del trabajo experimental de esta Tesis:

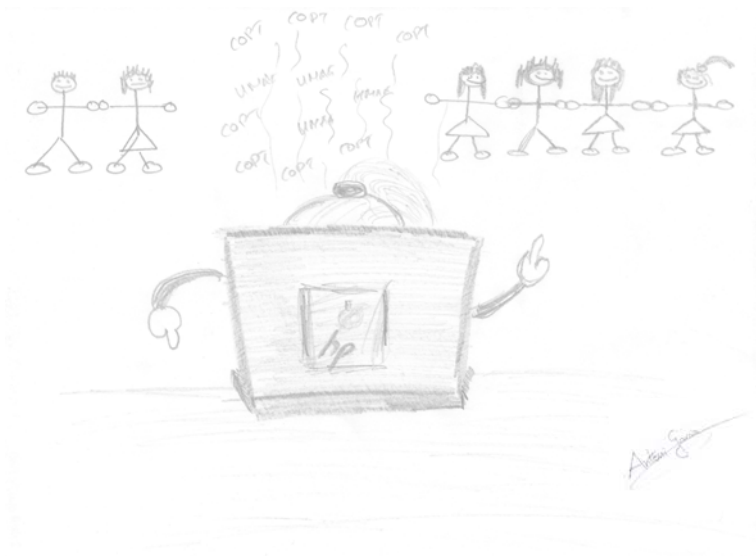
- *Servei Central de Suport a la Investigació Experimental* (SCSIE) de la *Universitat de València*, por el servicio de espectroscopia de absorción atómica, microscopía confocal y secuenciación.

- Dr. Sergi Puig de la *Universitat de València*, por la ayuda prestada en los experimentos de complementación de levadura. Dr. Vicente Sancenón, por la obtención de los mutantes por inserción de T-DNA en el gen *HMA5*, durante una estancia en el laboratorio del Dr. Joseph Ecker (*Salk Institute*). Así como a todos los miembros del *Grupo de Homeostasis de Cobre y Hierro* durante estos años que han participado en el desarrollo de esta Tesis.

- Dr. Miguel Ángel Pérez-Amador y Dra. Eavan Dorcey del *Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas* (IBMCP, *UPV-CSIC*, Valencia), por su colaboración en los experimentos de micromatrices de DNA.

- Dr. Marinus Pilon y todo el grupo de investigación del *Pilon-Smits Lab* del *Department of Biology* de *Colorado State University*, por permitir y apoyar una estancia en su laboratorio, en la que se realizó gran parte de la caracterización de COPT3.

- Dra. Nathalie Verbruggen del *Laboratoire de Physiologie et Génétique Moléculaire des Plantes* de la *Université Libre de Bruxelles*, por facilitarnos el mutante por sobreexpresión de *TcMT3*.



A Lola, por ofrecerme la oportunidad de trabajar con ella y hacerme disfrutar tanto de todo esto, por contagiarme su ilusión por el trabajo del día a día y animarme en todo momento, por enseñarme tantas cosas, por abrirme los ojos.

Y por supuesto, a todos aquellos con los que me he cruzado por el camino y con los que he compartido cada instante de todo este tiempo, tanto dentro como fuera del laboratorio, que habéis hecho que esto sea posible, por hacer que haya merecido la pena y, sobre todo, por hacerme feliz cada día.

A mi familia,  
por todo lo vivido y compartido...  
porque la admiro...  
porque siempre le estaré agradecida.



---

# ÍNDICE

## CONTENIDOS

ABREVIATURAS .....	1
--------------------	---

<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>5</b>
---------------------------	----------

<b>1. La bioquímica del cobre .....</b>	<b>7</b>
---	----------

1.1. La esencialidad del cobre .....	7
--------------------------------------	---

1.2. La citotoxicidad del cobre .....	11
---------------------------------------	----

<b>2. La homeostasis del cobre en plantas .....</b>	<b>13</b>
---	-----------

2.1. El transporte a larga distancia .....	13
--	----

2.1.1. Biodisponibilidad y movilización del cobre del suelo .....	12
---	----

2.1.2. Absorción del cobre por la raíz .....	15
--	----

2.1.3. Distribución del cobre a los órganos destino .....	17
---	----

2.1.3.1. Transporte del cobre en el xilema .....	17
--	----

2.1.3.2. Transporte del cobre en el floema .....	18
--	----

2.2. La homeostasis del cobre en <i>Arabidopsis</i> .....	20
---	----

2.2.1. La incorporación a través de la membrana plasmática .....	23
--	----

2.2.2. La distribución intracelular .....	26
---	----

2.2.2.1. Las carabinas moleculares .....	26
--	----

2.2.2.2. Los transportadores de membranas intracelulares .....	29
--	----

2.2.3. Los sistemas de destoxificación .....	32
--	----

2.2.3.1. Compuestos y enzimas antioxidantes .....	32
---	----

2.2.3.2. Sistemas de secuestro o inmovilización .....	33
---	----

2.2.3.3. Compartimentación .....	34
----------------------------------	----

<b>3. Respuesta a los niveles de cobre en plantas .....</b>	<b>35</b>
---	-----------

3.1. Síntomas de deficiencia de cobre y mecanismos de resistencia .....	35
---	----

3.2. Síntomas de toxicidad del cobre y mecanismos de tolerancia .....	41
---	----

<b>4. Aplicaciones biotecnológicas de la homeostasis del cobre .....</b>	<b>44</b>
--	-----------

<b>OBJETIVOS</b> .....	47
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	51
<b>1. Material Biológico</b> .....	53
1.1. Manipulación de bacterias .....	53
1.1.1. Condiciones de crecimiento y transformación de <i>Escherichia coli</i> .....	53
1.1.2. Condiciones de crecimiento y transformación de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	53
1.2. Manipulación de levadura .....	54
1.2.1. Condiciones de crecimiento y transformación de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	54
1.2.2. Complementación funcional .....	55
1.3. Manipulación de plantas .....	55
1.3.1. Condiciones de crecimiento y tratamiento de <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	55
1.3.2. Transformación y cruce de plantas transgénicas .....	57
1.3.3. Obtención y transformación de protoplastos de <i>Arabidopsis thaliana</i> . Detección de señal GFP .....	58
<b>2. Aislamiento y análisis de ácidos nucleicos</b> .....	59
2.1. Aislamiento de ácidos nucleicos .....	59
2.2. Técnicas para el análisis de los ácidos nucleicos .....	60
2.2.1. Electroforesis de DNA y purificación de bandas .....	60
2.2.2. Electroforesis de RNA .....	61
2.2.3. RT-PCR semicuantitativa .....	61
2.2.4. Micromatrices de DNA .....	63
2.2.5. Análisis de secuencias .....	64
2.3. Diseño de construcciones .....	65
2.3.1. Reacciones enzimáticas .....	65
2.3.2. Sobreexpresión génica en <i>Arabidopsis</i> e inmunolocalización mediante el epítipo HA .....	66
2.3.3. Localización subcelular en <i>Arabidopsis</i>	

mediante el gen testigo <i>GFP</i> .....	68
2.3.4. Complementación funcional en levadura .....	70
2.4. Identificación de plantas mutantes por inserción de T-DNA	
en homocigosis .....	70
<b>3. Aislamiento y análisis de proteínas</b> .....	72
3.1. Extracción de proteínas totales y fraccionamiento subcelular .....	72
3.2. Electroforesis de proteínas y tinción del gel .....	73
3.3. Transferencia de geles de proteínas a membrana	
e inmunodetección .....	74
<b>4. Técnicas para el estudio de las plantas</b> .....	75
4.1. Medida del peso fresco y de la longitud de la raíz de plántulas .....	75
4.2. Determinación del contenido endógeno de cobre en plántulas .....	76
4.3. Análisis semicuantitativo de la actividad superóxido dismutasa .....	76
4.4. Análisis semicuantitativo de la plastocianina .....	77
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	79
<b>1. Respuesta a diferentes niveles de cobre en <i>Arabidopsis</i></b> .....	81
1.1. Elección de los niveles de cobre de estudio .....	83
1.2. Análisis de la respuesta génica al cobre en <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	86
1.2.1. Cambios de expresión de los genes	
de la homeostasis del cobre .....	87
1.2.2. Procesos moleculares diferencialmente expresados .....	89
1.2.2.1. Procesos diferencialmente activados	
en exceso de cobre .....	90
1.2.2.2. Procesos diferencialmente activados	
en déficit de cobre .....	96
1.2.2.3. Alteración por cobre del ritmo circadiano .....	106
1.2.3. Resumen de los tipos de respuesta .....	109
<b>2. La ATPasa tipo P transportadora de cobre HMA5</b> .....	115
2.1. Descripción de HMA5 en <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	117
2.2. Estudio de la expresión del gen <i>HMA5</i> en <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	120
2.2.1. Análisis teórico de la secuencia promotora de HMA5 .....	120

2.2.2. Estudio del patrón de expresión por órganos del gen HMA5 .....	123
2.2.3. Estudio de la regulación por cobre de la expresión del gen HMA5 .....	124
2.2.4. Estudio de la regulación durante la senescencia y por agentes oxidantes de la expresión del gen HMA5 .....	126
<b>2.3. Estudio de la función de HMA5 en <i>Arabidopsis thaliana</i></b>	
<b>mediante pérdida de su expresión .....</b>	<b>128</b>
2.3.1. Obtención de líneas mutantes por inserción de T-DNA en el gen HMA5 .....	128
2.3.1.1. Identificación de las líneas con inserción de T-DNA en HMA5 y mapeo de la inserción .....	128
2.3.1.2. Identificación de plantas homocigotas y comprobación de la pérdida de expresión de HMA5 .....	129
2.3.2. Caracterización fenotípica de las líneas mutantes hma5 .....	131
2.3.2.1. Estudio de la sensibilidad al cobre .....	131
2.3.2.2. Análisis del contenido endógeno de cobre en plántulas ..	137
<b>3. El transportador de cobre de alta afinidad COPT3 .....</b>	<b>143</b>
<b>3.1. Estudio de la expresión del gen COPT3 en <i>Arabidopsis thaliana</i> .....</b>	<b>146</b>
3.1.1. Análisis teórico de la secuencia promotora de COPT3 .....	146
3.1.2. Estudio del patrón de expresión por órganos del gen COPT3 ....	149
<b>3.2. Construcción de las fusiones utilizadas para la caracterización de COPT3 .....</b>	<b>151</b>
3.2.1. Fusión CaMV35S::COPT3-HA .....	151
3.2.2. Fusión CaMV35S::COPT3-GFP .....	152
<b>3.3. Localización subcelular de COPT3 en <i>Arabidopsis thaliana</i> .....</b>	<b>153</b>
3.3.1. Inmunolocalización mediante el epítipo HA .....	153
3.3.2. Localización subcelular mediante el gen testigo GFP .....	157
<b>3.4. Estudio de la función de COPT3 en <i>Arabidopsis thaliana</i></b>	
<b>mediante su sobreexpresión .....</b>	<b>159</b>
3.4.1. Obtención de líneas transgénicas sobreexpresoras de COPT3 mediante el promotor constitutivo del gen CaMV35S .....	159
3.4.2. Caracterización fenotípica de las líneas transgénicas	

<i>sobrexpresoras de COPT3</i> .....	160
3.4.2.1. Descripción del fenotipo en sustrato vegetal .....	160
3.4.2.2. Estudio de la sensibilidad al cobre .....	162
3.4.2.3. Análisis del contenido endógeno de cobre en plántulas y semillas .....	164
<b>4. El transportador de cobre de alta afinidad COPT1</b> .....	169
<b>4.1. Construcción de las fusiones utilizadas para la caracterización de COPT1</b> .....	171
4.1.1. Fusión <i>CaMV35S::COPT1-GFP</i> .....	171
4.1.2. Fusión <i>CaMV35S::COPT1-HA</i> .....	173
<b>4.2. Localización subcelular de COPT1</b> .....	174
<b>4.3. Estudio de la función de COPT1 en <i>Arabidopsis thaliana</i> mediante su sobreexpresión</b> .....	176
4.3.1. Obtención de líneas transgénicas sobreexpresoras de COPT1 mediante el promotor constitutivo del gen <i>CaMV35S</i> .....	176
4.3.2. Caracterización fenotípica de las líneas transgénicas <i>sobrexpresoras de COPT1</i> .....	178
4.3.2.1. Estudio de la sensibilidad al cobre .....	178
4.3.2.2. Análisis del contenido endógeno de cobre en plántulas ..	182
4.3.2.3. Descripción del fenotipo en sustrato vegetal .....	185
<b>4.4. Obtención de plantas transgénicas con posibles aplicaciones biotecnológicas en fitorremediación</b> .....	188
4.4.1. Cruce de líneas transgénicas <i>sobrexpresoras de COPT1 y de TcMT3</i> .....	188
4.4.2. Caracterización fenotípica de las líneas transgénicas <i>sobrexpresoras de COPT1 y TcMT3</i> .....	191
4.4.2.1. Descripción del fenotipo en sustrato vegetal .....	191
4.4.2.2. Análisis del contenido endógeno de cobre en plántulas ..	193
4.4.2.3. Estudio de la tolerancia al cobre .....	194
<b>CONCLUSIONES</b> .....	197
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	203

**TABLAS**

<b>Tabla I.1.</b>	Resumen de las características de algunas de las principales proteínas de cobre .....	10
<b>Tabla I.2.</b>	Componentes de la homeostasis del Cu en levadura y <i>Arabidopsis</i> .....	21
<b>Tabla I.3.</b>	Clasificación de los componentes de la subfamilia HMA de ATPasas tipo P .....	30
<b>Tabla M.1.</b>	Oligonucleótidos utilizados para seleccionar por PCR las plantas resultado del cruce 35S::COPT1-HA x 35S::TcMT3 .....	58
<b>Tabla M.2.</b>	Oligonucleótidos utilizados para medir los niveles relativos de expresión de HMA5, COPT1 y COPT3 por RT-PCR semicuantitativa .....	62
<b>Tabla M.3.</b>	Oligonucleótidos utilizados para amplificar por PCR los genes a sobreexpresar .....	66
<b>Tabla M.4.</b>	Oligonucleótidos utilizados para amplificar por PCR los genes a etiquetar con la proteína GFP .....	68
<b>Tabla M.5.</b>	Vectores de procedencia y enzimas de restricción utilizadas para la inserción de las construcciones de interés en el vector de expresión en levadura p426GPD .....	70
<b>Tabla M.6.</b>	Oligonucleótidos utilizados para identificar la inserción de T-DNA en el gen HMA5 .....	71
<b>Tabla M.7.</b>	Anticuerpos utilizados en la inmunodetección de proteínas en membrana .....	75
<b>Tabla R.1.1.</b>	Respuesta génica de componentes de la homeostasis del Cu a diferentes niveles de Cu en <i>Arabidopsis</i> .....	88
<b>Tabla R.1.2.</b>	Respuesta génica de los posibles mecanismos contra el estrés hídrico y salino a un exceso de Cu en <i>Arabidopsis</i> .....	91
<b>Tabla R.1.3.</b>	Respuesta génica de los posibles mecanismos de reparación y modificación del DNA a un exceso de Cu en <i>Arabidopsis</i> .....	93
<b>Tabla R.1.4.</b>	Respuesta génica de los posibles mecanismos de división celular a un exceso de Cu en <i>Arabidopsis</i> .....	94
<b>Tabla R.1.5.</b>	Respuesta génica de las rutas de señalización a un exceso de Cu en <i>Arabidopsis</i> .....	96
<b>Tabla R.1.6.</b>	Respuesta génica de los posibles mecanismos contra el estrés por patógenos a un déficit de Cu en <i>Arabidopsis</i> .....	97
<b>Tabla R.1.7.</b>	Respuesta génica de los posibles mecanismos de expansión celular a un déficit de Cu en <i>Arabidopsis</i> .....	98
<b>Tabla R.1.8.</b>	Respuesta génica del metabolismo del azufre a un déficit de Cu en <i>Arabidopsis</i> .....	100
<b>Tabla R.1.9.</b>	Respuesta génica del metabolismo del Fe a un déficit de Cu en <i>Arabidopsis</i> .....	102
<b>Tabla R.1.10.</b>	Respuesta génica de las rutas de señalización a un déficit de Cu en <i>Arabidopsis</i> .....	104
<b>Tabla R.1.11.</b>	Respuesta génica de los miRNAs a un déficit de Cu en <i>Arabidopsis</i> .....	106
<b>Tabla R.1.12.</b>	Respuesta génica del reloj circadiano a diferentes niveles de Cu en <i>Arabidopsis</i> .....	109
<b>Tabla R.1.13.</b>	Resumen de los procesos de respuesta a diferentes niveles de Cu en <i>Arabidopsis</i> .....	110

**FIGURAS**

<b>Figura I.1.</b>	Esquema del transporte radial de nutrientes en la raíz .....	17
<b>Figura I.2.</b>	Esquema de los componentes de la homeostasis del Cu que participan en el transporte del metal entre los haces conductores y las células de <i>Arabidopsis</i> .....	20
<b>Figura I.3.</b>	Modelo de la homeostasis intracelular del Cu en <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	22
<b>Figura I.4.</b>	Esquema de la topología de la familia CTR/COPT de transportadores de Cu de alta afinidad .....	24
<b>Figura I.5.</b>	Modelo de la regulación transcripcional mediada por CRR1 .....	39
<b>Figura I.6.</b>	Modelo de la regulación postranscripcional mediada por el miRNA 398 .....	40
<b>Figura M.1.</b>	Diseño de la construcción para la sobreexpresión de <i>COPT1</i> y <i>COPT3</i> en <i>Arabidopsis</i> .....	67
<b>Figura M.2.</b>	Diseño de la construcción para la localización subcelular de <i>COPT1</i> y <i>COPT3</i> en <i>Arabidopsis</i> .....	69
<b>Figura M.3.</b>	Representación de la estrategia de PCR utilizada para determinar el genotipo de las líneas mutantes por inserción de T-DNA .....	71
<b>Figura R.1.1.</b>	Fenotipo de las raíces de plántulas de <i>Arabidopsis</i> en medios con diferentes concentraciones de Cu .....	84
<b>Figura R.1.2.</b>	Niveles de Cu endógeno en plántulas de <i>Arabidopsis</i> crecidas en medios con diferentes concentraciones de Cu .....	86
<b>Figura R.1.3.</b>	Niveles de expresión génica de componentes de la homeostasis del Cu en las diferentes concentraciones de Cu .....	89
<b>Figura R.1.4.</b>	Modelo de la ruta de biosíntesis de glucosinolatos alifáticos modificados a partir de metionina en <i>Arabidopsis</i> .....	101
<b>Figura R.1.5.</b>	Modelo del sistema circadiano en <i>Arabidopsis</i> .....	108
<b>Figura R.1.6.</b>	Rutas prioritarias y sustitución de proteínas en el cloroplasto, según los niveles de Cu .....	111
<b>Figura R.1.7.</b>	Transportadores de Cu activados, según los niveles de Cu .....	112
<b>Figura R.2.1.</b>	Esquema de la estructura primaria y la topología de las ATPasas tipo P transportadoras de Cu .....	119
<b>Figura R.2.2.</b>	Secuencia de nucleótidos de la región promotora de <i>HMA5</i> y de sus elementos reguladores .....	121
<b>Figura R.2.3.</b>	Patrón de expresión por órganos de <i>HMA5</i> .....	124
<b>Figura R.2.4.</b>	Regulación por Cu de la expresión de <i>HMA5</i> .....	125
<b>Figura R.2.5.</b>	Regulación durante la senescencia y por agentes oxidantes de la expresión de <i>HMA5</i> .....	127
<b>Figura R.2.6.</b>	Esquema de los sitios de inserción de T-DNA en el gen <i>HMA5</i> en las plantas mutantes <i>hma5-1</i> y <i>hma5-2</i> .....	129
<b>Figura R.2.7.</b>	Genotipado de las plantas mutantes <i>hma5-1</i> y <i>hma5-2</i> .....	130
<b>Figura R.2.8.</b>	Comprobación de la pérdida de expresión de <i>HMA5</i> en las plantas mutantes <i>hma5-1</i> y <i>hma5-2</i> .....	131
<b>Figura R.2.9.</b>	Fenotipo de las plántulas mutantes <i>hma5</i> en presencia de Cu .....	132
<b>Figura R.2.10.</b>	Cuantificación y especificidad del efecto del Cu sobre el peso fresco de las plántulas mutantes <i>hma5</i> .....	133
<b>Figura R.2.11.</b>	Fenotipo de las raíces de las plántulas mutantes <i>hma5</i> en presencia de Cu ..	134
<b>Figura R.2.12.</b>	Cuantificación del efecto del Cu en el crecimiento de las raíces de las plántulas mutantes <i>hma5</i> .....	135
<b>Figura R.2.13.</b>	Niveles de Cu endógeno en las raíces y la parte aérea de las plántulas mutantes <i>hma5</i> .....	138

<b>Figura R.3.1.</b>	Esquema de la región promotora de <i>COPT1</i> y <i>COPT3</i> , y de sus elementos reguladores .....	146
<b>Figura R.3.2.</b>	Secuencia de nucleótidos de la región promotora de <i>COPT3</i> y de sus elementos reguladores .....	149
<b>Figura R.3.3.</b>	Patrón de expresión por órganos de <i>COPT3</i> .....	150
<b>Figura R.3.4.</b>	Funcionalidad de la construcción <i>COPT3-HA</i> en levadura .....	152
<b>Figura R.3.5.</b>	Funcionalidad de la construcción <i>COPT3-GFP</i> en levadura .....	153
<b>Figura R.3.6.</b>	Niveles de HA en las plantas sobrexpresoras de <i>COPT3</i> .....	154
<b>Figura R.3.7.</b>	Inmunolocalización de la proteína <i>COPT3</i> .....	155
<b>Figura R.3.8.</b>	Análisis de la PC y de las actividades SOD en las plantas sobrexpresoras de <i>COPT3</i> .....	156
<b>Figura R.3.9.</b>	Localización subcelular de <i>COPT3</i> .....	158
<b>Figura R.3.10.</b>	Fenotipo de las plantas sobrexpresoras de <i>COPT3</i> en sustrato vegetal .....	161
<b>Figura R.3.11.</b>	Fenotipo de las plántulas sobrexpresoras de <i>COPT3</i> en presencia de Cu ....	162
<b>Figura R.3.12.</b>	Cuantificación del efecto del Cu en el crecimiento de las raíces de las plántulas sobrexpresoras de <i>COPT3</i> .....	163
<b>Figura R.3.13.</b>	Niveles de Cu endógeno en las plántulas sobrexpresoras de <i>COPT3</i> .....	164
<b>Figura R.3.14.</b>	Niveles de expresión del gen <i>CSD1</i> como indicador de la cantidad de Cu, en las plantas sobrexpresoras de <i>COPT3</i> .....	165
<b>Figura R.3.15.</b>	Niveles de Cu endógeno en las plántulas y semillas sobrexpresoras de <i>COPT3</i> .....	166
<b>Figura R.4.1.</b>	Funcionalidad de la construcción <i>COPT1-GFP</i> en levadura .....	172
<b>Figura R.4.2.</b>	Funcionalidad de la construcción <i>COPT1-HA</i> en levadura .....	174
<b>Figura R.4.3.</b>	Localización subcelular de <i>COPT1</i> .....	175
<b>Figura R.4.4.</b>	Niveles de HA en las plantas sobrexpresoras de <i>COPT1</i> .....	176
<b>Figura R.4.5.</b>	Regulación por metales de la expresión de <i>COPT1</i> .....	177
<b>Figura R.4.6.</b>	Niveles de expresión de <i>COPT1</i> en las plantas sobrexpresoras de <i>COPT1</i> en deficiencia y exceso de Cu .....	178
<b>Figura R.4.7.</b>	Fenotipo de las raíces de las plántulas sobrexpresoras de <i>COPT1</i> en presencia de Cu .....	179
<b>Figura R.4.8.</b>	Cuantificación del efecto del Cu en el crecimiento de las raíces de las plántulas sobrexpresoras de <i>COPT1</i> .....	180
<b>Figura R.4.9.</b>	Cuantificación y especificidad del efecto del Cu sobre el peso fresco de las plántulas sobrexpresoras de <i>COPT1</i> .....	181
<b>Figura R.4.10.</b>	Niveles de Cu endógeno en las plántulas sobrexpresoras de <i>COPT1</i> .....	183
<b>Figura R.4.11.</b>	Niveles de expresión de genes indicadores de la cantidad de Cu, en las plantas sobrexpresoras de <i>COPT1</i> .....	184
<b>Figura R.4.12.</b>	Fenotipo de las plantas sobrexpresoras de <i>COPT1</i> en sustrato vegetal .....	186
<b>Figura R.4.13.</b>	Detección de las construcciones de interés en las plantas sobrexpresoras de <i>COPT1</i> y <i>TcMT3</i> .....	190
<b>Figura R.4.14.</b>	Comprobación de la sobreexpresión de <i>COPT1</i> en las plantas sobrexpresoras de <i>COPT1</i> y <i>TcMT3</i> .....	190
<b>Figura R.4.15.</b>	Fenotipo de las plantas sobrexpresoras de <i>COPT1</i> y <i>TcMT3</i> en sustrato vegetal .....	192
<b>Figura R.4.16.</b>	Niveles de Cu endógeno en las plántulas sobrexpresoras de <i>COPT1</i> y <i>TcMT3</i> .....	193
<b>Figura R.4.17.</b>	Fenotipo de las raíces de las plántulas sobrexpresoras de <i>COPT1</i> y <i>TcMT3</i> en presencia de Cu .....	194
<b>Figura R.4.18.</b>	Esquema de la aplicación biotecnológica de la sobreexpresión de <i>COPT1</i> y <i>TcMT3</i> .....	195



---

# ABREVIATURAS

A <sub>260</sub>	absorbancia a una longitud de onda de 260 nm
aa	aminoácido
ABA	del inglés <i>abscisic acid</i>
ABRE	del inglés <i>ABA-responsive elements</i>
ACBP	del inglés <i>acylCoA binding protein</i>
ACP	del inglés <i>acyl carrier protein</i>
AHA	del inglés <i>Arabidopsis H<sup>+</sup>-ATPase</i>
Amp	ampicilina
AP2	apetala 2
APX	ascorbato peroxidasa
AREB/ABF	del inglés <i>ABA-responsive element binding protein/ABRE binding factor</i>
aRNA	del inglés <i>amplified RNA</i>
<i>At</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
ATP	del inglés <i>adenosine triphosphate</i>
Atx1	proteína antioxidante 1
AUR	aurora
BSA	del inglés <i>bovine serum albumin</i>
<i>CaMV35S</i>	del inglés <i>Cauliflower Mosaic Virus 35S</i>
CAT	catalasa
CCA1	del inglés <i>circadian clock associated 1</i>
Ccc2	del inglés <i>calcium-sensitive cross complementation 2</i>
CCH	del inglés <i>copper chaperone</i>
Ccs	del inglés <i>copper chaperone for superoxide dismutase</i>
CDK	del inglés <i>cyclin-dependent kinases</i>
cDNA	del inglés <i>complementary DNA</i>
CDPK	del inglés <i>Ca<sup>2+</sup>-dependent protein kinases</i>
Col 0	<i>Columbia 0</i>
COPT	del inglés <i>copper transporter</i>
COR	del inglés <i>cold regulated</i>
COX	citocromo c oxidasa
Cox17	citocromo oxidasa 17
CpNifS	cisteína desulfurasa cloroplástica
CRR1	del inglés <i>copper response regulator 1</i>
CSD	del inglés <i>Cu/Zn superoxide dismutase</i>
CSL	del inglés <i>cellulose synthase-like</i>
CTR	del inglés <i>copper transporter</i>
CuRE	del inglés <i>Cu responsive element</i>
CUTA	del inglés <i>Cu tolerance mutant A</i>
Cy	del inglés <i>cyanine</i>
CYC6	del inglés <i>cytochrome c6</i>
DNA	del inglés <i>deoxyribonucleic acid</i>
dNTPs	del inglés <i>deoxynucleotide triphosphates</i>
DRE/CRT	del inglés <i>dehydration-responsive element/C-Repeat</i>
DREB	del inglés <i>DRE binding protein</i>
DSB	del inglés <i>DNA double-strand break</i>
DTT	ditiotreitól
<i>Ec</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	del inglés <i>ethylenediamine tetraacetic acid</i>

EGTA	del inglés <i>ethylene glycol tetraacetic acid</i>
ERD	del inglés <i>early response to dehydration</i>
ETR1	del inglés <i>ethylene response 1</i>
FRD3	del inglés <i>ferric reductase defective 3</i>
FRO	del inglés <i>ferric reductase oxidase</i>
FSD	del inglés <i>Fe superoxide dismutase</i>
GFP	del inglés <i>green fluorescence protein</i>
GI	gigantea
GSH	glutación
GSL	glucosinolato
GST	glutación S-transferasa
GUS	$\beta$ -glucuronidasa
HA	epítipo de la hemaglutinina humana del virus influenza
HMA	del inglés <i>heavy metal ATPases</i>
<i>Hs</i>	<i>Homo sapiens</i>
IPTG	isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosido
ITP	del inglés <i>iron transport protein</i>
Kan	kanamicina
kb	kilobase
kDa	kiloDalton
lacZ	$\beta$ -galactosidasa
LB	medio Luria-Bertani
LEA	del inglés <i>late-embryogenesis abundant</i>
LHY	del inglés <i>late elongated hypocotyl</i>
LUX	del inglés <i>lux arrhythmo</i>
MAPK	del inglés <i>mitogen-activated protein kinase</i>
MATE	del inglés <i>multidrug and toxin efflux</i>
MBD	del inglés <i>metal binding domain</i>
MES	ácido 4-morfolino-etano-sulfónico
miRNA	microRNA
MNK	proteína de la enfermedad de Menkes
MoCo	del inglés <i>molybden cofactor</i>
MOPS	ácido 3-morfolino-propano-sulfónico
mRNA	RNA mensajero
MRP	del inglés <i>multi-drug resistance-associated protein</i>
MS	medio Murashige-Skoog
MT	metalotioneína
NA	nicotianamina
NAAT	nicotianamina aminotransferasa
NAS	nicotianamina sintasa
NBT/BCIP	del inglés <i>nitro blue tetrazolium chloride/5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate</i>
NHEJ	del inglés <i>non-homologous end-joining</i>
NIP	del inglés <i>nodulin 26-like intrinsic protein</i>
NOS	secuencia de poliadenilación del gen nopalina sintasa
NRAMP3/4	del inglés <i>natural resistance associated macrophage protein</i>
OD <sub>600</sub>	del inglés <i>optical density</i> a una longitud de onda de 600 nm
OPT	del inglés <i>oligopeptide transporter</i>
ORF	del inglés <i>open reading frame</i>
P.S.	peso seco
p/v	peso/volumen
PAA	del inglés <i>P-type ATPase of Arabidopsis</i>
pb	par de bases
PC	plastocianina

---

PCR	del inglés <i>polymerase chain reaction</i>
PEG	polietilenglicol
PINA	del inglés <i>pineal night-specific ATPase</i>
PMG1	del inglés <i>production of methionine-derived glucosinolate 1</i>
PMSF	del inglés <i>phenylmethanesulphonylfluoride or phenylmethylsulphonyl fluoride</i>
POX	peroxidasa
PRR5	del inglés <i>pseudo-response regulators</i>
RAN1	del inglés <i>responsive-to-antagonist 1</i>
RE	retículo endoplasmático
RNA	del inglés <i>ribonucleic acid</i>
ROS	del inglés <i>reactive oxygen species</i>
rRNA	RNA ribosómico
RT	retrotranscripción
SBP	del inglés <i>squamosa binding protein</i>
Sc	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SC-ura	del inglés <i>synthetic complete</i> , sin uracilo
SDS	del inglés <i>sodium dodecyl sulphate</i>
SEC12	glicoproteína integral de membrana del retículo endoplasmático
SOD	superóxido dismutasa
SPL	del inglés <i>squamosa protein like</i>
SSC	del inglés <i>saline sodium citrate</i>
TAE	tris-acetato-EDTA
TBS	del inglés <i>tris-buffered saline</i>
TEMED	N, N, N', N'-tetrametiletildinamina
TMD	del inglés <i>transmembrane domain</i>
TOC1	del inglés <i>timing of CAB expresión 1</i>
Tris	2-amino-2-hidroximetil-1,3-propanodiol
TTBS	del inglés <i>Tween-tris-buffered saline</i>
UV	ultravioleta
v/v	volumen/volumen
WND	del inglés <i>Wilson disease</i>
WT	del inglés <i>wild type</i>
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galacto-piranósido
YNB	del inglés <i>yeast nitrogen base</i>
YPG	del inglés <i>yeast extract-peptone-glycerol</i>
YS1	del inglés <i>yellow stripe 1</i>
YSL	del inglés <i>yellow stripe-like</i>
ZIP	del inglés <i>ZRT/IRT-related protein</i>



# INTRODUCCIÓN

## 1. LA BIOQUÍMICA DEL COBRE

El cobre (Cu) es un nutriente esencial para el crecimiento y el desarrollo de los organismos aerobios, pero las mismas propiedades físico-químicas que le confieren esta característica, hacen que resulte un agente potencialmente tóxico para la célula. Debido a esta dualidad del Cu, los seres vivos poseen una serie de estrategias destinadas a asegurar su abastecimiento y evitar su toxicidad, simultáneamente. El conocimiento de la doble naturaleza del Cu, de sus funciones biológicas y de los procesos citotóxicos que provoca, permitirá responder al por qué los seres vivos poseen sofisticados mecanismos para el transporte y la detoxificación del metal, denominados redes homeostáticas, así como entender la importancia de la regulación de la expresión génica de los componentes de dichas redes, cuando se alteran los niveles de Cu en el medio.

### 1.1. La esencialidad del cobre

Los procesos que gobiernan la selección de un elemento para una determinada función biológica obedecen a diversos factores de tipo fundamentalmente físico-químico, como la reactividad y la biodisponibilidad, e incluso factores históricos. Por ejemplo, las razones por las que el uso del hierro (Fe) está tan extensamente distribuido entre los seres vivos, son: que puede acomodar un variado rango de potenciales rédox y que, históricamente, fue un ión abundante en disolución ( $\text{Fe}^{2+}$ ) y por lo tanto de fácil adquisición, en los océanos primitivos, en los que se originó la vida. La incorporación del Cu en los sistemas biológicos fue un suceso más reciente, que sólo fue posible después de la conversión de la atmósfera en oxidante, hecho que facilitó la solubilización del Cu, en forma de  $\text{Cu}^{2+}$ , y en consecuencia su uso está menos extendido que el del Fe (Crichton y Pierre, 2001). Además, este suceso coincidió con la

transición hacia la organización multicelular, proceso en el que el Cu juega un papel decisivo por su participación en el entrecruzamiento de matrices extracelulares (Williams y Da Silva, 1996; Cona *et al.*, 2006). De hecho, la mayor parte de las cuproproteínas conocidas se encuentran en organismos eucariotas que emergieron hace unos 1500 millones de años.

El Cu presenta un gran carácter oxidante y una elevada aptitud para formar complejos de coordinación con moléculas orgánicas. Sus estados de oxidación habituales en el entorno celular son  $\text{Cu}^{2+}$  y  $\text{Cu}^+$ . De este modo, el  $\text{Cu}^{2+}$  se encuentra a menudo unido al nitrógeno en cadenas de histidina, mientras que el  $\text{Cu}^+$  interacciona preferentemente con el sulfuro de la cisteína o la metionina (Lippard y Berg, 1994). Estas características del Cu permiten su uso en cuproproteínas, que han evolucionando ajustando la estabilidad y el potencial rédox de sus centros de Cu a la función que desarrollan. En este sentido, se conocen diversas cuproproteínas con diferentes tipos de centro de Cu y funciones biológicas, entre las que destacan las siguientes en plantas (Tabla I.1):

- Plastocianina. Óxido-reductasa asociada a la cara luminal de la membrana tilacoidal de los cloroplastos (Weigel *et al.*, 2003). Proteína implicada en el transporte de electrones en las cadenas fotosintéticas.

- Plantacianina. Proteína azul de Cu, que se encuentra localizada en el apoplasto del polen y participa en guiar el tubo polínico en el estigma (Kim *et al.*, 2003; Dong *et al.*, 2005).

- Oxidasas. Enzimas que catalizan la oxidación de moléculas pequeñas con la consiguiente reducción del oxígeno molecular ( $\text{O}_2$ ) o de algún derivado suyo en estado de oxidación intermedio, como el anión nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) o radical superóxido ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ). Los sustratos más habituales de las oxidasas de Cu son el ascorbato (ascorbato oxidasas) (Nakamura y Go, 2005), los fenoles (lacasa, polifenol oxidasas) (Marusek *et al.*, 2006) y algunas aminas (amino oxidasas)

(Cona *et al.*, 2006), cuyos productos de reacción abandonan la proteína en forma de radicales libres con posible función protectora frente a radicales más reactivos o en la formación de polímeros extracelulares (Cona *et al.*, 2006). Consecuentemente, la mayoría de oxidasas se localizan en compartimentos extracitosólicos (espacio extracelular, periplasma, lumen tilacoidal) o integradas en membranas, como es el caso de la citocromo c oxidasa (COX) en la mitocondria, implicada en la respiración (Cobine *et al.*, 2006; Gredilla *et al.*, 2006).

- Superóxido dismutasas (SOD). *Arabidopsis* posee tres isoformas de Cu/ZnSOD localizadas en el citosol (CSD1, del inglés *Cu/Zn superoxide dismutase 1*), el cloroplasto (CSD2) y el espacio peroxisomal (CSD3) (Figura I.3). Existen además FeSOD y MnSOD, localizadas en el cloroplasto y la mitocondria, respectivamente (Kliebenstein *et al.*, 1998).

- Receptor de etileno (ETR1, del inglés *ethylene response 1*). Proteína localizada en el retículo endoplasmático. Su centro de Cu no tiene función catalítica, sino que el metal sirve para la unión reversible de etileno (Chen *et al.*, 2002). En este tipo de cuproproteínas, la molécula unida se reduce parcialmente y la transferencia de carga es reversible, hecho que posibilita la disociación posterior del sustrato.

- Cofactor del molibdeno (MoCo, del inglés *molybden cofactor*). También se ha descrito el papel del Cu en la biosíntesis de MoCo (Kuper *et al.*, 2004; Mendel y Bittner, 2006), centro catalítico que en plantas participa en la asimilación de nitrógeno, la biosíntesis de fitohormonas y el catabolismo de purinas (Mendel, 2005).

Otras cuproproteínas implicadas en el transporte y la destoxificación de Cu en plantas se describen en apartados posteriores.



**Tabla I.1.** Resumen de las características de algunas de las principales proteínas de Cu.

proteína	loc <sup>1</sup>	función	patologías <sup>2</sup>
amino oxidasa	e	inactivación de hormonas defensa a herida y patógenos	
ascorbato oxidasa	e	metabolismo pared celular defensa antioxidante?	
ceruloplasmina	e	movilización de Fe distribución de Cu	anemia
citocromo c oxidasa	mim	respiración aerobia	
cofactor del molibdeno	?	asimilación de nitrógeno biosíntesis de fitohormonas catabolismo de purinas	
diamino oxidasa	e	inactivación de histamina lignificación	
dopamina β-monooxigenasa	e	síntesis de catecolamina	desequilibrios hipotalámicos
factores de coagulación V y VIII	e	coagulación de la sangre	hemofilia
fenol oxidasa	e	defensa antioxidante?	
galacto oxidasa	e	oxidación de azúcares	
hemocianina	e	transporte de oxígeno	
lacasa	e	lignificación	
lisil oxidasa	e	entrecruzamiento de colágeno y elastina	debilidad del tejido conectivo
nitrito reductasa	p	respiración anaeróbica	
peptidilglicina monooxigenasa	e	activación de hormonas peptídicas	
plantacianina	e	desarrollo antera y polinización	
plastocianina	lmt	fotosíntesis	
polifenol oxidasa	e lt	síntesis de pigmentos defensa antioxidante lignificación	
precursores de β-amiloide	mp	?	enfermedad de Alzheimer
proteína priónica (PrP <sup>c</sup> )	emp	defensa antioxidante? transporte de Cu	enfermedad de Creutzfeld-Jacob
receptor de etileno	mre	señalización hormonal	
superóxido dismutasa de Cu/Zn	c ec ei	defensa antioxidante	
tirosinasa (catecol oxidasa)	e	síntesis de melanina	despigmentación

<sup>1</sup> Localización subcelular: c, citosol; e, extracelular; ec, estroma cloroplástico; ei, espacio intermembrana de la mitocondria; emp, cara externa de la membrana plasmática; lmt, cara luminal de la membrana tilacoidal; lt, lumen tilacoidal; mim, membrana interna mitocondrial; mp, membrana plasmática, mre, membrana del retículo endoplasmático; p, periplasma. <sup>2</sup> Principales patologías humanas asociadas a defectos en la actividad de las correspondientes proteínas. En rojo se indican las cuproproteínas específicas de plantas.

Existe una jerarquía de esencialidad entre las proteínas de Cu, que varía en cada tipo de organismo. En plantas superiores, una cuproproteína cuya función no puede ser realizada por ninguna otra proteína en la planta, y que por lo tanto resulta estrictamente esencial para este organismo, es la plastocianina (Weigel *et al.*, 2003). Sin embargo, otras cuproproteínas pueden ser eliminadas o sustituidas por proteínas con función equivalente pero que poseen otro metal como cofactor en su centro activo, como es el caso de la Cu/ZnSOD que puede ser sustituida por la FeSOD (ver apartado 3.1 de Introducción) (revisado en Pilon *et al.*, 2006; Puig *et al.*, 2007a).

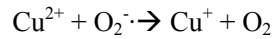
La importancia de las cuproproteínas en humanos se ve reflejada en las diversas patologías asociadas a alteraciones en la función de las mismas, como las enfermedades de Menkes (Schlief *et al.*, 2006), de Creutzfeld-Jacob (Westergard *et al.*, 2007) y de Alzheimer (Crouch *et al.*, 2007).

### 1.2. La citotoxicidad del cobre

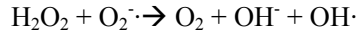
La capacidad del Cu para cambiar su estado redox cuando entra en contacto con productos intermediarios del metabolismo aerobio, conocidos como ROS (del inglés *reactive oxygen species*), le hace ser fuertemente citotóxico, ya que induce la producción de radicales hidroxilo (revisado en Halliwell y Gutteridge, 1989). Los ROS ( $O_2^{\cdot-}$ , radical superóxido;  $O_2^{2-}$ , anión peróxido;  $H_2O_2$ , peróxido de hidrógeno;  $OH^{\cdot}$ , radical hidroxilo) se generan por reducción incompleta del dioxígeno durante la respiración, y su producción se intensifica con temperaturas extremas, radiación de elevada intensidad, sequía o contaminantes atmosféricos. El  $Cu^+$  contribuye a generar los radicales hidroxilo a partir de los ROS por catálisis de la reacción de Fenton:



Y el  $Cu^{2+}$  se reduce en presencia del radical superóxido:



El balance neto, conocido como reacción de Haber-Weiss, es:



La citotoxicidad de los radicales hidroxilo es debida a su reacción inmediata con las moléculas del entorno, mientras que el radical superóxido y el peróxido de hidrógeno lo hacen más lentamente, hecho que posibilita su difusión lejos del lugar donde se generan. Su encuentro con dianas específicas como el DNA, las proteínas o los lípidos, es el responsable del daño celular a estas macromoléculas causado por el ataque oxidativo (Halliwell y Gutteridge 1989).

Otra causa de citotoxicidad del Cu deriva de su capacidad para interactuar con cadenas laterales de aminoácidos como histidina, cisteína y metionina. Esta interacción provoca el desplazamiento de otros iones metálicos esenciales de sus centros de coordinación y/o el plegamiento defectuoso de las respectivas metaloproteínas, impidiendo su función biológica (Ochiai, 1995; Koch *et al.*, 1997; Yang *et al.*, 2006). Sin embargo, en algunos casos, este desplazamiento de iones de los centros activos de las proteínas supone un mecanismo de regulación en respuesta a un exceso del metal. Por ejemplo, se ha sugerido que en *Chlamydomonas* la represión de la expresión génica por Cu podría estar mediada por la inactivación de factores de transcripción que poseen dedos de Zn, que al ser sustituidos por Cu dejarían de ser funcionales (Kropat *et al.*, 2005) (ver apartado 3.1 de Introducción).

## **2. LA HOMEOSTASIS DEL COBRE EN PLANTAS**

El interés creciente en la homeostasis de metales de transición en plantas superiores se ve reflejado en el número de revisiones publicadas recientemente (Grotz y Guerinot, 2006; Pilon *et al.*, 2006; Briat *et al.*, 2007; Kim y Guerinot, 2007; Krämer *et al.*, 2007; Puig *et al.*, 2007a).

En este apartado, se resumen las estrategias y componentes que permiten el transporte y la destoxificación del Cu en plantas, tanto a larga distancia como a nivel intracelular.

### **2.1. El transporte a larga distancia**

La adquisición del Cu a partir de los recursos minerales del suelo y su posterior distribución por toda la planta es el resultado de la contribución de los diferentes procesos descritos a continuación (revisado en Clemens *et al.*, 2002).

#### *2.1.1. Biodisponibilidad y movilización del cobre del suelo*

La biodisponibilidad de un elemento mineral concreto se define como la fracción de ese elemento en el suelo que puede ser absorbida por una especie determinada de planta (Brun *et al.*, 2001). La disponibilidad natural de los micronutrientes en la rizosfera suele estar muy limitada por su escasa solubilidad en agua aireada y por la fuerte unión a partículas del suelo (aproximadamente el 98 % de los metales del suelo forman algún tipo de complejo). En el caso del Cu, éste se encuentra secuestrado por ligandos orgánicos del suelo (Fox y Guerinot, 1998). Del mismo modo, los nutrientes de los fertilizantes son más accesibles cuando se suministran en forma de sales

orgánicas que complejados con quelantes sintéticos (Bell *et al.*, 1991).

Para resolver estas dificultades, las plantas poseen una serie de estrategias que permiten movilizar los micronutrientes que de manera natural son poco accesibles. Respecto al Cu, parece que la adquisición del metal por las raíces, en respuesta a un déficit nutricional, puede variar en función de la especie en consideración. Los mecanismos observados son los siguientes:

- Acidificación de la rizosfera. La acidificación favorece la solubilización de los micronutrientes. Existen evidencias de que el déficit de Cu induce una acidificación de la rizosfera (Grusak y Pezeshgi, 1996; Cohen *et al.*, 1997). En *Arabidopsis thaliana*, se ha identificado la familia de H<sup>+</sup>-ATPasas AHA (del inglés *Arabidopsis H<sup>+</sup>-ATPase*), alguno de cuyos miembros podría estar implicado en este proceso de acidificación (Palmgren, 2001; Gaxiola *et al.*, 2007). Las H<sup>+</sup>-ATPasas son bombas de protones localizadas en la membrana plasmática, que generan un potencial de membrana que favorece el transporte de solutos cargados positivamente hacia el interior celular.

- Reducción del metal. Se ha propuesto que la liberación de Cu<sup>+</sup> en la superficie de la raíz podría ser una forma de desestabilizar los complejos que forma el Cu<sup>2+</sup> en la rizosfera, de la misma manera que ocurre tras la liberación de Fe<sup>2+</sup> (Bienfait, 1988). Además, los transportadores de Cu de alta afinidad conocidos en la membrana plasmática son específicos de Cu<sup>+</sup>. En raíces de guisante, el déficit de Cu induce una actividad reductasa con doble especificidad por Fe<sup>3+</sup> y Cu<sup>2+</sup>, que depende de un único gen (Cohen *et al.*, 1997). En lo que respecta a *Arabidopsis*, se ha identificado la familia de reductasas de metales FRO (del inglés *ferric reductase oxidase*), compuesta por 8 miembros (Mukherjee *et al.*, 2006). La proteína FRO2 muestra actividad reductasa de Cu, en déficit de Fe (Yi y Guerinot, 1996; Robinson *et al.*, 1999). Sin embargo, los datos no son concluyentes, respecto a su función *in vivo*, en la reducción de Cu en raíces de *Arabidopsis* (Yi y Guerinot, 1996; Connolly *et al.*, 2003). Respecto

a FRO3, su expresión se incrementa en raíces de *Arabidopsis* en deficiencia de Fe y de Cu, sugiriendo un papel de FRO3 en la adquisición, tanto de Fe como de Cu, del suelo en *Arabidopsis* (Wu *et al.*, 2005; Mukherjee *et al.*, 2006). Curiosamente, la expresión de los genes FRO en diferentes órganos indica la necesidad de actividad reductasa, no sólo en raíces, sino también en el resto de la planta (Wu *et al.*, 2005; Mukherjee *et al.*, 2006).

Existen evidencias de que el déficit de Cu induce un aumento de la actividad reductasa, paralelamente a la acidificación de la rizosfera. Ambas respuestas son independientes y podrían contribuir separadamente a la absorción de iones metálicos (Grusak y Pezeshgi, 1996; Yi y Guerinot, 1996; Cohen *et al.*, 1997). Por el contrario, también se han aportado datos experimentales que sugieren que la reducción del Cu no es esencial para la absorción del metal. Por ejemplo, las plántulas del mutante *frd1* de *Arabidopsis*, que presenta una actividad reductasa limitada en las raíces, no ven menguada su capacidad para acumular Cu (Yi y Guerinot, 1996). Por otro lado, Bell y colaboradores (1991) demostraron que el  $\text{Cu}^{2+}$ , pero no el  $\text{Cu}^+$  es eficientemente absorbido por las raíces de maíz.

### 2.1.2. Absorción del cobre por la raíz

Una vez movilizados, los nutrientes deben ser capturados por la planta. La raíz es el órgano especializado en la absorción de agua y nutrientes del suelo, pero no todas las partes de la raíz son igualmente eficientes en la ejecución de esta tarea. El perfil de absorción a lo largo del eje longitudinal varía según el tipo de ión, el estado nutricional de la planta y la especie vegetal considerada (revisado en Marschner, 2002). La tendencia general en dicotiledóneas y plantas perennes es que el ritmo de entrada de iones por unidad de longitud disminuye a medida que aumenta la distancia al ápice de la raíz. En el caso del Cu, se ha

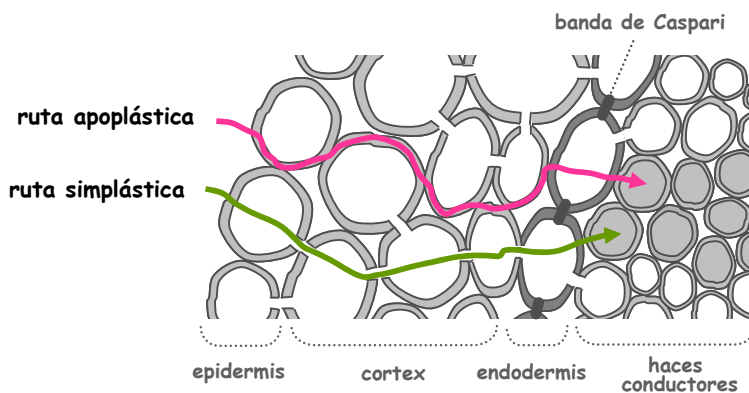
visto que la entrada es uniforme a lo largo de la raíz de maíz, y que bajo condiciones de deficiencia se incrementa la capacidad de absorción en su zona apical, pero no en la basal (Bell *et al.*, 1991).

El movimiento de los iones a lo largo de la planta está impulsado por el gradiente de potencial hídrico que existe entre la rizosfera y la atmósfera, y transcurre a través de dos vías acuosas paralelas (revisado en Marschner, 2002) (Figura I.1):

- Vía apoplástica. Los iones pueden atravesar radialmente la raíz por el apoplasto hasta llegar a la endodermis, donde la banda de Caspari restringe el movimiento apoplástico de solutos, obligándolos a continuar su camino hacia el cilindro vascular (haces xilemáticos) a través del simplasto. Sin embargo, este obstáculo se vuelve débil en al menos dos puntos: en el ápice, donde la banda de Caspari no está bien desarrollada y permite el transporte apoplástico de algunos iones, como es el caso del calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ); y en las zonas basales, donde emergen raíces laterales desde el periciclo y se rompe transitoriamente la continuidad estructural de la endodermis (Figura I.1, flecha rosa).

- Vía simplástica. Los nutrientes que cruzan la membrana plasmática, a través de proteínas especializadas en el transporte de nutrientes, pasan a formar parte del simplasto. Una vez en su interior, aunque han de cruzar otra vez la membrana, no existe ningún obstáculo que impida el camino de los nutrientes hacia los haces xilemáticos (Figura I.1, flecha verde).

Después de la entrada de los nutrientes al simplasto, los iones pueden quedar secuestrados dentro de las células de la raíz o seguir la vía simplástica hasta los haces xilemáticos para transportarse por la planta. La distribución de los nutrientes entre ambos destinos depende del tipo de ligando químico al que se coordinan (Salt *et al.*, 1995). Parece que la inmovilización de los metales con metalotioneínas y fitoquelatinas (ver apartado 2.2.3.2 de Introducción) retiene los cationes en los órganos subterráneos.



**Figura I.1.** Esquema del transporte radial de nutrientes en la raíz. En los haces conductores, el xilema está representado en gris y el floema en blanco. Basada en <http://ualr.edu/botany/rootpath.jpg>.

En general, se ha observado que las raíces presentan una concentración de metales superior a la de los órganos aéreos, atribuible a un bajo ritmo de translocación (MacFarlane y Burchett, 2002; Wolterbeek y Van Der Meer, 2002). En este sentido, las concentraciones de Cu encontradas en raíces de maíz crecido en suelos contaminados son muy elevadas y aumentan paralelamente al incremento de Cu en el suelo, mientras que las concentraciones en partes aéreas varían ligeramente y permanecen siempre bajas (Brun *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2001a; McBride, 2001).

### 2.1.3. Distribución del cobre a los órganos destino

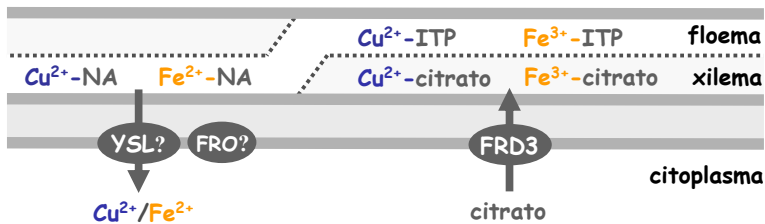
#### 2.1.3.1. Transporte del cobre en el xilema

El transporte de metales por el xilema tiene lugar por un sistema aún no caracterizado. Se ha propuesto que los ácidos orgánicos, especialmente el citrato, podrían ser los principales ligandos metálicos en el xilema (revisado en



Haydon y Cobbett, 2007). Además, el transportador FRD3 (del inglés *ferric reductase defective 3*) de la familia MATE (del inglés *multidrug and toxin efflux*) podría participar en el transporte de citrato hacia el xilema, facilitando la distribución de metales por la planta (Durrett *et al.*, 2007) (Figura I.2). En el xilema, los grupos carboxílicos de la pared actúan como intercambiadores catiónicos de baja afinidad y selectividad que restringen el libre movimiento de solutos cargados positivamente, excluyendo los aniones. Por este motivo, los complejos metálicos aniónicos son transportados más eficientemente (Senden *et al.*, 1990).

La descarga del xilema supone el primer paso para controlar la distribución de metales en partes aéreas. Canales iónicos aún no identificados, podrían facilitar el transporte de cationes metálicos desde el xilema hacia el simplasto. La posterior distribución dentro de la hoja puede ocurrir por la vía simplástica o apoplástica (Karley *et al.*, 2000).



**Figura I.2.** Esquema de los componentes de la homeostasis del Cu que participan en el transporte del metal entre los haces conductores y las células de *Arabidopsis*. La flechas indican el sentido del transporte de iones y compuestos. Los signos de interrogación indican componentes dudosos. FRD, del inglés *ferric reductase defective*; FRO, del inglés *ferric reductase oxidase*; ITP, del inglés *iron transport protein*; NA, nicotianamina; YSL, del inglés *yellow stripe-like*.

### 2.1.3.2. Transporte del cobre en el floema

La importancia en este tipo de transporte de diferentes ligandos de metales de transición como ácidos orgánicos, el ácido mugeneico, la histidina y el fitato y de sus posibles transportadores ha sido recientemente revisada por Haydon y Cobbett (2007).

Estudios con la planta *Ricinus communis* implican a la proteína ITP (del inglés *iron transport protein*) y al aminoácido NA (nicotianamina) en la distribución de Fe y Cu a través del floema (Krüger *et al.*, 2002; Hell y Stephan, 2003) (Figura I.2). La proteína ITP, de 96 aminoácidos, tiene elevada similitud con la familia de proteínas de la embriogénesis tardía, relacionada con el estrés. ITP une  $\text{Fe}^{3+}$  en el floema, pero también compleja  $\text{Cu}^{2+}$  y otros metales *in vitro* (Krüger *et al.*, 2002). El aminoácido NA es un quelante de metales sintetizado por la enzima NAS (nicotianamina sintasa) a partir de S-adenosil-L-metionina. La primera evidencia del papel de la NA en el transporte de metales fue el fenotipo del mutante de tomate *chloronerva*, defectuoso en la síntesis de NA, que mostraba clorosis en hojas (Ling *et al.*, 1996; Mori, 1999). En estas plantas transgénicas, los niveles de Cu, Fe y Zn disminuyen. Del mismo modo, la sobreexpresión de NAS en tabaco incrementa el contenido en Cu, Fe y Zn en la planta (Takahashi *et al.*, 2003). Además, el gen NAS aumenta su expresión en deficiencia de estos metales (Wintz *et al.*, 2003), lo que apoya el papel de NA en la homeostasis de los mismos. En plantas gramíneas, la NA es un sustrato para la enzima NAAT (nicotianamina aminotransferasa), que actúa como intermediario en la biosíntesis de fitosideróforos, que complejan  $\text{Fe}^{3+}$ . Dado que la NA compleja mayoritariamente  $\text{Fe}^{2+}$  en el floema (Von Wirén *et al.*, 1999), mientras que se transportan complejos ITP- $\text{Fe}^{3+}$ , se ha propuesto que la NA podría actuar como un intercambiador, quelando  $\text{Fe}^{2+}$  a partir del ITP- $\text{Fe}^{3+}$ , durante la carga y descarga de Fe en el floema (Krüger *et al.*, 2002). Si este fuera el caso, se necesitaría un sistema reductor, quizá formado por miembros

de la familia FRO (ver apartado 2.1.1 de Introducción), así como transportadores específicos de NA-Fe<sup>2+</sup>.

Aparte de estos ligandos, el gen YS1 (del inglés *yellow stripe 1*) del maíz, miembro de la superfamilia OPT (del inglés *oligopeptide transporter*), media la incorporación de complejos fitosideróforo-Fe<sup>3+</sup> en las plantas gramíneas (Curie *et al.*, 2001). Las plantas dicotiledóneas y monocotiledóneas no gramíneas, expresan múltiples genes YSL (del inglés *yellow stripe-like*). En estas plantas, que no sintetizan ni secretan fitosideróforos pero que poseen NA, se ha propuesto que los genes YSL funcionan en el transporte de complejos NA-Fe<sup>2+</sup> hacia las semillas (Le Jean *et al.*, 2005; Waters *et al.*, 2006). Además, los dobles mutantes *ysl1ysl3* son menos eficientes movilizándolo metales, especialmente Cu, desde las hojas senescentes. La expresión de YSL1/3 en la zona vascular de hojas y órganos reproductivos, sugiere una función en la distribución del metal a partir de los tejidos vasculares (Waters *et al.*, 2006) (Figura I.2). La localización de YSL2 en la endodermis y en las células del periciclo orientadas hacia los tubos del meta-xilema en las raíces de *Arabidopsis*, sugiere que también participa en el movimiento lateral de Fe y/o Cu dentro de los haces conductores (DiDonato *et al.*, 2004; Schaaf *et al.*, 2005).

## **2.2. La homeostasis del cobre en *Arabidopsis***

Una vez adquirido del medio, la red homeostática del Cu conlleva el transporte del metal a través de las membranas intracelulares y la cesión a las apo-cuproproteínas. Además, las células poseen un conjunto de estrategias que permiten la prevención y la reparación de daños celulares causados por una inadecuada acumulación de Cu.

La compleja red homeostática del Cu está extensamente conservada entre los organismos eucariotas (revisado en Puig y Thiele, 2002; Rees y Thiele,

2004). La levadura *Saccharomyces cerevisiae* ha contribuido notablemente a descubrir los componentes básicos de la homeostasis del Cu en estos organismos. En la figura I.3 se muestra el modelo de la homeostasis del Cu en *A. thaliana*, basado en la identificación de componentes por complementación funcional heteróloga usando *S. cerevisiae* como sistema modelo y en los datos de homología de secuencia de las proteínas de *Arabidopsis* con las de otros organismos (revisado en Pilon *et al.*, 2006; Puig *et al.*, 2007a). La tabla I.2 indica los principales componentes de estas rutas, en levadura y *Arabidopsis*.

**Tabla I.2.** Componentes de la homeostasis del Cu en levadura y *Arabidopsis*.

		<b>levadura</b>	<b><i>Arabidopsis</i></b>
<b>reductasas</b>		Fre1-7	FRO1-8
<b>transportadores</b>	<b>alta afinidad</b>	Ctr1-3	COPT1-6
	<b>baja afinidad</b>	Fet4 Smf1/2	ZIP2/4 OPT (YSL2)
<b>carabinas moleculares</b>		Ccs Cox17 Atx1	CCS COX17-1/2 CCH ATX1
<b>P<sub>1B</sub>-ATPasas</b>		Ccc2	HMA1 HMA5 PAA1 (HMA6) RAN1 (HMA7) PAA2 (HMA8)
<b>metalotioneínas</b>		Cup1 Crs5	MT1-4
<b>factores reguladores</b>		Ace1 Mac1	SPL1-16? miRNAs



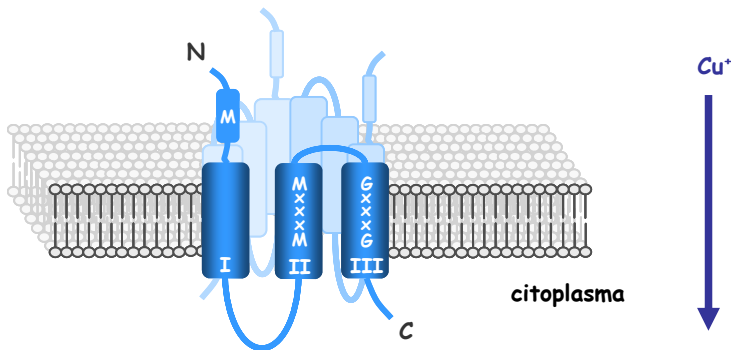
### 2.2.1. La incorporación a través de la membrana plasmática

El transporte de Cu al interior de la célula constituye el primer paso de los mecanismos de homeostasis del metal a nivel celular y, por tanto, su control resulta crítico para regular los niveles intracelulares de Cu. Las células eucariotas disponen de una amplia variedad de transportadores metálicos con diferente especificidad de sustrato y propiedades cinéticas.

En la importación de Cu hacia el citosol participa la familia de transportadores de Cu de alta afinidad COPT (del inglés *copper transporter*) (Kampfenkel *et al.*, 1995; Sancenón *et al.*, 2003) homólogos a los miembros de la familia CTR (del inglés *copper transporter*) de levadura (Dancis *et al.*, 1994a y 1994b; Knight *et al.*, 1996; Zhou y Gitschier, 1997; Lee *et al.*, 2001) (Figura I.3). Los transportadores CTR son pequeñas proteínas con tres dominios transmembrana (TMDs, del inglés *transmembrane domain*) (Dancis *et al.*, 1994b; Lee *et al.*, 2002), estando el extremo amino localizado en el espacio extracelular y el extremo carboxilo en el citosol (Eisses y Kaplan, 2002; Puig *et al.*, 2002; Klomp *et al.*, 2003) (Figura I.4). El dominio amino terminal contiene motivos ricos en metionina conservados e importantes para el transporte de Cu (Puig *et al.*, 2002), además de un residuo de metionina extracelular localizado aproximadamente 20 aminoácidos antes del dominio TMD1 y un motivo MxxxM dentro del dominio TMD2, que son esenciales para la adquisición de Cu y probablemente median la coordinación del metal durante su transporte (Puig *et al.*, 2002) (Figura I.4). Evidencias genéticas, bioquímicas y estructurales sugieren que las proteínas CTR se ensamblan y funcionan como homotrímeros (Dancis *et al.*, 1994b; Peña *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2002; Klomp *et al.*, 2003; Nose *et al.*, 2006) (Figura I.4). Recientemente se ha descrito que la estructura de Ctr1 corresponde a un trímero simétrico y compacto con una arquitectura similar a un canal, donde un motivo GxxxG conservado dentro del dominio TMD3 es esencial para la trimerización (Aller *et al.*, 2004; Aller y

Unger, 2006).

La familia CTR es altamente específica para iones de  $\text{Cu}^+$  con una constante  $K_m$  en el rango micromolar (Eisses y Kaplan, 2002; Lee *et al.*, 2002). Las proteínas CTR no usan ATP para la importación de Cu, pero su capacidad de transporte es estimulada por  $\text{K}^+$  extracelular (Lee *et al.*, 2002). Además, probablemente, la incorporación de Cu está facilitada por la extremadamente baja concentración de iones Cu libres en el citosol (Rae *et al.*, 1999). Otros miembros de la familia CTR, Ctr2 y Ctr6, han sido localizados en el tonoplasto, donde funcionan en la movilización del Cu desde las vacuolas en *S. cerevisiae* y *S. pombe* respectivamente (Bellemare *et al.*, 2002; Rees *et al.*, 2004), así como en endosomas tardíos y lisosomas en humanos (Van Den Berghe *et al.*, 2007).



**Figura I.4.** Esquema de la topología de la familia CTR/COPT de transportadores de Cu de alta afinidad. Los segmentos transmembrana están representados con rectángulos. Cada monómero del homotrímero está representado con diferentes intensidades de color. Los residuos conservados en posibles dominios funcionales están indicados en código de aminoácidos de 1 letra. Los extremos amino y carboxilo están indicados con la letra N y C, respectivamente. La flecha indica el sentido del transporte de Cu.

El primer miembro de la familia COPT en *Arabidopsis*, *COPT1*, fue aislado por su capacidad para revertir los defectos respiratorios del mutante *ctr1Δ ctr3Δ* de levadura (Kampfenkel *et al.*, 1995). Los siguientes miembros fueron identificados por homología de secuencia a *COPT1* y complementación en levadura (Sancenón *et al.*, 2003). Mientras los miembros *COPT1* y *COPT2* rescatan por completo el defecto en crecimiento de la cepa *ctr1Δ ctr3Δ* de levadura, *COPT3* y *COPT5* sólo complementan parcialmente los mutantes defectuosos en el transporte de Cu (Sancenón *et al.*, 2003). Estos resultados sugieren que las proteínas *COPT1* y *COPT2* podrían funcionar en la incorporación de Cu a través de la membrana plasmática, mientras que *COPT3* y *COPT5* pueden ser proteínas localizadas en membranas intracelulares, quizá en el tonoplasto por homología a levadura (Bellemare *et al.*, 2002; Rees *et al.*, 2004) (Figura I.3). *COPT4* no contiene ningún residuo metionina esencial para el transporte de Cu, por lo que se cuestiona su función en la homeostasis del Cu. Además, la expresión de *COPT4* en levadura resulta tóxica (Sancenón *et al.*, 2003). El miembro mejor caracterizado de esta familia es *COPT1* (Sancenón *et al.* 2004). Varios resultados sobre el transporte de Cu en la raíz de plantas antisentido para *COPT1* indican que este transportador funciona en la adquisición de Cu en raíces de *Arabidopsis*. Además, la expresión de *COPT1* en granos de polen y las alteraciones observadas en la morfología de los mismos en plantas defectuosas en *COPT1* también sugieren un papel crucial del transporte de Cu en el desarrollo del polen. Por último, la expresión de *COPT1* en células que probablemente carecen de plasmodesmos, tales como las de embriones, tricomas, polen y estomas, sugiere una posible función de *COPT1* en el transporte apoplástico del Cu (Oparka y Roberts, 2001; Sancenón *et al.*, 2004). Un miembro adicional de la familia COPT, denominado *COPT6*, ha sido identificado en una reciente anotación del genoma de *Arabidopsis* (datos no publicados).

Otra familia de transportadores, que podría contribuir a la incorporación



de Cu en el citosol, es la familia de transportadores de metales divalentes ZIP (del inglés *ZRT/IRT-related protein*) (Figura I.3). Los miembros ZIP2 y ZIP4 de esta familia en *Arabidopsis* complementan los defectos de crecimiento de cepas de levadura mutantes en el transporte de Cu y Zn. Además, la expresión de estos dos genes aumenta en deficiencia de ambos metales (Grotz *et al.*, 1998; Wintz *et al.*, 2003). En el caso de ZIP2, su patrón de expresión en diferentes órganos es consistente con una función en la adquisición de Cu por las raíces de *Arabidopsis*. Aunque sería necesaria una caracterización más detallada para determinar el papel de estas proteínas en el transporte de Cu en la planta, la preferencia de los miembros de la familia ZIP por metales divalentes sugiere que las proteínas ZIP2 y ZIP4 podrían transportar iones  $\text{Cu}^{2+}$ , sin necesidad de una reducción previa del metal.

### 2.2.2. La distribución intracelular

#### 2.2.2.1. Las carabinas moleculares

Una vez en el interior celular, debido a su limitada solubilidad y a su gran reactividad, el Cu requiere la participación de factores celulares especializados en su transporte hacia los diversos emplazamientos donde se utiliza y hacia las apoproteínas diana específicas, para formar cuproproteínas biológicamente activas (O'Halloran y Culotta, 2000; Huffman y O'Halloran, 2001). Esta tarea la realizan las carabinas moleculares, pequeñas proteínas citosólicas que forman complejos con el Cu, evitando interacciones inapropiadas con otros componentes celulares durante el tránsito hacia su destino (revisado en Harrison *et al.*, 2000). Las carabinas moleculares constituyen una familia de proteínas estructuralmente adaptadas a unir  $\text{Cu}^+$  reversiblemente, reconocer las respectivas dianas moleculares y ceder de forma adecuada el metal. Después de

la cesión del metal, la carabina molecular recupera su forma apo para repetir un nuevo ciclo de unión y cesión de Cu.

En los bancos de datos de *Arabidopsis* se han identificado secuencias que codifican polipéptidos homólogos a las proteínas de levadura Ccs (del inglés *copper chaperone for superoxide dismutase*), Cox17 (citocromo oxidasa 17) y Atx1 (proteína antioxidante 1), que pueden complementar a los correspondientes mutantes (Himelblau *et al.*, 1998; Balandin y Castresana, 2002; Wintz y Vulpe, 2002). El transporte de Cu por carabinas moleculares parece ser un proceso altamente específico, ya que las diferentes carabinas moleculares no pueden intercambiarse y sus correspondientes mutantes se ven afectados de manera exclusiva en la función de sus respectivas dianas. Además, aparte de la función que ejercen en levadura, parece que estas proteínas han adquirido papeles adicionales específicos de las células vegetales, para ajustarse a los requerimientos de sus rutas de Cu.

De este modo, se ha propuesto que mientras en *S. cerevisiae* Ccs es necesaria para la inserción de Cu en el centro activo de la Cu/ZnSOD citosólica (revisado por Culotta *et al.*, 2006), el homólogo en *Arabidopsis*, CCS, está posiblemente involucrado en el suministro de Cu tanto a la isoforma citosólica de la Cu/ZnSOD, CSD1 (Chu *et al.*, 2005), como a su isoforma cloroplástica, CSD2 (Zhou *et al.*, 2000; La Fontaine *et al.*, 2002; Abdel-Ghany *et al.*, 2005a) (Figura I.3). Se ha descrito que los 66 aminoácidos amino terminales de esta proteína constituyen una señal diana para el cloroplasto, sin la cual la proteína se localiza en el citosol (Chu *et al.*, 2005). Curiosamente, se ha demostrado que la Cu/ZnSOD de mamíferos y *Caenorhabditis elegans* puede tomar Cu por un mecanismo independiente de CCS aún desconocido (Carroll *et al.*, 2004; Jensen y Culotta, 2005).

La carabina molecular Cox17 de *S. cerevisiae* está involucrada en el transporte del Cu hacia el complejo COX en la membrana interna de la

mitocondria (revisado en Cobine *et al.*, 2006). En *Arabidopsis*, aunque se han identificado dos homólogos por complementación de la deficiencia respiratoria del mutante *cox17Δ* de levadura (Balandin y Castresana, 2002; Wintz y Vulpe, 2002), se necesitan más estudios para determinar su papel dentro de la planta (Figura I.3).

Por otro lado, en *S. cerevisiae*, Atx1 es una carabina molecular que transporta Cu hacia una ATPasa tipo P (Ccc2, del inglés *calcium-sensitive cross complementation 2*), situada en un compartimento del post-Golgi, para su translocación dentro de los compartimentos de la ruta de secreción (Pufahl *et al.*, 1997). La carabina molecular CCH (del inglés *copper chaperone*) de *Arabidopsis* se identificó por su similitud estructural con Atx1 de levadura (Himmelblau *et al.*, 1998), aunque posee un dominio carboxilo terminal exclusivo de plantas (Mira *et al.*, 2001a, 2001b y 2004). Dado que CCH se encuentra localizada en los elementos cribosos de las células sin núcleo del floema, se ha postulado que este dominio exclusivo de plantas podría cumplir un papel en el transporte simplástico del Cu en *Arabidopsis* a través de los plasmodesmos y los tubos cribosos del floema (Mira *et al.*, 2001a) (Figura I.3). Al igual que otras plantas superiores, *Arabidopsis* contiene en su genoma un homólogo adicional a Atx1 (ATX1) sin este extremo carboxilo característico de plantas (Agrawal *et al.*, 2002; Company y González-Bosch, 2003; Andrés-Colás *et al.*, 2006; Puig *et al.*, 2007b). Por analogía con la función realizada por sus homólogos en sistemas como levadura y humanos, ATX1 podría participar en el transporte de Cu hacia ATPasas tipo P transportadoras de Cu localizadas en las membranas de la ruta de secreción (Andrés-Colás *et al.*, 2006; Puig *et al.*, 2007b) (Figura I.3). La distribución de Cu a otras ATPasas tipo P en plantas superiores no ha sido descrita hasta la fecha, sin embargo, la participación de carabinas moleculares parecidas a Atx1 en la distribución de Cu al cloroplasto en cianobacterias (Banci *et al.*, 2006) señalan a proteínas con motivos de unión a Cu parecidos a los de ATX1 codificadas por el genoma de *Arabidopsis* como

posibles candidatas (Wintz y Vulpe, 2002) (Figura I.3).

Finalmente, la posible presencia de transportadores de  $\text{Cu}^{2+}$  en plantas, como ZIP2 (ver apartado 2.2.1 de Introducción) y HMA1 (ver apartado 2.2.2.2 de Introducción), sugiere que podrían existir mecanismos adicionales para la distribución del  $\text{Cu}^{2+}$ . En este sentido, se ha propuesto a la proteína CUTA (del inglés *Cu tolerance A*) de *Arabidopsis*, que une  $\text{Cu}^{2+}$  y se localiza en el espacio intermembranal del cloroplasto, como candidata para ser carabina molecular de  $\text{Cu}^{2+}$  (Burkhead *et al.*, 2003).

#### 2.2.2.2. Los transportadores de membranas intracelulares

Para una completa distribución subcelular del metal, es necesaria la presencia de transportadores en las membranas intracelulares a los que las carabinas moleculares proporcionarían el Cu para bombearlo a los compartimentos destino.

El genoma de *Arabidopsis* codifica diversas ATPasas tipo P, implicadas en la distribución de Cu desde el citosol a través de las membranas intracelulares, mediante la hidrólisis de ATP. La subfamilia  $\text{P}_{1\text{B}}$ -ATPasa, o CPX-ATPasa, está formada por ATPasas tipo P transportadoras de metales pesados (HMA, del inglés *heavy metal ATPase*) identificadas en procariotas y eucariotas. Estas ATPasas tipo P transportadoras de metales se han descrito en los genomas de diferentes organismos desde *Escherichia coli* a humanos (Solioz y Vulpe, 1996; Rensing *et al.*, 2000; Axelsen y Palmgren, 2001; Lutsenko y Petris, 2002). El genoma de *Arabidopsis* contiene ocho miembros de la subfamilia  $\text{P}_{1\text{B}}$ , clasificados en 6 grupos en base a similitud de secuencia y posición de los intrones (Tabla I.3).

**Tabla I.3.** Clasificación de los componentes de la subfamilia HMA de ATPasas tipo P.

grupo	código	nombre	loc <sup>1</sup>	sustratos
1	At4g37270	HMA1	mc	Zn <sup>2+</sup> Cd <sup>2+</sup> (Cu <sup>2+</sup> )
2	At4g30110	HMA2	se	
	At4g30120	HMA3	?	
	At2g19110	HMA4	mp	
3	At1g63440	HMA5	?	Cu <sup>+</sup>
4	At5g44790	HMA7 (RAN1)	mre	
5	At4g33520	HMA6 (PAA1)	mc	
6	At5g21930	HMA8 (PAA2)	mt	

<sup>1</sup> Localización subcelular: mc, membrana del cloroplasto; mp, membrana plasmática; mre, membrana del retículo endoplasmático; mt, membrana tilacoidal; se, sistema endomembrana.

Cuatro de las HMAs pertenecen a los grupos 1 y 2, que se ha visto recientemente que juegan un papel importante en la homeostasis del Zn<sup>2+</sup> y Cd<sup>2+</sup> (Axelsen y Palmgren, 2001; Williams y Mills, 2005), y se designan con la numeración de HMA1 a HMA4 siguiendo la nomenclatura de Baxter y colaboradores (2003). Recientemente, la proteína HMA1 ha sido localizada en la envoltura del cloroplasto, donde participaría en el transporte de Cu hacia el cloroplasto proporcionándolo preferentemente a la Cu/ZnSOD en el estroma. HMA1 no contiene motivos de unión a Cu<sup>+</sup> en el extremo amino, pero es rico en histidina, por lo que se ha propuesto que podría transportar iones Cu<sup>2+</sup> (Seigneurin-Berny *et al.*, 2006) (Figura I.3).

Las otras cuatro HMAs pertenecientes a los grupos 3 al 6 se cree que son ATPasas tipo P transportadoras de Cu<sup>+</sup> (Axelsen y Palmgren, 2001; Williams y Mills, 2005) y se designan con la numeración de HMA5 a HMA8. La ATPasa tipo P HMA5 es el homólogo más cercano a RAN1 (44,60 % identidad de secuencia) en el genoma de *Arabidopsis*, y su caracterización se aborda en esta Tesis (apartado 2 de Resultados y discusión). La ATPasa RAN1 (del inglés

*responsive-to-antagonist 1*, o HMA7), de secuencia homóloga a Ccc2 de levadura, se aisló en un análisis genético en plántulas que experimentan la triple respuesta al etileno en presencia de un antagonista de esta fitohormona (Hirayama *et al.*, 1999). Dado que se requiere la coordinación del Cu para la unión del etileno a su receptor en el retículo endoplasmático (Rodríguez *et al.*, 1999), se ha propuesto que RAN1 participe en la biogénesis de receptores de etileno funcionales proporcionándoles este cofactor metálico (Hirayama *et al.*, 1999; Woeste y Kieber, 2000; Chen *et al.*, 2002) (Figura I.3). Además, RAN1 podría abastecer de Cu a las oxidasas extracelulares implicadas en el metabolismo de la pared celular y que maduran y se exportan a través de la ruta de secreción (Hirayama *et al.*, 1999; Woeste y Kieber, 2000). Otras dos ATPasas tipo P transportadoras de  $\text{Cu}^+$  en *Arabidopsis* son PAA1 (del inglés *P-type ATPasa of Arabidopsis 1*, o HMA6) y PAA2 (del inglés *P-type ATPasa of Arabidopsis 2*, o HMA8). En cianobacterias, el antepasado evolutivo de los cloroplastos, también se han descrito dos ATPasas tipo P transportadoras de Cu: PacS, localizada en las membranas tilacoidales (Kanamuru *et al.*, 1994); y CtaA, posiblemente localizada en la membrana plasmática (Phung *et al.*, 1994; Tottey *et al.*, 2001). Las ATPasas tipo P de *Arabidopsis* PAA1 y PAA2 podrían representar los homólogos de las de cianobacterias. En este sentido, PAA1 se ha demostrado que media la transferencia de Cu a través de la membrana del cloroplasto, para ser transportado hasta la plastocianina y la Cu/ZnSOD en el estroma (Shikanai *et al.*, 2003) (Figura I.3). Por otro lado, PAA2 bombea Cu a través de las membranas tilacoidales, mediando el transporte de Cu hasta la plastocianina (Abdel-Ghany *et al.*, 2005b) (Figura I.3). También se han descrito homólogos de PAA2 en otras plantas superiores (Bernal *et al.*, 2007).

En la mayoría de los casos, estos transportadores confieren tolerancia a los metales, actuando como bombas de exportación. Dicha función ha sido establecida para CopA, una ATPasa tipo P transportadora de Cu en *E. coli* (Rensing *et al.*, 2000).

### 2.2.3. Los sistemas de detoxificación

#### 2.2.3.1. Compuestos y enzimas antioxidantes

Las plantas se encuentran entre los organismos mejor adaptados al estrés oxidativo, ya que poseen una gran variedad de mecanismos de protección para eliminar los ROS generados en la célula durante procesos fisiológicos o como consecuencia de diversos tipos de estrés (Van Camp *et al.*, 1990; Tsang *et al.*, 1991; Bowler *et al.*, 1994; Willekens *et al.*, 1994).

Entre las sustancias antioxidantes presentes en *Arabidopsis* se pueden encontrar el ácido ascórbico, el glutatión (GSH), el  $\alpha$ -tocoferol y los carotenoides (Xiang y Oliver, 1998; Barth *et al.*, 2006; Howitt y Pogson, 2006; Krieger-Liszky y Trebst, 2006). En plantas, el glutatión es el tiol no-proteico predominante y tiene papeles fisiológicos importantes actuando no sólo como antioxidante en la respuesta contra estrés, sino como almacén móvil de sulfuro reducido (Herschbach *et al.*, 2000) y en la regulación del crecimiento y el desarrollo de la planta (May *et al.*, 1998). El glutatión también participa en la detoxificación de xenobióticos y compuestos tóxicos (citotoxinas), formando complejos que son transportados al interior de la vacuola (Rea *et al.*, 1998) (ver apartado 2.2.3.3 de Introducción).

Respecto a las enzimas antioxidantes de *Arabidopsis*, las superóxido dismutasas (SOD) (ver apartado 1.1 de Introducción), catalasas (CAT) y peroxidasas (POX) se encargan de convertir los ROS en formas del oxígeno no tóxicas, limitando así la producción de radicales hidroxilo (Van Camp *et al.*, 1990; Tsang *et al.*, 1991; Bowler *et al.*, 1994; Willekens *et al.*, 1994; Drazkiewicz *et al.*, 2004; Dietz *et al.*, 2006). Por otro lado, la ascorbato peroxidasa (APX) es otra de las principales enzimas que contribuyen a la eliminación de los ROS en el citosol y los cloroplastos (Mittler y Zilinskas, 1991; Kubo *et al.*, 1992), dentro del ciclo ascorbato-glutatión o de Halliwell-

Asada (Allen, 1995; Inzé y Van Montagu, 1995).

### 2.2.3.2. Sistemas de secuestro o inmovilización

Las metalotioneínas (MT) son un amplio grupo de proteínas solubles de bajo peso molecular ricas en cisteínas. Contienen motivos CxC y CxxC, que secuestran los cationes metálicos en forma no intercambiable, aislándolos así del contacto con sustratos reactivos o ligandos inespecíficos. En su forma apo, la MT está desestructurada, mientras que la unión de iones  $\text{Cu}^+$  induce su plegamiento protegiendo así al Cu del contacto con el disolvente. En *Arabidopsis* se han identificado 3 categorías de MTs (Rauser, 1999; Cobbett y Goldsbrough, 2002), con diferentes patrones de expresión y de regulación (Zhou y Goldsbrough, 1994 y 1995; Murphy y Taiz, 1995; Murphy *et al.*, 1997). En el caso de la MT2, se sabe que sus niveles de expresión se correlacionan con la tolerancia al Cu en *A. thaliana* (Van Vliet *et al.*, 1995; Murphy *et al.*, 1997) y *Silene vulgaris* (Van Hoof *et al.*, 2001). Respecto a la MT3 de *Arabidopsis*, se han mostrado importantes diferencias de secuencia con su homólogo en la planta hiperacumuladora de metales *Thlaspi caerulescens* (TcMT3), que parecen ser las responsables de una mayor capacidad de unión de Cu en TcMT3 respecto a AtMT3 (Roosens *et al.*, 2004).

Las fitoquelatinas, constituyen un segundo tipo de quelantes peptídicos sintetizados enzimáticamente a partir del glutatión, encontrados en plantas y algunos hongos (revisado en Sharma y Dietz, 2006). La síntesis de fitoquelatinas se induce rápidamente en respuesta a la exposición de diversos iones metálicos, con los que las fitoquelatinas forman complejos de bajo peso molecular, en el citosol (Rauser *et al.*, 1999).



### 2.2.3.3. Compartimentación

El principal compartimento para el almacenamiento de compuestos y sustancias tóxicas como el Cu en las células vegetales es la vacuola. En *Arabidopsis* se ha identificado una familia de proteínas que posee homología con la proteína humana MRP (del inglés *multi-drug resistance-associated protein*), los miembros de la cual se consideran los mejores candidatos para llevar a cabo la compartimentación de complejos fitoquelatina-metal en la vacuola. Estas MRPs son bombas que transportan citotoxinas y quelantes de metales pesados una vez conjugados a glutatión mediante glutatión-S-transferasas (GST) (Rea *et al.*, 1998).

Los tricomas son estructuras con un papel relevante en almacenamiento y detoxificación de metales. Por ejemplo, *Brassica juncea* y *Alyssum lesbiacum* acumulan metales pesados como Cd y Ni, respectivamente, preferentemente en los tricomas foliares (Salt *et al.*, 1995; Krämer *et al.*, 1997). Además, algunos genes tipo metalotioneína se expresan también predominantemente en tricomas de *Arabidopsis* y *Vicia faba* (García-Hernández *et al.*, 1998; Foley y Singh, 1994). Por otra parte, en tricomas de *Arabidopsis* se ha mostrado una elevada expresión del gen *OAS1* involucrado en la síntesis de cisteína, que constituye el último paso de la asimilación de sulfato y uno de los pasos precursores de la síntesis de glutatión (Gutiérrez-Alcalá *et al.*, 2000).

### **3. RESPUESTA A LOS NIVELES DE COBRE EN PLANTAS**

La disponibilidad de un nutriente esencial puede variar del déficit al exceso, alcanzándose un funcionamiento óptimo de los organismos a determinadas concentraciones. Condiciones de extrema carencia o concentraciones muy elevadas del metal pueden desembocar en efectos letales para el organismo. En el caso del Cu, la cantidad óptima del metal para la planta oscila entre 5 y 20  $\mu\text{g/g}$  de peso seco (Marschner, 2002). Para que las plantas puedan sobrevivir y crecer adecuadamente, deben responder y adaptarse a las variaciones en la composición del suelo y en la accesibilidad de los nutrientes. Se pueden distinguir dos tipos de mecanismos de respuesta frente al estrés nutricional: procesos de adaptación a corto plazo, que implican cambios en la expresión génica de los componentes de la homeostasis y detoxificación del metal, descritos en los apartados anteriores; y cambios a largo plazo, que suponen modificaciones epigenéticas del DNA dirigidas a la supervivencia de la progenie en condiciones adversas. Debido a las diferencias entre los diversos metales con respecto a sus propiedades físicas, biodisponibilidad, requerimiento y toxicidad, las plantas poseen diferentes sistemas que permiten responder a cada uno de ellos. A continuación, se indican los síntomas que muestran las plantas en condiciones de déficit y exceso de Cu y se describen los mecanismos de regulación de la homeostasis del Cu.

#### **3.1. Síntomas de deficiencia de cobre y mecanismos de resistencia**

Los síntomas de deficiencia de Cu se manifiestan inicialmente en las hojas jóvenes. Este déficit se caracteriza por la aparición de manchas cloróticas en la punta de las hojas que posteriormente se extienden a los márgenes de las mismas. Las hojas tienden a enroscarse y presentan un aspecto deformado y

flácido que finalmente puede acabar necrótico, debido a una mala lignificación por un descenso severo de la actividad de las enzimas diamino oxidasas y polifenol oxidasas (Marschner, 2002). En condiciones de déficit extremo puede producirse incluso la abscisión prematura de las hojas, mientras que un déficit crónico conlleva el aborto del meristemo apical y a menudo se asocia también a un empobrecimiento de las raíces. En los cereales, la fase reproductiva es más sensible al déficit de Cu que la vegetativa. Los síntomas más habituales de plantas de cultivo crecidas en condiciones deficitarias en Cu son marchitamiento, debilidad del ápice, retardo en alcanzar la madurez o senescencia y esterilidad masculina, que ocasiona pérdidas importantes en la producción de semillas (Graham, 1975). A nivel anatómico, estas plantas desarrollan anteras pequeñas y un escaso número de granos de polen, de tamaño inferior a la media, morfología irregular y mayoritariamente inviables (Graham, 1975; Jewell *et al.*, 1988). Este fenómeno es debido a que el Cu es necesario para la lignificación de la antera, proceso que conlleva su rotura, liberando de esta manera el polen.

Las deficiencias en los niveles nutricionales de Cu se pueden corregir mediante la aplicación de fertilizantes al suelo o directamente pulverizándolos sobre las hojas.

En general, se conocen tres tipos de mecanismos moleculares que permiten responder a la deficiencia de metales. Estos mecanismos comprenden cambios en la expresión génica y la morfología de la planta para la mejora de la adquisición del metal, prioridad del uso del metal en rutas esenciales respecto a no-esenciales, y sustitución de metaloproteínas específicas que utilizan en su centro activo un metal que escasea por otras de función equivalente cuyo metal está disponible.

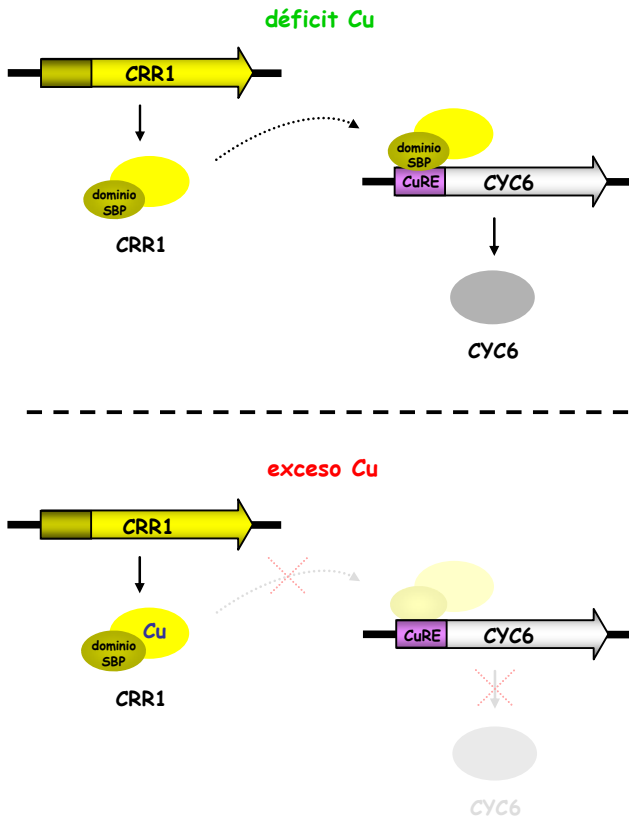
En *Chlamydomonas*, en condiciones deficitarias de Cu, está bien documentada la sustitución de proteínas de Cu por proteínas de Fe

funcionalmente equivalentes (revisado en Merchant *et al.*, 2006). Por ejemplo, las células reemplazan la plastocianina dentro de la cadena fotosintética por CYC6 (del inglés *cytochrome c6*), proteína hemo independiente de Cu (Quinn y Merchant, 1995). Debido a que la plastocianina es esencial y representa alrededor del 59 % del Cu en una célula fotosintética, esta sustitución de Cu por Fe está estrictamente regulada (Li y Merchant, 1995; Quinn y Merchant, 1995). Las plantas superiores no sustituyen la plastocianina en deficiencia de Cu por ser esencial para estos organismos (Weigel *et al.*, 2003) pero, en su lugar, la abundante Cu/ZnSOD cloroplástica (CSD2) es reemplazada por FeSOD (FSD1, del inglés *Fe superoxide dismutase*) en *Arabidopsis* (Abdel-Ghany *et al.*, 2005b). Consecuentemente, también se ha observado en estas condiciones un descenso en la expresión de la carabina molecular para la Cu/ZnSOD, CCS (Abdel-Ghany *et al.*, 2005a). Esta regulación coordinada probablemente permite un uso óptimo de los iones metálicos disponibles en el cloroplasto, cuando escasean, y sugiere que los niveles de Cu en el estroma regulan la expresión nuclear de dichos genes mediante algún mecanismo todavía desconocido (Pilon *et al.*, 2006).

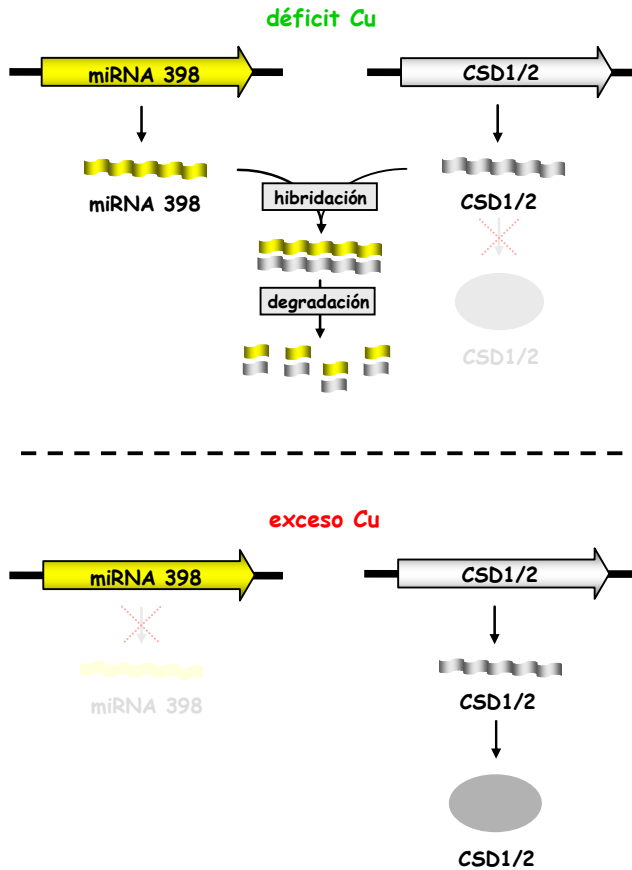
Estudios genéticos y bioquímicos en *Chlamydomonas reinhardtii* muestran que la regulación transcripcional es la primera respuesta al déficit de Cu. En *C. reinhardtii*, se han identificado los elementos de respuesta a Cu, denominados CuRE (del inglés *Cu responsive element*) con secuencia GTAC, que activan la transcripción del gen *CYC6*, entre otros (Quinn *et al.*, 2000). También se ha identificado el gen CRR1 (del inglés *copper response regulator 1*) como responsable de esta activación por déficit de Cu (Eriksson *et al.*, 2004). La proteína Crr1 contiene un dominio de unión al DNA denominado SBP (del inglés *squamosa binding protein*), repeticiones de anquirina y un extremo carboxilo rico en cisteína que presenta similitud a la MT de *Drosophila* (Kropat *et al.*, 2005). Ensayos de movilidad electroforética *in vitro* muestran que, en déficit de Cu, el dominio SBP de Crr1 se une específicamente a CuREs dentro

de la región promotora de *CYC6*, activando su transcripción (Kropat *et al.*, 2005). Cuando el nivel de Cu aumenta, podría desplazar al Zn de los dedos de Zn de la proteína Crr1, inactivando este factor de transcripción (Kropat *et al.*, 2005; Merchant *et al.*, 2006) (Figura I.5). El genoma de *Arabidopsis* contiene 17 proteínas con dominio SBP, denominadas proteínas SPL (del inglés *squamosa protein like*) (Birkenbihl *et al.*, 2005). Estas proteínas pueden dividirse en 2 subfamilias: SPLs largas (SPL1/7/12/14/16), que se expresan constitutivamente; y SPLs cortas (el resto de SPLs), de expresión durante el desarrollo floral (Birkenbihl *et al.*, 2005). El dominio SBP de todas ellas se encuentra interrumpido por un intrón. Un grupo de estas proteínas SPL contiene motivos adicionales que también se encuentran en Crr1, incluyendo tres repeticiones de anquirina en el caso de SPL1/12/14/16 (Kropat *et al.*, 2005). La existencia de varios miembros SPL sugiere un patrón de regulación por Cu específico en diferentes tejidos y etapas del desarrollo. Sin embargo, aún se desconoce si alguna de estas proteínas SPL es la responsable de la regulación génica por deficiencia de Cu en *Arabidopsis*.

En *Arabidopsis*, las estrategias en respuesta a un déficit de Cu conocidas hasta la fecha se limitan a la regulación postranscripcional mediante miRNAs. Los miRNAs son RNAs no codificantes de unos ~ 21 nucleótidos de longitud, procesados a partir de precursores en forma de horquilla por enzimas *Dicer*, que regulan negativamente la expresión génica atenuando la traducción o provocando la fragmentación del mRNA. Concretamente, el miR398 regula negativamente la CSD1 y CSD2 en deficiencia de Cu o durante estrés oxidativo, mediante fragmentación de sus mRNAs diana (Sunkar *et al.*, 2006; Yamasaki *et al.*, 2007) (Figura I.6).



**Figura I.5.** Modelo de la regulación transcripcional mediada por CRR1. Las flechas gruesas representan los genes y los óvalos la proteína. En amarillo se indica la CRR1 y en gris el CYC6. En amarillo oscuro se representa el dominio SBP de unión a DNA y en morado el dominio CuRE (GTAC) de regulación por Cu. CRR1, del inglés *copper response regulator 1*; CYC6, del inglés *cytochrome c6*.



**Figura I.6.** Modelo de la regulación posttranscripcional mediada por el miRNA 398. Las flechas gruesas representan los genes, las líneas onduladas los RNAs y los óvalos las proteínas. En amarillo se indica el miRNA 398 y en gris la CSD1/2. CSD, del inglés *Cu/Zn superoxide dismutase*.

### 3.2. Síntomas de toxicidad del cobre y mecanismos de tolerancia

El estrés oxidativo causado por un exceso de Cu se traduce en daños fisiológicos importantes como una reducción significativa en la altura de las plántulas, en el número y la superficie de las hojas, en el contenido de clorofilas y en la biomasa total (Liu *et al.*, 2001b; McBride, 2001; MacFarlane y Burchett, 2002). Además, la exposición a dosis tóxicas de Cu causa una inhibición en el crecimiento y el número de raíces y una disminución en la tasa de germinación, debido principalmente a daños en la membrana plasmática (De Vos *et al.*, 1989; Strange y Macnair, 1991; Marschner, 2002). También se puede observar clorosis, necrosis y una coloración violeta en las hojas (Drazkiewicz *et al.*, 2004). Los cambios descritos son atribuibles a diferentes mecanismos mediados por el Cu que incluyen la peroxidación de los lípidos de la membrana plasmática (Mithöfer *et al.*, 2004) y la oxidación y entrecruzamiento de grupos tiol de proteínas que pueden causar su inactivación como en el caso de la H<sup>+</sup>-ATPasa de la membrana plasmática (Stadler *et al.*, 2003). Otros efectos descritos conllevan una disminución en la actividad nitrato reductasa necesaria para la asimilación de nitrato, hecho que se traduce en una reducción del nitrógeno total y en el contenido de aminoácidos en las raíces y las hojas (Llorens *et al.*, 2000). Además, también se ha observado que el Cu puede modificar la morfología de los cromosomas durante la división celular (Jiang *et al.*, 2000), y que el estrés oxidativo provocado por un exceso de Cu podría actuar a diferentes niveles sobre la señalización por auxinas (Pasternak *et al.*, 2005) y consecuentemente sobre la morfología de la planta. En los tejidos fotosintéticos, el Cu puede desencadenar el ataque oxidativo en clorofilas, lípidos y proteínas de la membrana tilacoidal, alterando el transporte electrónico en los cloroplastos (Yruela *et al.*, 1996).

El exceso nutricional de Cu en el suelo se puede aliviar mediante la aplicación de métodos químico-físicos. Sin embargo, esta práctica no resulta



rentable dada la infraestructura necesaria y su elevado coste.

Las plantas adaptadas a crecer en suelos inusualmente ricos en metales pesados, llamadas metalófilas, poseen mecanismos de tolerancia o incluso hiperacumulación específicos que están controlados por un escaso número de genes (Macnair, 1993).

A nivel externo, en algunos casos, la formación de micorrizas puede constituir un sistema defensivo contra la toxicidad de los metales (Schützendübel y Polle, 2002). La excreción de ácidos orgánicos como el citrato, el oxalato y el malato también ha sido correlacionada con la tolerancia de las plantas superiores a los metales, especialmente al aluminio, ya que lo complejan en la interfase suelo-raíz (revisado en Rauser, 1999; Ma *et al.*, 2001). Se ha observado que el Cu es un eficiente inductor de la exudación de ácidos orgánicos por las raíces (Yang *et al.*, 2001) y que la adición exógena de malonato y malato alivia la toxicidad derivada de la exposición a este metal (Parker *et al.*, 2001). Por otro lado, Krämer y colaboradores (2000) encontraron que el citrato se acumula en los exudados de las plantas no hiperacumuladoras de metales, previniendo la entrada de Ni y contribuyendo a su destoxificación.

Respecto a los mecanismos internos, la tasa de absorción y de translocación a las partes aéreas son dos factores que determinan la capacidad de acumulación y tolerancia a los metales. Un buen ejemplo lo constituyen las especies hiperacumuladoras que concentran los iones metálicos preferentemente en órganos aéreos, contrariamente a las no acumuladoras que lo hacen en las raíces (Brown *et al.*, 1995). Se ha descrito que la hiperacumulación de Zn en la planta *Thlaspi caerulescens* se correlaciona con una intensa expresión del transportador ZNT1 de la familia ZIP (Pence *et al.*, 2000), y que la exposición a Ni causa un enorme incremento en el contenido de histidina en la savia xilemática de la especie tolerante *Alyssum lesbiacum*, efecto conocido como “la respuesta de la histidina”, que probablemente promueve la movilización de Ni

hacia órganos aéreos (Krämer *et al.*, 1996). Otras estrategias moleculares y bioquímicas de las plantas para la acumulación y tolerancia a metales incluyen la complejación y la compartimentación. En un estudio realizado sobre 10 ecotipos de *Arabidopsis* se puso de manifiesto que el nivel de inducción de las MTs por Cu es el principal determinante de las diferencias en la tolerancia al Cu entre variedades de plántulas no preaclimatadas (Murphy y Taiz, 1995). Finalmente, se ha demostrado la intervención de los mecanismos de reparación de la membrana plasmática en la tolerancia al Cu (De Vos *et al.*, 1989; Strange y Macnair, 1991). La observación de que las MTs pueden ser preniladas sugiere la posibilidad de su participación en la reparación y/o prevención de daños en la membrana plasmática (Murphy *et al.*, 1997). En este sentido, se ha comprobado que las proteínas ACP (del inglés *acyl carrier protein*) y ACBP (del inglés *acylCoA binding protein*), implicadas en el metabolismo lipídico, se inducen en plantas de *Arabidopsis* expuestas a Cu y que la supresión de ACBP, por tecnología antisentido, incrementa la sensibilidad a este metal (Salt *et al.*, 1998). Además, Sunkar y colaboradores (2003) observaron cómo la sobreexpresión de la aldehído deshidrogenasa ALDH3 disminuía la peroxidación lipídica bajo diversas condiciones de estrés, incluyendo un exceso de Cu, proporcionando con ello tolerancia a estos estreses en *Arabidopsis*. El exceso de Cu también induce la CSD1 y CSD2, como mecanismo de prevención del estrés oxidativo derivado del Cu (Abdel-Ghany *et al.*, 2005a).

Respecto a las estrategias de señalización en respuesta a un exceso de Cu, se ha detectado la participación de varias rutas de fosforilación. Las MAPKs (del inglés *mitogen-activated protein kinase*) transducen la información en forma de cascada de fosforilaciones hasta la proteína diana (Schaeffer y Weber, 1999; Widmann *et al.*, 1999). El Cu podría activar estas rutas MAPK mediante los ROS generados en exceso del metal (Jonak *et al.*, 2004).

#### **4. APLICACIONES BIOTECNOLÓGICAS DE LA HOMEOSTASIS DEL COBRE**

La contaminación natural por Cu en el suelo es relativamente poco común en la naturaleza. Sin embargo, algunas actividades humanas han contribuido al incremento de los niveles de Cu y otros metales traza en el agua y el suelo usados para la agricultura. Algunos de los ejemplos son el uso frecuente de fungicidas, pesticidas y herbicidas con elevadas concentraciones de Cu, la aplicación excesiva de fertilizantes que contienen metales para corregir las deficiencias nutricionales del suelo y el uso de abonos orgánicos provenientes de animales alimentados con aditivos metálicos, así como desechos secos y húmedos, aguas residuales industriales y actividades mineras (He *et al.*, 2005). Estas actividades pueden incrementar la concentración de Cu en los campos de cultivo alrededor de 10-20 veces. Entre los cultivos más afectados se encuentran los viñedos, los cítricos y otros árboles frutales (He *et al.*, 2005). Además, la contaminación por metales afecta no sólo a la producción y la calidad nutricional de la cosecha, sino que se extiende a los seres vivos que se alimentan de ella, como los humanos, para los que los vegetales constituyen un componente básico de su nutrición.

La utilización de plantas para descontaminar el ambiente, proceso denominado fitorremediación (revisado en Salt *et al.*, 1998), surgió en la década de los 80 como una tecnología alternativa de bajo coste y ambientalmente sostenible (Krämer, 2005). Una de las estrategias utilizadas es la fitoestabilización, que consiste en el uso de plantas que inmovilizan el metal contaminante en la rizosfera. Estas plantas son tolerantes al metal y desarrollan un extenso sistema de raíces, donde lo acumulan. Pero la estrategia más eficiente, aunque también la más complicada técnicamente, es la fitoextracción, que consiste en el uso de plantas hiperacumuladoras de metales en la parte

aérea. Estas plantas, además de ser tolerantes al metal, son capaces de transportar y acumular en su parte aérea hasta 100-1000 veces la concentración del metal en el suelo, lo que permite una sencilla recolección y procesamiento posterior.

En contraposición a la contaminación por metales, la deficiencia de Cu, y principalmente de Fe, también son un problema que afecta a los alimentos de origen vegetal que forman parte de la dieta humana. En este sentido, las mismas plantas hiperacumuladoras a utilizar en procesos de fitorremediación podrían emplearse para enriquecer el contenido mineral de los alimentos.

Un ejemplo de planta tolerante y acumuladora de Cu con potencial en fitorremediación es *Elsholtzia splendens*, una hierba nativa de China de la familia *Labiata* también conocida como “planta de Cu” (Jiang *et al.*, 2004; Weng *et al.*, 2005). Esta planta crece mayoritariamente en depósitos mineros de Cu y se ha usado como indicador de Cu en prospección de metales. A pesar de que se han identificado más de 25 especies de plantas hiperacumuladoras de Cu, los mecanismos moleculares responsables de esta acumulación son desconocidos.

Actualmente, los esfuerzos están dirigidos a la búsqueda de nuevas especies extractoras con elevadas tasas de crecimiento y biomasa, y a la mejora de la capacidad fisiológica y genética de las plantas para hiperacumular y tolerar altas concentraciones de iones metálicos. El desarrollo de estrategias de fitorremediación eficientes requiere la identificación de los genes responsables de la acumulación y la tolerancia al Cu en las plantas, la caracterización de sus mecanismos funcionales, y el ensayo de las posibles estrategias biotecnológicas en plantas modelo como paso previo a la posible aplicación final en cultivos.

## **OBJETIVOS**

Con la finalidad de diseñar nuevas estrategias biotecnológicas para la fitorremediación de suelos contaminados por Cu, así como para la protección de los vegetales o partes comestibles de las plantas frente a esta contaminación por metales, los esfuerzos de esta Tesis se centraron fundamentalmente en tres objetivos:

1. Identificación de la respuesta molecular a diferentes niveles de Cu en el medio de crecimiento en *Arabidopsis thaliana*. Análisis global de los cambios de expresión génica entre exceso y déficit de Cu, con especial énfasis en:
  - Componentes de la homeostasis del Cu.
  - Procesos generales globalmente regulados.
  - Mecanismos de regulación.
2. Caracterización preliminar de transportadores de Cu de familias génicas que responden a los diferentes niveles del metal en *Arabidopsis thaliana*. Estudio de la participación de estos transportadores en la homeostasis del Cu y en el desarrollo de la planta, mediante el análisis fenotípico de plantas con niveles alterados de los transportadores seleccionados:
  - HMA5, ATPasa tipo P transportadora de Cu.
  - COPT3, transportador de Cu de alta afinidad.
3. Obtención de plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* con posibles aplicaciones biotecnológicas en procesos de fitorremediación, mediante el estudio de la sobreexpresión del transportador de Cu de alta afinidad COPT1 y la mejora de la tolerancia al Cu en las plantas sobreexpresoras.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

## 1. MATERIAL BIOLÓGICO

### 1.1. Manipulación de bacterias

#### 1.1.1. Condiciones de crecimiento y transformación de *Escherichia coli*

La cepa DH5 $\alpha$  de *E. coli* se cultivó a 37 °C y en agitación en medio LB líquido [triptona 1 % (p/v), extracto de levadura 0.5 % (p/v) y NaCl 1 % (p/v)] o sólido [la misma composición con agar bacteriológico 1.5 % (p/v)]. Los medios para la selección de transformantes se suplementaron con 50  $\mu$ g/ml de antibiótico (ampicilina o kanamicina). En el caso de transformaciones con el plásmido pBlueScript (*Stratagene*), las placas se suplementaron con IPTG 1 mM y X-Gal 20  $\mu$ g/ml.

Para las transformaciones por choque térmico, se prepararon células competentes por el método del cloruro de rubidio, siguiendo el procedimiento detallado en Ausubel y colaboradores (1995). La transformación con el DNA plasmídico se efectuó de forma convencional según el protocolo de Hanahan (1983), incubando las células a 42 °C durante 2 min, recuperándolas en LB a 37 °C durante 1 h y creciéndolas en placa con el medio de selección correspondiente durante toda 1 noche, hasta la aparición de transformantes.

#### 1.1.2. Condiciones de crecimiento y transformación de *Agrobacterium tumefaciens*

La cepa C58 de *A. tumefaciens* se cultivó a 30 °C en medio LB líquido o sólido, suplementado con 50  $\mu$ g/ml de kanamicina en el caso de los medios para la selección y crecimiento de transformantes.

Para preparar células competentes, se hizo crecer un cultivo de *A.*



*tumefaciens* en LB hasta una  $OD_{600}$  de 0.5-1.0, las células se recogieron, se lavaron con NaCl 150 mM y se resuspendieron en  $CaCl_2$  20 mM. La transformación se efectuó incubando las células competentes con 1  $\mu$ g de DNA plasmídico a 37 °C durante 4 min, congelándolas rápidamente en  $N_2$  líquido y recuperándolas a 30 °C en LB líquido durante 3 h. Finalmente, se sembraron en medio de selección con antibiótico y se hicieron crecer 2-3 días hasta la aparición de transformantes.

## 1.2. Manipulación de levadura

### 1.2.1. Condiciones de crecimiento y transformación de *Saccharomyces cerevisiae*

Para los experimentos de complementación funcional se utilizó la cepa MPY17 (*MAT $\alpha$* , *ctr1::ura3::kan<sup>R</sup>*, *ctr3::TRP1*, *lys2-801*, *his3*; abreviadamente *ctr1 $\Delta$ ctr3 $\Delta$* ) portadora de una doble delección en los genes de los transportadores de Cu de alta afinidad, cedida por el profesor Dennis J. Thiele (*Duke University Medical Center*). La levadura se cultivó a 30 °C en medio completo YPD [peptona bacteriológica 2 % (p/v), extracto de levadura 1 % (p/v) y glucosa 2 % (p/v)].

Las células de levadura se transformaron por el procedimiento descrito por Gietz y colaboradores (1995). Se recogieron células de un cultivo crecido hasta una  $OD_{600}$  0.5-1.2, se lavaron con  $H_2O$  estéril y se resuspendieron en la solución TE/LiAc [Tris-HCl 10 mM, pH 7.5, EDTA 1 mM y acetato de litio 0.1 M]. Las levaduras se incubaron 15 min a 30 °C y a continuación se añadió DNA de espermatozoos de salmón sonificado, 1  $\mu$ g del DNA plasmídico y 6 volúmenes de la solución PEG/TE/LiAc [polietilenglicol (PEG-4000) 40 % (p/v), Tris-HCl 10 mM, pH 7.5, EDTA 1 mM, acetato de litio 0.1 M]. La suspensión se homogeneizó con vórtex y se incubó 30 min a 30 °C y a continuación se efectuó

un choque térmico de 15 min a 42 °C. Finalmente se recogieron las células y se sembraron en placas con medio de selección que, en todos los casos, fue medio sintético completo SC-ura [YNB (*yeast nitrogen base* con/sin aminoácidos, *Difco*) 0.7 % (p/v), glucosa 2 % (p/v), Tris-HCl 50 mM, pH 5.5 y suplementado con todos los requerimientos nutricionales a excepción de uracilo].

### 1.2.2. Complementación funcional

La cepa *ctr1Δctr3Δ* de levadura se transformó con el vector p426GPD (con el promotor constitutivo del gen *GPD*, del inglés *glycerol-3-phosphate dehydrogenase*) original o con las construcciones derivadas del mismo que contienen las ORFs de los genes de estudio en cada caso (ver apartado 2.3.4 de Materiales y métodos). Los transformantes se hicieron crecer en SC-ura líquido hasta una OD<sub>600</sub> de 1.0 y se realizaron cuatro diluciones seriadas 1:10 de cada cultivo, que fueron crecidas en placas con SC-ura, YPG [extracto de levadura 1 % (p/v), bactopectona 2 % (p/v) y glicerol 3 % (v/v)] y YPG suplementado con CuSO<sub>4</sub> 100 μM. Las placas se incubaron a 30 °C durante 3 días (SC-ura) o 9 días (YPG) y se fotografiaron.

Estos experimentos fueron realizados por el Dr. Sergi Puig y la Lda. Ana Perea en nuestro laboratorio.

## 1.3. Manipulación de plantas

### 1.3.1. Condiciones de crecimiento y tratamiento de *Arabidopsis thaliana*

En esta Tesis se utilizaron plantas de *A. thaliana*, ecotipo *Columbia* (Col 0). Las semillas se sembraron en macetas con sustrato vegetal [mezcla de turba, arena y vermiculita a partes iguales], se cubrieron con una bóveda de plástico

transparente y se estratificaron durante 2 días a 4 °C para sincronizar la germinación. Posteriormente, las macetas se trasladaron a una cabina de crecimiento a 23 °C con fotoperiodo de 16 h (65  $\mu\text{mol}/\text{m}^2$  de luz fluorescente blanca y fría). Las plantas se regaron con solución nutritiva comercial de invernadero o solución Hoagland 0.5 x (*SIGMA*).

Los tratamientos oxidativos se realizaron en plantas adultas (de 3 o 4 semanas) rociándolas con paraquat 3 mM o con peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) 100  $\mu\text{M}$ . En ambos casos, las plantas se lavaron y recolectaron 30 min después del tratamiento.

El tratamiento con Cu sobre plantas adultas se realizó pulverizando una solución de Cu [solución Hoagland 0.02 x (*SIGMA*);  $\text{ZnSO}_4$  2  $\mu\text{M}$  y  $\text{CuSO}_4$  0.8  $\mu\text{M}$ ] sobre la parte aérea de la planta, especialmente sobre los brotes florales.

La sensibilidad de las plántulas a la disponibilidad de Cu en el medio se estudió sembrando las semillas en placa. En primer lugar, fueron esterilizadas de manera superficial con lejía comercial al 30 % (v/v) y Triton X-100 0.02 % (v/v), se lavaron 4 veces con  $\text{H}_2\text{O}$  estéril y se resuspendieron en agarosa 0.1 % (p/v) estéril. Las semillas se estratificaron para una germinación sincronizada y se sembraron en placas con medio estándar de crecimiento  $\frac{1}{2}$  MS (Murashige y Skoog, 1962) [mezcla de sales MS (*SIGMA*) 2.15 g/l; sacarosa 1 % (p/v); MES-KOH 0.5 % (p/v), pH 5.7; fitoagar 0.8 % (p/v) y vitaminas en la cantidad recomendada por el fabricante (*SIGMA*)] o suplementado con las concentraciones indicadas de las sales sulfato de los iones metálicos indicados. En el caso de estudio de las raíces, la mezcla de medio  $\frac{1}{2}$  MS se preparó sin sacarosa, pues impide apreciar las diferencias entre fenotipos al favorecer el crecimiento de las plántulas. Las condiciones de crecimiento en las cabinas fueron las mismas que las indicadas anteriormente para las macetas.

El material recolectado se lavó con EDTA 20  $\mu\text{M}$  y  $\text{H}_2\text{O}$  Milli-Q<sub>PLUS</sub>

(*MILLIPORE*) (sólo en el caso de utilizarse para la determinación del contenido en Cu), se congeló con N<sub>2</sub> líquido y se guardó a -80 °C o bien se homogeneizó inmediatamente con el tampón correspondiente.

### 1.3.2. Transformación y cruce de plantas transgénicas

Las plantas de *A. thaliana* se transformaron siguiendo el procedimiento descrito por Clough y Bent (1998). Brevemente, se hizo crecer un cultivo de *Agrobacterium* transformado con la construcción de interés y las células se resuspendieron en medio de infiltración [sacarosa 5 % (p/v) y Silwet L-77 0.05 % (v/v)] a una OD<sub>600</sub> final de 0.8. Los brotes florales se sumergieron en la suspensión celular durante 5 s. Una vez finalizado el ciclo reproductivo de la planta, se recogieron las semillas producidas. La selección de semillas transgénicas se realizó en placas de MSK (½ MS + kanamicina 10 µg/ml). Los transformantes de primera generación (T1) se transfirieron a sustrato vegetal y se dejaron autopolinizar. Las semillas de la segunda generación (T2) se sembraron nuevamente en MSK y se analizó la segregación de la resistencia a kanamicina. Al menos 6 plantas resistentes de la T2 se transfirieron a sustrato vegetal y las homocigotas se seleccionaron por el crecimiento de toda su descendencia (T3) en MSK.

La técnica utilizada para el cruce de plantas de *Arabidopsis* consistió en frotar suavemente los estambres de las flores de la planta que poliniza (♂), sobre el estigma del pistilo de la planta a polinizar (♀). La selección de semillas procedentes del cruce se realizó por PCR (ver apartado 2.2.3 de Materiales y métodos), a partir de DNA genómico de las plantas como molde y utilizando los oligonucleótidos específicos de las construcciones de interés indicados en la tabla M.1.

**Tabla M.1.** Oligonucleótidos utilizados para seleccionar por PCR las plantas resultado del cruce *CaMV35S::COPT1-HA* x *CaMV35S::TcMT3*. La temperatura indicada corresponde al segmento de hibridación de la PCR.

nombre	secuencia	condiciones
CaMV35S F	5' TCCCACTATCCTTCGCAAGACCC	30 ciclos 60 °C
COPT1 R	5' CCTGAGGGAGGAACATAGTTAG	
CaMV35S F	5' TCCCACTATCCTTCGCAAGACCC	30 ciclos 60 °C
Tc MT3 R	5' GGGAGCTCTTAGTTGGGGCTGCAAGTGCC	

### 1.3.3. Obtención y transformación de protoplastos de *Arabidopsis thaliana*. Detección de señal GFP.

La obtención de protoplastos de *Arabidopsis* se realizó resuspendiendo secciones de 2 g de hojas en 30 ml de la disolución de enzimas. Dicha disolución se preparó disolviendo celulasa R10 1-1.5 % (p/v) y macerozima R10 0.2-0.4 % (p/v) en una mezcla de manitol 0.4 M, KCl 20 mM y MES 20 mM, pH 5.7; tras calentar durante 10 min a 55 °C se añadió CaCl<sub>2</sub> 10 mM y BSA 0.1 % (p/v) y se esterilizó por filtración (0.45 µm). Los protoplastos se infiltraron a vacío y se incubaron en agitación suave durante 3 h a temperatura ambiente en la disolución de enzimas. Los protoplastos se recuperaron por filtración con membrana de nylon (37-75 µm) y centrifugación a 200 g durante 4 min en frío.

Para la transformación de los protoplastos, se lavaron e incubaron en tampón W5 [NaCl 154 mM; CaCl<sub>2</sub> 125 mM; KCl 5 mM y MES 2 mM, pH 5.7] durante 30 min en hielo. Los protoplastos fueron recuperados por centrifugación y resuspendidos en disolución MMg [manitol 0.4 M; MgCl<sub>2</sub> 15 mM y MES 4 mM, pH 5.7]. Se contaron los protoplastos obtenidos usando un hemocitómetro y su concentración se ajustó a 3 x 10<sup>6</sup> células/ml. A continuación, se añadieron

10-20  $\mu\text{g}$  de DNA plasmídico y solución PEG [polietilenglicol (PEG 4000) 40 % (p/v); manitol 0.4 M;  $\text{CaCl}_2$  0.1 M; pH 8.0 con KOH] y, tras agitar suavemente, se incubaron durante 30 min a temperatura ambiente. Los protoplastos se lavaron lentamente con tampón W5 y se incubaron en este mismo tampón durante 16 h en luz.

Para la detección de la señal GFP (del inglés *green fluorescence protein*) introducida en protoplastos por transformación, se tomaron imágenes usando el microscopio confocal de fluorescencia *Olympus Fluoview 300 inverted confocal laser scanning microscope (1 x 70)* o *Microscopio confocal LEICA mod. TCS SP vertical (DM-R)* equipados con láser de excitación de Argón (458 y 488 nm) y lentes de objetivo 60 x. La señal fluorescente correspondiente a la GFP se detectó a 530 nm y la correspondiente a la clorofila (control) a 660 nm. Las imágenes finales se compusieron a partir de la superposición de 8 imágenes, obtenidas por escaneado de secciones de 1  $\mu\text{m}$  de espesor.

## 2. AISLAMIENTO Y ANÁLISIS DE ÁCIDOS NUCLEICOS

### 2.1. Aislamiento de ácidos nucleicos

Para el aislamiento a pequeña escala de plásmidos de *E. coli*, se hicieron crecer cultivos de 3 ml de LB con el antibiótico correspondiente para seleccionar el plásmido. El DNA plasmídico se aisló de las células recuperadas usando el kit comercial *Perfectprep Plasmid Mini (ependorf)*.

El DNA genómico de *Arabidopsis* se aisló a partir de hojas de planta adulta. El tejido se trituró en un mortero con  $\text{N}_2$  líquido y se homogeneizó en tampón de lisis [Tris-HCl 100 mM, pH 8; EDTA 50 mM, pH 8; NaCl 0.5 M;  $\beta$ -mercaptoetanol 10 mM y SDS 1.5 % (p/v)]. El extracto se incubó 10 min a 65

°C y se renaturalizó el DNA genómico por adición de acetato potásico 1 M e incubación en hielo durante 10 min. Los restos celulares se separaron de la fase acuosa por centrifugación a 12000 rpm durante 10 min. Los ácidos nucleicos se extrajeron por separación en fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) y precipitación con isopropanol frío y acetato amónico durante 30 min a -20 °C. El precipitado, separado por centrifugación a 12000 rpm durante 10 min, se lavó con etanol 70 % (v/v) y se resuspendió en H<sub>2</sub>O estéril. El RNA se eliminó por tratamiento con RNAsa 0.02 µg/ml.

El RNA para RT-PCR se aisló de los órganos indicados en cada caso usando el kit comercial *Total quick RNA kit (TALENT)*. El DNA se eliminó por tratamiento con DNAsa libre de RNAsa a 37 °C durante 30 min.

Los ácidos nucleicos se cuantificaron por determinación de la absorbancia a 260 nm y haciendo uso de las siguientes fórmulas:  $\mu\text{g/ml (RNA)} = A_{260}/0.025$ ;  $\mu\text{g/ml (DNA)} = A_{260}/0.02$ .

## 2.2. Técnicas para el análisis de los ácidos nucleicos

### 2.2.1. Electroforesis de DNA y purificación de bandas

Los productos de PCR se visualizaron en geles de agarosa al 1 % (p/v) en tampón TAE [Tris 40 mM; ácido acético glacial 1.14 ml/l y EDTA 20 mM] teñidos con bromuro de etidio 10 µg/ml y separados electroforéticamente con una corriente eléctrica de 100 V. Las muestras se prepararon en tampón de carga 6 x [glicerol 50 % (v/v); azul de bromofenol 0.05 % (p/v); EDTA 100 mM].

Las bandas de DNA se cortaron y purificaron a partir del gel con el kit comercial *illustra™ DNA and Gel Band Purification kit (GE Healthcare)*.

### 2.2.2. Electroforesis de RNA

La integridad del RNA se valoró visualmente en geles de agarosa al 1 % (p/v) en tampón MOPS [MOPS 20 mM; acetato sódico 5 mM; EDTA 1 mM; pH 8.0 con NaOH] con formaldehído 2.2 M como desestabilizador de la estructura secundaria. Las muestras se prepararon en tampón de carga [formamida desionizada 50 % (v/v) en MOPS 1 x; formaldehído 17 % (v/v); bromuro de etidio 20 µg/ml] y se desnaturalizaron a 65 °C durante 10 min antes de ser inyectadas en el gel.

### 2.2.3. RT-PCR semicuantitativo

El análisis de la expresión génica se realizó mediante RT-PCR semicuantitativa a partir del RNA total, una vez aislado de los órganos y tratamientos indicados, cuantificado y analizada su integridad mediante electroforesis. En primer, lugar se convirtió el RNA (1.5 µg) en cDNA por una reacción de transcripción reversa. Para ello, se añadieron los oligonucleótidos reversos del gen de interés u oligo (dT)<sub>15</sub> (*Roche*) y del RNA ribosómico *18S* 1 µM (Tabla M.2) en un volumen final de 12 µl. El RNA se desnaturalizó a 70 °C durante 10 min y, después de enfriar en hielo, se añadieron 4 µl del tampón RT 5 x; 2 µl de DTT 0.1 M (ambos de *GibcoBRL*); 1 µl de dNTPs 10 mM (*Promega*) y 1 µl de *SuperScrip II reverse transcriptase* 200 U/µl (*GibcoBRL*). La reacción se incubó 1 h a 42 °C y se inactivó la enzima a 70 °C durante 15 min.



**Tabla M.2.** Oligonucleótidos utilizados para medir los niveles relativos de expresión de *HMA5*, *COPT1* y *COPT3* por RT-PCR semicuantitativa. La temperatura indicada corresponde al segmento de hibridación de la PCR.

nombre	secuencia	condiciones
HMA5 F	5' GGCTATCAAAGCGTCTCCCTGG	40 ciclos 60 °C
HMA5 R	5' CCTCCAATAGTCTATCATAGC	
COPT1 F	5' CAATGGATCCATGAACGAAGG	30 ciclos 60 °C
COPT1 R	5' CCTGAGGGAGGAACATAGTTAG	
COPT3 F	5' GATCTTCTCCGGCGGCTCCGG	32 ciclos 55 °C
COPT3 R	5' GTGACTGTTACTGCTAGTGGC	
18S F	5' TGGGATATCCTGCCAGTAGTCAT	20 ciclos 55 °C
18S R	5' CTGGATCCAATTACCAGACTCAA	

El cDNA obtenido se usó como molde para amplificar el gen de interés y el *18S*, como gen control de carga, en reacciones independientes de PCR. La mezcla de reacción contenía, además del cDNA molde, los oligonucleótidos específicos del gen de interés 0.5  $\mu\text{M}$  (Tabla M.2); dNTPs 0.2 mM; tampón comercial de PCR 1 x;  $\text{MgCl}_2$  1.5 mM y BioTaq polimerasa 0.5 U, en un volumen final de 25  $\mu\text{l}$ . Las condiciones de PCR fueron las indicadas para cada par de oligos (Tabla M.2): ciclos de tres segmentos de 30 s cada uno, excepto 1 min para la elongación de *HMA5* (desnaturalización a 94 °C; hibridación; y elongación a 72 °C). Para comprobar que se trabajaba en condiciones cuantitativas, dentro del intervalo de amplificación lineal, se efectuaron en paralelo diversas series de PCRs con relaciones de molde crecientes y comprobando que la relación señal/molde se mantenía constante. Los productos de PCR se visualizaron por electroforesis y se fotografiaron.

#### 2.2.4. Micromatrices de DNA

El análisis a gran escala de la expresión génica de *Arabidopsis* en respuesta a diferentes niveles de Cu en el medio se realizó mediante micromatrices o chips de oligonucleótidos. Los chips utilizados fueron adquiridos de la *University of Arizona* como *Galbraith Laboratory Operon Long Oligonucleotide Microarray version 3.0 Platform GPL1775 (ATv301.02.Z y ATv301.02.Z)* (<http://www.ag.arizona.edu/microarray>). Estas matrices de oligonucleótidos están producidas a partir del *Array-Ready Oligo set* (AROS), que comprende 29110 70-mer oligonucleótidos representando 26173 genes codificantes de proteínas, 28964 transcritos de genes codificantes de proteínas y 87 precursores de genes de miRNAs. El diseño de AROS se basa en *ATH1 release 5.0* de la base de datos *TIGR Arabidopsis genome annotation database* (<http://www.tigr.org/tdb/e2k1/ath1/>), y en *Release 4.0* del *miRNA Registry* en el *Sanger Institute* (<http://www.sanger.ac.uk/Software/Rfam/mirna/index.shtml>). Varios elementos adicionales se incluyen como controles.

La micromatriz se hibridó con RNAs de plántulas crecidas en las dos condiciones a comparar, amplificadas y marcadas con aminoalilo conjugado a un éster fluorescente diferente para cada muestra (Cy3/MS y Cy5/Cu; *CyTMDye Post-labelling Reactive Dye Pack, GE Healthcare*) mediante el kit comercial *MessageAmp aRNA kit (Ambion)*, reduciendo a la mitad las cantidades de reactivos y enzimas utilizadas recomendadas por el fabricante. Tanto la amplificación como el marcaje, se cuantificaron en un espectrofotómetro *NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometen*. La hibridación manual de las micromatrices se realizó siguiendo el siguiente protocolo: las micromatrices se hidrataron, exponiéndolas 3 veces a vapor de agua a 65 °C durante 5 s, y a continuación se entrecruzaron por irradiación ultravioleta (UV) de 65 mJ en un *UV Stratalinker 1800 (Stratagene)*. Las micromatrices se lavaron 2 veces con SDS 0.2 x y 4 veces con H<sub>2</sub>O MilliQ<sub>PLUS</sub> (*MILLIPORE*), y

se secaron por centrifugado a 2000 rpm. Seguidamente, se prehibridaron durante 30 min a 42 °C con disolución de prehibridación [BSA 1 % (p/v); SSC 6 x y SDS 0.5 % (p/v)]. A continuación, se lavaron de nuevo con H<sub>2</sub>O MilliQ<sub>PLUS</sub> (MILLIPORE) y se secaron por centrifugación. Las micromatrices se hibridaron durante toda la noche a 37 °C, con disolución de hibridación [~ 250 pmol de cada uno de los fluoróforos; formamida desionizada 50 % (v/v); SSC 6 x; *Denhardt's* 5 x y SDS 0.5 % (p/v)]. La disolución de hibridación se desnaturalizó durante 5 min a 95 °C, y se inyectó entre la micromatriz y un cubreobjetos *LifterSlip*<sup>TM</sup> (*Erie Scientific*). Tras la hibridación, las micromatrices se lavaron con SSC y SDS en concentraciones decrecientes y se secaron mediante centrifugado a 2000 rpm. La micromatriz hibridada fue analizada con un escáner *GenePix 4000B* (*Axon Molecular Devices, Sunnyvale CA*) a 532 nm (Cy3) y 635 nm (Cy5). Los valores de expresión se obtuvieron usando el programa *GenePix Pro 6.0 microarray-analysis software* (*Axon Molecular Devices, Sunnyvale CA*) y se normalizaron con el programa *GenePix Pro 6.0* y *Acuity 4.0 software* (*Axon Molecular Devices, Sunnyvale CA*). Los datos normalizados se procesaron con el programa *FatiScan* del conjunto de herramientas *GEPAS Gene Expression Pattern Analysis Suite v3* (<http://fatiscan.bioinfo.cipf.es/>) para su clasificación por categorías funcionales (según descritas en la base de datos *Gene Ontology*).

Estos experimentos se llevaron a cabo en el laboratorio del Dr. Miguel Ángel Pérez Amador (*IBMCP, CSIC-UPV, Valencia*), con la ayuda de la Dra. Eavan Dorcey.

### 2.2.5. Análisis de secuencias

Las secuencias de las proteínas de la familia P<sub>1B</sub> de ATPasas, su clasificación y sus características principales se obtuvieron en la página web <http://www.patbase.kvl.dk>. El alineamiento y los valores de identidad entre dichas proteínas se obtuvieron con el programa *DNAMAN* (*Lynnon Biosoft*). El

modelo de topología de la proteína HMA5 fue desarrollado a partir del mostrado en Lutsenko y Petris (2002).

El análisis teórico de las secuencias promotoras se realizó mediante la base de datos *PLACE Plant cis-acting regulatory DNA elements* (<http://www.dna.affrc.go.jp/htdocs/PLACE/signalscan.html>). La predicción teórica de posibles secuencias señal de localización se realizó con el programa *PSORT Prediction of Protein Localization Sites version 6.4* (<http://psort.nibb.ac.jp/form.html>).

## **2.3. Diseño de construcciones**

### *2.3.1. Reacciones enzimáticas*

Las reacciones de restricción analítica se efectuaron incubando 0.5 µg del DNA plasmídico con 2.5 U de la enzima de restricción apropiada en el tampón recomendado por el fabricante durante 2 h a 37 °C. Para las digestiones preparativas, se digirieron 1-5 µg de DNA con 2 U de la enzima durante 14 h.

Para las desfosforilaciones de vectores se usó fosfatasa alcalina de gamba (*Roche*) siguiendo el protocolo recomendado por la casa comercial.

La obtención de extremos romos se realizó incubando el correspondiente DNA con *Klenow* cuando los extremos eran 5' protuberantes, siguiendo las recomendaciones de Ausubel y colaboradores (1995), o bien con DNA polimerasa del bacteriófago (*Promega*) en el caso de extremos 3' protuberantes.

Las ligaciones se llevaron a cabo con ligasa del bacteriófago T4 (*Promega*) siguiendo las recomendaciones del fabricante.

### 2.3.2. Sobreexpresión génica en *Arabidopsis* e inmunolocalización mediante el epítipo HA

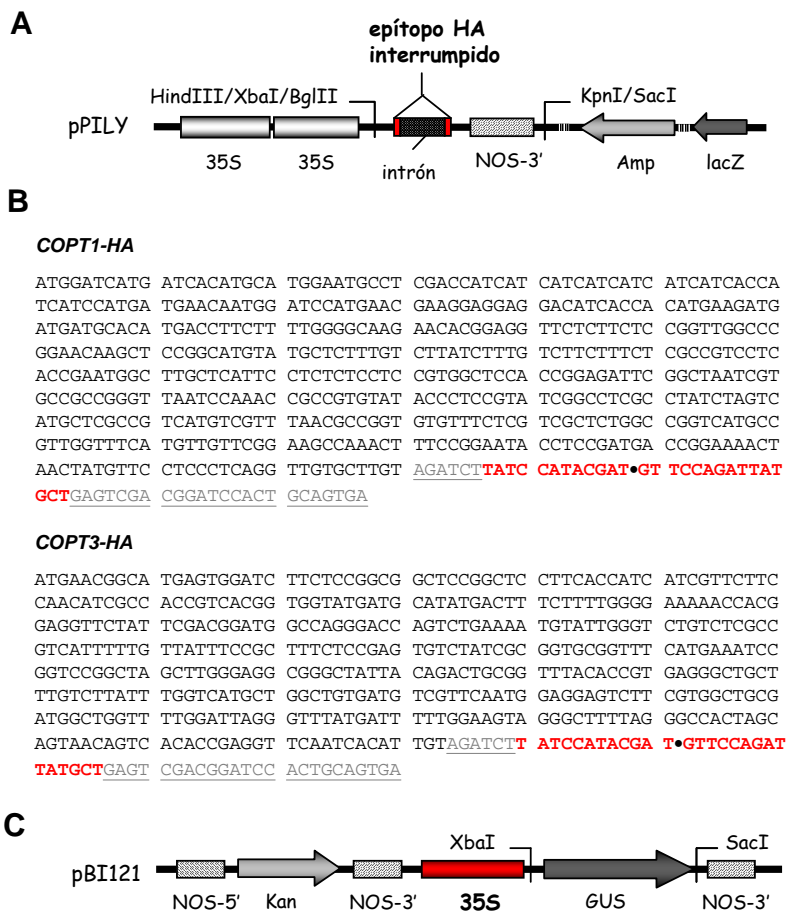
El inserto que contiene el DNA completo del gen a sobreexpresar se amplificó por PCR (ver apartado 2.2.3 de Materiales y métodos) a partir de DNA genómico de *Arabidopsis* y utilizando los oligonucleótidos específicos indicados en la tabla M.3, que introducen sitios de restricción adecuados para la construcción de interés.

**Tabla M.3.** Oligonucleótidos utilizados para amplificar por PCR los genes a sobreexpresar. La temperatura indicada corresponde al segmento de hibridación de la PCR. Los sitios de restricción insertados se destacan en negrita.

nombre	secuencia	condiciones
C1-XbaI F	5' GCTCTAGACCATGGATCATGATCACATGC	33 ciclos
C1-BglII R	5' GAAGATCTACAAGCACAACTGAGGGAGG	58 °C
C3-XbaI F	5' GCTCTAGAATGAACGGCATGAGTGGATC	33 ciclos
C3-BglII R	5' GAAGATCTACAATGTGATTGAACCTCGG	58 °C

A continuación, se etiquetó el extremo carboxilo del gen a sobreexpresar con el epítipo de la hemaglutinina humana del virus influenza (HA), mediante su inserción en el vector pPILY (Ferrando *et al.*, 2000) con las enzimas de restricción XbaI y BglII (Figura M.1.A y M.1.B). El epítipo HA fusionado se encuentra interrumpido por un intrón que evita su procesado en bacterias (Figura M.1.A y M.1.B).

Posteriormente, se dirigió la expresión del gen etiquetado con el promotor constitutivo del gen 35S del virus del mosaico de la coliflor (*CaMV35S*, del inglés *Cauliflower Mosaic Virus 35S*), mediante su inserción en el vector binario pBI121 con las enzimas de restricción XbaI y SacI (Figura M.1.C).



**Figura M.1.** Diseño de la construcción para la sobreexpresión de *COPT1* y *COPT3*, así como para su inmunolocalización, en *Arabidopsis*. **(A)** Esquema del vector pPILY. El epítipo está representado en rojo. Los diferentes sitios de restricción utilizados están indicados. **(B)** Secuencia de nucleótidos de la fusión del gen de interés al epítipo HA. La secuencia codificante del gen de interés está representada en negro y la del epítipo HA en rojo. El punto negro representa el intrón que interrumpe el epítipo. La secuencia adicional para la fusión en pauta de lectura y hasta el codón de parada de la transcripción TGA está representada en gris y subrayada. **(C)** Esquema del vector pBI121. El promotor constitutivo del gen *CaMV35S* está representado en rojo. Los diferentes sitios de restricción utilizados están indicados. Amp, ampicilina; GUS,  $\beta$ -glucuronidasa; Kan, kanamicina; lacZ,  $\beta$ -galactosidasa; NOS, secuencia de poliadenilación del gen nopalina sintasa; 35S, promotor del gen 35S del virus del mosaico de la coliflor (*CaMV35S*).

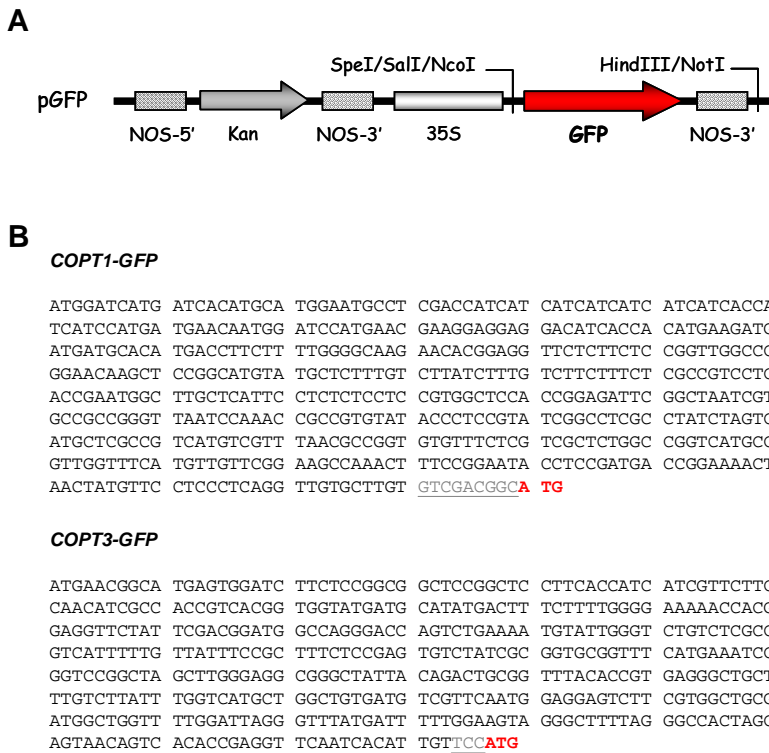
### 2.3.3. Localización subcelular en *Arabidopsis* mediante el gen testigo GFP

El DNA completo del gen que codifica la proteína que se quiere localizar, se amplificó por PCR (ver apartado 2.2.3 de Materiales y métodos) a partir de DNA genómico de *Arabidopsis* y utilizando los oligonucleótidos específicos indicados en la tabla M.4, que introducen sitios de restricción adecuados para la construcción de interés.

**Tabla M.4.** Oligonucleótidos utilizados para amplificar por PCR los genes a etiquetar con la proteína GFP. La temperatura indicada corresponde al segmento de hibridación de la PCR. En negrita se destacan los sitios de restricción insertados.

nombre	secuencia	condiciones
C1-SpeI F	5' AAAAAA <b>ACTAGT</b> ATGGATCATGATCACATG	30 ciclos
C1-SalI R	5' AAAAAA <b>AGTCGAC</b> ACAAGCACAACTGAGGG	60 °C
C3-SalI F	5' CCACG <b>CGTCGAC</b> ATGAACGGCATGAGTGGATC	35 ciclos
C3-NcoI R	5' CCAT <b>GCCATGGA</b> ACAATGTGATTGAACCTCGG	55 °C

La estrategia utilizada consistió en fusionar, al gen de interés, el gen testigo *GFP* y someter la expresión de dicha fusión al control del promotor constitutivo del gen *CaMV35S*. Para ello, se insertó el gen amplificado en el vector pGFPau (COPT1) o p35Ω-sGFP(S65T) (COPT3), con las enzimas de restricción correspondientes en cada caso (Figura M.2).



**Figura M.2.** Diseño de la construcción para la localización subcelular de COPT1 y COPT3 en *Arabidopsis*. **(A)** Esquema de los vectores pGFP. El gen *GFP* está representado en rojo. Los diferentes sitios de restricción utilizados están indicados. **(B)** Secuencia de nucleótidos de la fusión del gen de interés al gen *GFP*. La secuencia codificante del gen de interés está representada en negro y el codón de inicio de la transcripción del gen *GFP* en rojo. La secuencia adicional para la fusión en pauta de lectura está representada en gris y subrayada. Kan, kanamicina; NOS, secuencia de poliadenilación del gen nopalina sintasa; 35S, promotor del gen 35S del virus del mosaico de la coliflor (*CaMV35S*); GFP, del inglés *green fluorescence protein*.



### 2.3.4. Complementación funcional en levadura

Las construcciones de interés fueron recuperadas del plásmido correspondiente en cada caso e insertadas en los sitios de restricción, especificados en la tabla M.5, del vector de expresión en levadura p426GPD (Mumberg *et al.*, 1995). En el caso de la construcción *COPT3-GFP*, fue necesaria una reacción de PCR para insertar en los extremos de la construcción los sitios de restricción HindIII/SalI que permitían su inserción en el vector p426GPD. Por otro lado, se utilizaron como controles positivos los genes *ScCTRI*, *COPT1* y *COPT3* ya subclonados en el vector p426GPD (Sancenón *et al.*, 2003).

Estos experimentos fueron realizados por el Dr. Sergi Puig y la Lda. Ana Perea en nuestro laboratorio.

**Tabla M.5.** Vectores de procedencia y enzimas de restricción utilizadas para la inserción de las construcciones de interés en el vector de expresión en levadura p426GPD.

construcción	vector de procedencia	enzimas de restricción
COPT1-HA	pPILY	HindIII/KpnI
COPT3-HA	pPILY	HindIII/KpnI
COPT1-GFP	pGFPau	SpeI/HindIII
COPT3-GFP	p35 $\Omega$ -sGFP(S65T)	SalI/NotI – HindIII/SalI

### 2.4. Identificación de plantas mutantes por inserción de T-DNA en homocigosis

Los mutantes por inserción de T-DNA en el gen HMA5 fueron obtenidos previamente en nuestro laboratorio por el Dr. Vicente Sancenón.

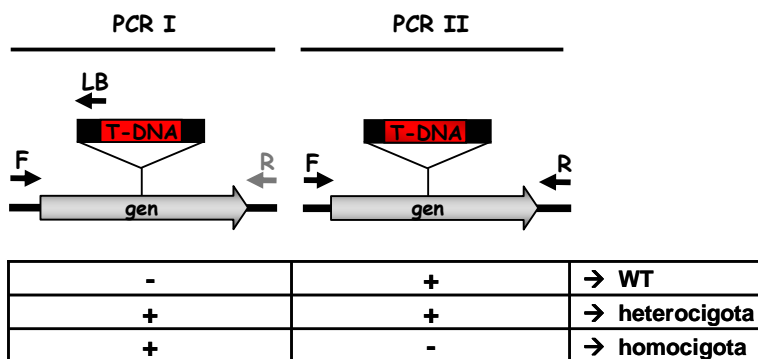
Para genotipar las plantas de una población segregante perteneciente a una de las líneas mutantes por inserción de T-DNA, se preparó DNA genómico

de cada una de las plantas de la población y se efectuaron dos rondas de PCR, la primera con los oligonucleótidos que sirven para identificar la línea (F + LB o R + LB) y la segunda con los dos oligonucleótidos flanqueantes del gen (F + R) (Tabla M.6).

**Tabla M.6.** Oligonucleótidos utilizados para identificar la inserción de T-DNA en el gen *HMA5*. La temperatura indicada corresponde al segmento de hibridación de la PCR.

nombre	secuencia	condiciones
HMA5 KO F	5' CAAGATTTCGCGCACAAGACGATCGATTAC	35 ciclos 65 °C
HMA5 KO R	5' CTCGCTCCACCTGAAATCTCCCGAATCTCC	
LB	5' GGCAATCAGCTGTTGCCCGTCTCACTGGTG	

Las plantas que llevan la inserción en homocigosis dan positivo en la primera ronda y negativo en la segunda (ya que el tamaño del T-DNA excede la procesividad de la polimerasa), mientras que las heterocigotas dan positivo en ambas rondas y las salvajes sólo en la segunda (Figura M.3).



**Figura M.3.** Representación de la estrategia de PCR utilizada para determinar el genotipo de las líneas mutantes por inserción de T-DNA. Las flechas cortas representan los oligonucleótidos utilizados; las flechas gruesas representan el gen de interés; la barra roja representa el T-DNA.

### 3. AISLAMIENTO Y ANÁLISIS DE PROTEÍNAS

#### 3.1. Extracción de proteínas totales y fraccionamiento subcelular

Para la obtención de proteínas totales de la planta, se trituraron hojas de planta adulta con tampón de extracción frío [NaCl 100 mM; Tris-HCl 50 mM, pH 7.5, Triton X-100 0.5 % (v/v); DTT 1 mM y PMSF 1 mM]. Tras centrifugación a 13000 rpm durante 1 min, el sobrenadante se utilizó como extracto crudo y la cantidad de proteína total se determinó de forma convencional por el método Bradford (1976), siguiendo el protocolo detallado en Ausubel y colaboradores (1995).

Para el aislamiento de cloroplastos y su fraccionamiento, se trituraron 12-25 g de hojas de plantas adultas en 100 ml de tampón de homogeneización (tampón H) [sorbitol 330 mM; tricina-KOH 20 mM, pH 8.4; EGTA 5 mM; Na<sub>2</sub>EDTA 5 mM, NaHCO<sub>3</sub> 10 mM; BSA 0.1 % (p/v) e isoascorbato 330 mg/l] frío. La suspensión se filtró con algodón envuelto en muselina, recogiendo lo que se consideró el homogeneizado total crudo (dividido en 4 partes iguales). A partir de este punto el procedimiento se realizó a 0-4 °C. La fracción cruda de cloroplastos se obtuvo, por centrifugación de la suspensión a 2000 rpm durante 4 min en un rotor basculante y se resuspendió en tampón H conteniendo Percoll al 40 % (v/v). La suspensión se colocó sobre un gradiente de Percoll [de abajo a arriba: 4 ml Percoll/tampón H 70 % (v/v); 8 ml Percoll/tampón H 50 % (v/v) y 4 ml Percoll/tampón H 40 % (v/v) en un tubo de policarbonato, con el tampón H conteniendo 132 g/ml glutatión] y se centrifugó 10 min a 5000 rpm en el rotor basculante. La banda en la interfase 50-70 % se diluyó con 3-4 volúmenes de tampón H, de donde se recuperaron los cloroplastos por centrifugación a 3000 rpm durante 3 min en rotor basculante y se lavaron con tampón H en una microcentrífuga. El número de cloroplastos obtenidos fue comparado con el

contenido en clorofila según se determina por el método de Bruinsma (1961). Tras el ensayo de clorofila, los cloroplastos se recuperaron de nuevo por centrifugación, se resuspendieron en tampón H a una concentración de clorofila 1 mg/ml, y se almacenaron en hielo y oscuridad.

Las fracciones de estroma y de tilacoides se obtuvieron a partir de los cloroplastos almacenados. Los cloroplastos se centrifugaron 2 min a 2000 rpm en rotor basculante y se incubaron en 3 volúmenes de tampón Tris 10 mM, pH 8.0, durante 3 min en hielo. A continuación, se añadieron otros 3 volúmenes de tampón de importación (tampón I) 2 x [Hepes-KOH 100 mM, pH 8.0 y sorbitol 660 mM] y se incubaron 1 min en hielo. Tras centrifugación a 4500 rpm durante 5 min, aún en rotor basculante, el sedimento constituyó la fracción tilacoidal y el sobrenadante la del estroma. La fracción tilacoidal se resuspendió en tampón H a una concentración de clorofila 1 mg/ml. La fracción proteica del estroma se limpió por centrifugación durante 10 min a máxima velocidad en un rotor de ángulo fijo y se determinó la cantidad de proteínas por el método Bradford (1976).

El aislamiento y fraccionamiento de los cloroplastos se llevaron a cabo en el laboratorio del Dr. Marinus Pilon (*Colorado State University*).

### **3.2. Electroforesis de proteínas y tinción del gel**

Habitualmente se mezclaron 20 µg de proteína con disolvente de muestras 2 x [Tris-HCl 250 mM, pH 6.8; glicerol 20 % (v/v); SDS 4 % (p/v); β-mercaptoetanol 10 % (v/v) y azul de bromofenol 0.025 % (p/v)], se desnaturalizaron a 65 °C durante 5 min y se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida al 15 % (p/v) con SDS, según fue descrito inicialmente por Laemmli (1970).

Las proteínas en el gel de poliacrilamida pueden teñirse sumergiendo el

gel durante 30 min en disolución colorante [azul de Coomassie 0.1 % (p/v); ácido acético 8 % (v/v) y metanol 40 % (v/v)] y, posteriormente, durante 1 h en disolución decolorante [ácido acético 5 % (v/v) y metanol 20 % (v/v)].

### 3.3. Transferencia de geles de proteínas a membrana e inmunodetección

El análisis de proteínas por *Western blot* se realizó electrotransfiriendo los geles de proteínas, sin teñir, a una membrana de nitrocelulosa de 0.45  $\mu\text{m}$  (*BioRad*) a 20 V durante toda la noche o 40 V durante 2 h, utilizando tampón de transferencia [Tris 25 mM, pH 9.3; glicina 192 mM y metanol 20 % (v/v)].

La inmunodetección en membrana se realizó utilizando los anticuerpos correspondientes a la dilución adecuada para cada uno de ellos (Tabla M.7) en tampón TTBS [Tris-HCl 20 mM, pH 7.5; NaCl 0.5 M y Tween-20 0.1 % (v/v)]. En primer lugar, se bloqueó la membrana con leche desnatada en polvo al 3 % (p/v) durante 30 min y se lavó con tampón TTBS 5 min. La membrana se incubó con el anticuerpo primario durante 1 h y se lavó con TTBS 4 veces, de 5 min cada una. La incubación con el anticuerpo secundario correspondiente (Tabla M.7) se realizó durante 30 min y se lavó con TTBS 3 veces, de 5 min cada una, y una última vez con TBS (sin Tween-20). La detección final del complejo antígeno/anticuerpo-peroxidasa se efectuó con el sistema *ECL* (*Amersham*), siguiendo las recomendaciones del fabricante y exponiendo la membrana a películas fotográficas (*Kodak X-Omat*; *Fuji Medical X-RAY Film*). Para la detección final del complejo antígeno-anticuerpo/fosfatasa alcalina se incubó la membrana con NBT/BCIP (*Sigma*) en tampón AP [Tris 0.1 M, pH 9.5; NaCl 0.5 M y  $\text{MgCl}_2$ ] hasta la aparición de la señal, parando la reacción con  $\text{H}_2\text{O}$  destilada.

**Tabla M.7.** Anticuerpos utilizados en la inmunodetección de proteínas en membrana. Se indica la dilución utilizada para cada uno de ellos. HA, epítipo de la hemaglutinina humana del virus influenza; PC, plastocianina; CpNifS, cisteína desulfurasa cloroplástica; SEC12, glicoproteína integral de membrana; RE, retículo endoplasmático.

anticuerpo 1°		anticuerpo 2°	
anti-HA (3F10, Roche)	1/1000	anti-IgG de rata / peroxidasa	1/3000
		anti-IgG de rata / fosfatasa	1/10000
anti-PC, en tilacoides (De Boer <i>et al.</i> , 1988)	1/2000	anti-IgG de conejo / fosfatasa	1/20000
anti-CpNifS, en estroma (Pilon-Smith <i>et al.</i> , 2002)	1/2000	anti-IgG de pollo / fosfatasa	1/20000
anti-SEC12, en RE (Bar-Peled y Raikhel, 1997)	1/2000	anti-IgG de conejo / fosfatasa	1/20000

## 4. TÉCNICAS PARA EL ESTUDIO DE LAS PLANTAS

### 4.1. Medida del peso fresco y de la longitud de la raíz de plántulas

Tanto para determinar el peso fresco, como la longitud de las raíces de las plántulas, se sembraron semillas en placas de medio MS o suplementado con las concentraciones indicadas de ión metálico. Para poder cuantificar la longitud de las raíces, las placas se incubaron en posición vertical durante todo el periodo de crecimiento de las plantas.

Las medidas de peso fresco se tomaron con una balanza de precisión y las de longitud de las raíces con una regla milimétrica. En ambos casos, se determinó el valor promedio de 5 plántulas de 8 días. Las correspondientes desviaciones estándar se calcularon a partir de tres experimentos independientes.

Se tomaron imágenes representativas de los fenotipos observados con una

cámara de fotos digital acoplada a una lupa estereoscópica (*Motic*) con el software *Motic images 2000 1.1* o con una cámara fotográfica digital (*Nikon*).

#### **4.2. Determinación del contenido endógeno de cobre en plántulas**

Para determinar el contenido en Cu de semillas y plántulas, se lavó el material recogido con EDTA 20  $\mu\text{M}$  y  $\text{H}_2\text{O}$  MilliQ<sub>PLUS</sub> (*MILLIPORE*), se secó, se congeló en  $\text{N}_2$  líquido y se liofilizó. Alrededor de 20 mg de tejido liofilizado se digirió en 0.5 ml de  $\text{HNO}_3$  65 % (v/v) *Suprapur*® durante 12 h a 100 °C. Después de diluir con 2 ml de  $\text{H}_2\text{O}$  MilliQ<sub>PLUS</sub> (*MILLIPORE*), el contenido en Cu de cada muestra se determinó por espectrofotometría de absorción atómica en cámara de grafito (*Zeeman, 4100ZL Perkin Elmer*) e interpolando en una recta de calibrado. Las medidas se tomaron por triplicado a partir de dos experimentos independientes y se representó el valor promedio, normalizado respecto al control WT, con su correspondiente desviación estándar.

Las medidas de absorción atómica se realizaron en el SCSIE de la *Universitat de València*.

#### **4.3. Análisis semicuantitativo de la actividad superóxido dismutasa**

El material de partida utilizado fueron hojas de plantas adultas, que se trituraron en  $\text{N}_2$  líquido. Las muestras se prepararon, según se describe en Bowler y colaboradores (1989), añadiendo tampón de homogeneización [ $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$  50 mM, pH 7.4; BSA 0.1 % (p/v); ascorbato 0.1 % (p/v);  $\beta$ -mercaptoetanol 0.05 % (v/v) y Triton X-100 0.2 % (v/v)], agitando en vórtex y eliminando los restos celulares por centrifugación a 14000 rpm durante 15 min. La cantidad de proteína se determinó por el método Bradford (1976). Alrededor de 20  $\mu\text{g}$  de proteína se mezclaron con disolvente de muestras 2 x [Tris-HCl

250 mM, pH 6.8; glicerol 20 % (v/v); SDS 4 % (p/v);  $\beta$ -mercaptoetanol 10 % (v/v) y azul de bromofenol 0.025 % (p/v)], se desnaturalizaron a 95 °C durante 5 min y se separaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida 12.5 % (p/v) no desnaturalizante, a 100 V durante 3 h (1 h tras salir del gel el frente de la electroforesis) en frío. El gel se tiñó para detectar la actividad SOD, según se describe por Beauchamp y Fridovich (1971), con NBT 1 mg/ml durante 20 min en oscuridad. Las diferentes isoformas de la SOD fueron identificadas por inhibición diferencial incubando con KCN 2 mM (Cu/ZnSOD) (Van Camp *et al.*, 1996) o H<sub>2</sub>O, sobre la solución R [K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; riboflavina 28  $\mu$ M y TEMED 28 mM] durante 20 min en oscuridad. La tinción se desarrolló con la exposición a la luz durante 5 min y, una vez alcanzada la tinción adecuada, se paró la reacción con H<sub>2</sub>O destilada.

Estos experimentos se llevaron a cabo en el laboratorio del Dr. Marinus Pilon (*Colorado State University*).

#### **4.4. Análisis semicuantitativo de la plastocianina**

Las muestras utilizadas se prepararon de igual modo que en el apartado anterior, pero el disolvente de muestras utilizado fue 4 x. Las diferentes proteínas en cada muestra fueron separadas por electroforesis, se transfirieron a una membrana y se detectó la plastocianina inmunológicamente, siguiendo el protocolo descrito en los apartados 3.2 y 3.3 de Materiales y Métodos pero en condiciones no desnaturalizantes (sin calentar la muestra y sin SDS en los tampones).

Estos experimentos se llevaron a cabo en el laboratorio del Dr. Marinus Pilon (*Colorado State University*).



## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**



**Respuesta a diferentes niveles de cobre en *Arabidopsis***

## **1. RESPUESTA A DIFERENTES NIVELES DE COBRE EN ARABIDOPSIS**

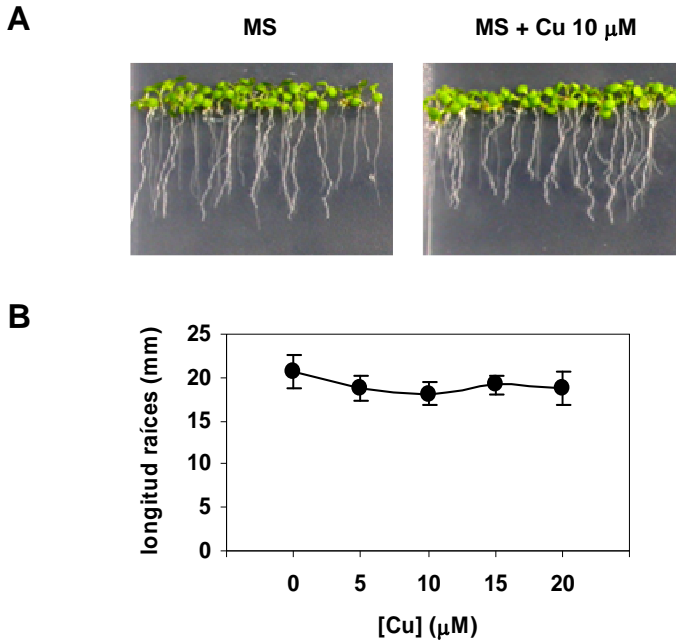
El conocimiento de los mecanismos utilizados por la planta modelo *Arabidopsis* para responder a las variaciones de Cu en el medio de crecimiento, permitirá diseñar estrategias destinadas a aliviar los problemas crecientes relacionados con el Cu en agricultura y salud humana. En este apartado, el objetivo fue la identificación de procesos moleculares diferencialmente expresados según el nivel de Cu en el medio y, por otro lado, la identificación de aquellos componentes de la homeostasis del Cu que responden a las variaciones del metal, para su caracterización y, según el caso, su manipulación con fines biotecnológicos como la fitorremediación. Así mismo, se prestó atención a las rutas de señalización implicadas en estas respuestas al Cu.

### **1.1. ELECCIÓN DE LOS NIVELES DE COBRE DE ESTUDIO**

El estudio de la respuesta frente a variaciones en la concentración de Cu en el medio de crecimiento, requiere la elección de unas condiciones adecuadas para el posterior análisis global de los cambios de expresión génica entre dichas condiciones. Por un lado, la variación en la concentración de Cu a utilizar debe ser suficiente para que la planta pueda detectarla y responder a ella. Por otro lado, la concentración de Cu no debe ser excesiva, de forma que no se altere la fisiología de la planta. La alteración de la expresión génica debe indicar los cambios adaptativos asociados a las variaciones en la concentración del metal dentro de rangos fisiológicos y no los cambios degenerativos, que no permiten respuestas adaptativas.

En este sentido, *Arabidopsis* crece de manera saludable en un rango de concentraciones de Cu entre 0.1-10  $\mu\text{M}$  en el medio de crecimiento. En estas

condiciones, el estrés oxidativo es mínimo, como indica la ausencia de cambios en la expresión de APX1, uno de los indicadores más sensibles de este tipo de estrés (Yamasaki *et al.*, 2007). Sin embargo, una concentración de Cu 10  $\mu\text{M}$  en el medio de crecimiento está próxima al rango tóxico de concentraciones del metal (Shikanai *et al.*, 2003; Abdel-Ghany *et al.*, 2005b). Por lo tanto, nuestro diseño experimental consistió en comparar plántulas crecidas en placa con medio estándar de crecimiento MS (aunque lo denominemos MS realmente nos referimos al medio  $\frac{1}{2}$  MS, que contiene una concentración de Cu 0.2  $\mu\text{M}$ ) frente al mismo medio suplementado con Cu 10  $\mu\text{M}$ .

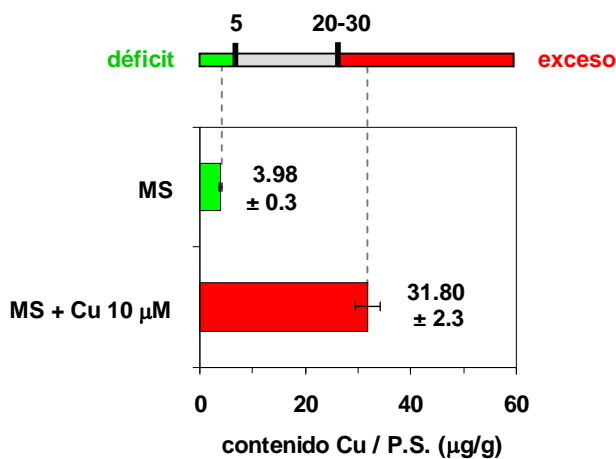


**Figura R.1.1.** Fenotipo de las raíces de plántulas de *Arabidopsis* en medios con diferentes concentraciones de Cu. **(A)** Plántulas crecidas durante 8 días en placa con medio MS o en el mismo suplementado con Cu 10  $\mu\text{M}$ . **(B)** Valores promedio de la longitud de la raíz de 5 plántulas crecidas durante 8 días en placas con medio MS suplementado con Cu 0, 5, 10, 15 o 20  $\mu\text{M}$  y con la correspondiente desviación estándar de tres experimentos independientes.

En estas condiciones, no se observa ningún fenotipo morfológico en las plantas silvestres crecidas durante 8 días en medio MS suplementado con Cu 10  $\mu\text{M}$  respecto al medio MS (Figura R.1.1.A). Un parámetro sensible a la toxicidad del Cu en plantas es la longitud de las raíces (Sancenón *et al.*, 2004; Andrés-Colás *et al.*, 2006) y, como muestra la figura R.1.1, no se observan diferencias en la longitud de este órgano en las condiciones elegidas para realizar el estudio. Dicho parámetro tampoco muestra alteraciones en un rango más amplio de concentraciones de Cu en el medio (0-20  $\mu\text{M}$ ) (Figura R.1.1.B).

Por otro lado, la concentración óptima de Cu endógeno de la planta para su crecimiento oscila entre 5 y 20-30  $\mu\text{g/g}$  de peso seco (P.S.) (Marschner, 2002). Este rango define tres niveles de Cu: deficiencia (< 5  $\mu\text{g/g}$  P.S.), suficiencia (5-20  $\mu\text{g/g}$  P.S.) y exceso (> 20-30  $\mu\text{g/g}$  P.S.). Por ello, se decidió determinar el contenido en Cu de las plántulas crecidas durante 8 días en las condiciones de estudio elegidas, mediante absorción atómica en cámara de grafito. Como muestra la figura R.1.2, el medio estándar suplementado con Cu 10  $\mu\text{M}$  provoca un exceso de metal en la planta ( $\sim 30$   $\mu\text{g/g}$  P.S.) y, curiosamente, el medio estándar MS provoca un déficit de Cu en la misma ( $\sim 4$   $\mu\text{g/g}$  P.S.), aunque, como ya se ha comentado, no se perciben síntomas visibles de dicho exceso ni deficiencia.

A partir de los datos mostrados, se puede decir que los medios MS y MS + Cu 10  $\mu\text{M}$  suponen un déficit y un exceso de Cu, respectivamente, en las plántulas de *Arabidopsis*, pero sin provocar alteraciones visibles por deficiencia o toxicidad del metal.



**Figura R.1.2.** Niveles de Cu endógeno en plántulas de *Arabidopsis* crecidas en medios con diferentes concentraciones de Cu. Cantidad de Cu, medida por espectroscopía de absorción atómica en cámara de grafito, en plántulas crecidas durante 8 días en placas con medio MS o en el mismo medio suplementado con Cu 10 µM. Valores promedio de medidas realizadas por triplicado a partir de dos experimentos independientes con sus respectivas desviaciones estándar. La barra en la parte superior de la figura indica los límites del rango de concentraciones óptimas de Cu, a partir de los que el nivel del metal representa un déficit de Cu para la planta *Arabidopsis* (verde) y un exceso (rojo).

## 1.2. ANÁLISIS DE LA RESPUESTA GÉNICA AL COBRE EN *Arabidopsis thaliana*

Para dilucidar la respuesta en *Arabidopsis* a la variación de Cu en el medio de crecimiento, se han analizado los cambios de expresión génica global en plántulas silvestres crecidas durante 8 días en las diferentes condiciones de Cu elegidas en el apartado anterior. El análisis global de los cambios de expresión génica fue realizado mediante chips o micromatrices de

oligonucleótidos (ver apartado 2.2.4 de Materiales y métodos). Se llevaron a cabo 6 réplicas independientes. Los valores obtenidos muestran el promedio del logaritmo en base 2 de la relación entre la expresión de los genes en ambas condiciones de estudio (exceso de Cu / déficit de Cu). Por lo tanto, un valor positivo indicará una mayor expresión en exceso de Cu (MS + Cu 10  $\mu$ M) y un valor negativo indicará una mayor expresión en déficit de Cu (MS), siempre respecto a la otra condición de estudio.

### **1.2.1. Cambios de expresión de los genes de la homeostasis del cobre**

En primer lugar y para validar los resultados obtenidos mediante las micromatrices, se ha analizado la expresión de genes relacionados con la homeostasis del Cu y cuyo comportamiento respecto al Cu ha sido descrito en la literatura (Tabla R.1.1). En exceso de Cu (Tabla R.1.1, en fondo rojo), se ha detectado una mayor expresión de las superóxido dismutasas de Cu/Zn, CSD1 y CSD2 (Abdel-Ghany *et al.*, 2005b), y de la carabina molecular CCS encargada de proveer a éstas de Cu (Abdel-Ghany *et al.*, 2005a; Chu *et al.*, 2005). En estas condiciones también se encuentran incrementados los niveles de mensajero para la ATPasa tipo P transportadora de Cu HMA5. En deficiencia de Cu (Tabla R.1.1, en fondo verde), se detecta una mayor expresión del transportador COPT2 de la familia COPT de transportadores de Cu de alta afinidad (Sancenón *et al.*, 2003), así como del transportador ZIP2 (Grotz *et al.*, 1998; Wintz *et al.*, 2003). Además, en déficit de Cu se detectó una mayor expresión de la carabina molecular específica de plantas CCH (Himelblau *et al.*, 1998). Cabe destacar, que también se han encontrado elevados niveles de expresión de la FeSOD FSD1 (Abdel-Ghany *et al.*, 2005b). Todos estos resultados fueron corroborados mediante análisis por RT-PCR semicuantitativa (Figura R.1.3), y en el caso de los transportadores de Cu mediante RT-PCR cuantitativa (datos no mostrados).



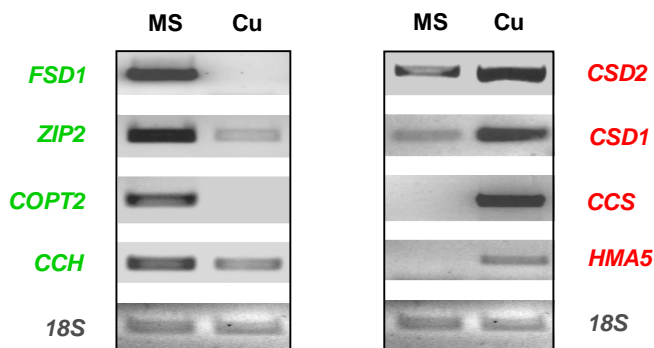
Por otro lado, se muestran los valores de expresión obtenidos para diferentes factores de la homeostasis del Cu conocidos en *Arabidopsis*, en los que no se detectó una tendencia clara en respuesta al Cu (Tabla R.1.1, en fondo blanco).

**Tabla R.1.1.** Respuesta génica de componentes de la homeostasis del Cu a diferentes niveles de Cu en *Arabidopsis*. En fondo rojo se muestran los componentes que se expresan principalmente en exceso de Cu (MS + Cu 10  $\mu$ M, valores positivos), en verde aquellos que se expresan principalmente en déficit de Cu (MS, valores negativos) y en blanco aquellos en los que no se detecta una tendencia clara.

log <sub>2</sub>	código	gen	anotación
2.842	At2g28190	CSD2	superóxido dismutasa de Cu/Zn
2.166	At1g12520	CCS	chaperona de Cu para SOD
2.129	At1g08830	CSD1	superóxido dismutasa de Cu/Zn
0.742	At1g63440	HMA5	ATPasa transportadoras de Cu

log <sub>2</sub>	código	gen	anotación
-3.415	At4g25100	FSD1	superóxido dismutasa de Fe
-2.718	At5g59520	ZIP2	transportador Zn
-2.360	At3g46900	COPT2	transportador Cu alta afinidad
-1.665	At3g56240	CCH	chaperona de Cu
-0.830	At2g26975	COPT6	transportador Cu alta afinidad

log <sub>2</sub>	código	gen	anotación
0.208	At1g10970	ZIP4	transportador cationes divalentes
-0.234	At5g59030	COPT1	transportador Cu alta afinidad
sin datos	At5g59040	COPT3	transportador Cu alta afinidad
-0.016	At2g37920	COPT4	transportador Cu alta afinidad?
-0.078	At5g20650	COPT5	transportador Cu alta afinidad
sin datos	At4g37270	HMA1	ATPasa transportadora de Cu
-0.137	At4g33520	HMA6/PAA1	ATPasa transportadora de Cu
-0.065	At5g44790	HMA7/RAN1	ATPasa transportadora de Cu
0.273	At5g21930	HMA8/PAA2	ATPasa transportadora de Cu
-0.134	At1g66240	ATX1	carabina molecular de Cu
0.194	At3g15352	COX17-1	carabina molecular de Cu para cit c oxidasa
-0.251	At1g53030	COX17-2	carabina molecular de Cu para cit c oxidasa
-0.049	At5g18100	CSD3	superóxido dismutasa de Cu/Zn
-0.060	At1g07600	MT1a	metalotioneína
-0.933	At1g07610	MT1c	metalotioneína
sin datos	At3g09390	MT2a	metalotioneína
-0.079	At5g02380	MT2b	metalotioneína
sin datos	At3g15353	MT3	metalotioneína



**Figura R.1.3.** Niveles de expresión génica de componentes de la homeostasis del Cu en las diferentes concentraciones de Cu. Productos de RT-PCR a partir de RNA total de plántulas de 8 días crecidas en déficit de Cu (MS) o en exceso del metal (MS + Cu 10  $\mu$ M). Los niveles de rRNA del gen *18S* se muestran como control de carga.

En general, se puede decir que la respuesta detectada respecto a componentes relacionados con la homeostasis del Cu coincide con la información de la que se dispone en la literatura sobre las respuestas a la concentración de Cu en *Arabidopsis*, apoyando la validez de los datos obtenidos en este análisis por micromatrices.

### 1.2.2. Procesos moleculares diferencialmente expresados

Con el objetivo de identificar procesos regulados en respuesta a los diferentes niveles de Cu, se clasificaron por categorías funcionales los genes que se expresan diferencialmente en las condiciones de estudio (valor  $p < 0.05$ ), a partir del análisis obtenido con el programa *FatiScan* (ver apartado 2.2.4. de Materiales y métodos). Se consideraron exclusivamente aquellos genes que se expresan aproximadamente el doble en una condición respecto a la otra ( $|\log_2| \sim 1$ ). Los resultados de este estudio señalan que la respuesta de *Arabidopsis* al Cu incluye procesos como los que se describen a continuación.

1.2.2.1. *Procesos diferencialmente activados en exceso de cobre*

Respuesta al estrés hídrico y salino

En el medio de crecimiento suplementado con una concentración de Cu 10  $\mu$ M se detecta una mayor expresión de componentes de las respuestas a estrés hídrico y salino, tanto dependientes como independientes de la fitohormona ABA (del inglés *abscisic acid*) (Tabla R.1.2). Existen elementos ABRE (del inglés *ABA-responsive elements*) involucrados en la expresión de los genes de respuesta a estrés inducidos por ABA (Yamaguchi-Shinozaki y Shinozaki, 1994 y 2005). Las proteínas AREB/ABF (del inglés *ABA-responsive element binding protein/ABRE binding factor*) son factores de transcripción que se unen a los elementos ABRE, activando la expresión génica (Choi *et al.*, 2000; Uno *et al.*, 2000). Estos factores requieren una activación mediada por ABA, que probablemente incluye una fosforilación. La familia de quinasas SnRK2 funciona en la ruta de transducción de señal por ABA (Yoshida *et al.*, 2002). Por otro lado, los elementos DRE/CRT (del inglés *dehydration-responsive element/C-Repeat*) están involucrados en la expresión de genes de respuesta a estrés hídrico no inducidos por ABA (Yamaguchi-Shinozaki y Shinozaki, 1994 y 2005). La subfamilia DREB (del inglés *DRE binding protein*) de los factores de transcripción AP2 se unen a estos elementos DRE/CRT induciendo la expresión (Gutterson y Reuber, 2004; Yamaguchi-Shinozaki y Shinozaki, 2005). Precisamente, en nuestras condiciones de exceso de Cu, se observa una mayor expresión del factor ABF1, así como de un factor de transcripción de la subfamilia DREB y la quinasa SnRK2.

En general, estas rutas inducen la expresión de genes relacionados con el estrés hídrico y salino como las familias LEA (del inglés *late-embryogenesis abundant*), ERD (del inglés *early response to dehydration*) y COR (del inglés *cold regulated*) (revisado en Shinozaki y Yamaguchi-Shinozaki, 2007), generando respuestas como el cierre de los estomas, la inhibición del

crecimiento celular y la fotosíntesis, y la activación de la respiración. Varios genes de estas familias como COR47, M10 (LEA) y otras proteínas asociadas a dormición de semillas como DRM1, muestran en nuestro chip una mayor expresión en exceso de Cu respecto al déficit del metal.

Por otro lado, las proteínas de choque térmico alivian el daño celular durante la deshidratación y las proteasas participan en la tolerancia a estrés abiótico. En nuestras condiciones de exceso de Cu, también se encuentran diferencialmente inducidas proteínas de ambos tipos.

**Tabla R.1.2.** Respuesta génica de los posibles mecanismos contra el estrés hídrico y salino a un exceso de Cu en *Arabidopsis*.

log <sub>2</sub>	código	gen	anotación
1.853	At1g56300		proteína de choque térmico
1.531	At2g41280	M10	proteína LEA
1.502	At1g49720	ABF1	factor transcripción AREB/ABF
1.369	At2g33830		similar a proteína DRM1 asociada a dormición
1.354	At5g03720	HSFA3	factor transcripcional de choque térmico
1.203	At1g28330	DRM1	proteína asociada a dormición
1.169	At5g52640	HSP81-1	proteína de choque térmico
1.158	At5g63650	SnRK2.5	quinasa de proteínas relacionada con SNF1
1.121	At4g06746		factor transcripción subfamilia DREB A5 de familia AP2
1.068	At4g16563		proteína de la familia de aspartil proteasas
1.048	At1g65240		proteína de la familia de aspartil proteasas
0.985	At3g62550	USP	proteína de estrés universal
0.912	At1g20440	COR47	familia dehidrasas

### Reparación y modificación del DNA

Otro de los efectos del exceso de Cu es la producción de daños en macromoléculas como el DNA, a través de la reacción de Haber-Weiss (Halliwell y Gutteridge, 1989). En nuestro experimento se detectó una mayor expresión de diversas enzimas involucradas en la reparación del DNA en exceso de Cu respecto al déficit del metal (Tabla R.1.3). Las helicasas son un ejemplo

de estas enzimas, que participan en diferentes rutas de recombinación, así como la endonucleasa MUS81 involucrada en las rutas de recombinación homóloga (Hartung y Puchta, 2006). También se detectó en estas condiciones la topoisomerasa SPO11-1, que introduce DSBs (del inglés *DNA double-strand break*) (revisado en Bleuyard *et al.*, 2006). Hay estudios que muestran que estos DSBs son el primer paso para la recombinación, como mecanismo de reparación de otras lesiones en el DNA. Los DSBs también pueden originarse por agentes dañinos, como podrían ser el Cu y los radicales hidroxilo. Sin embargo, parece ser que en el caso de la proteína SPO11-1, estos DSBs constituyen un paso intermediario en la meiosis, causando el silenciamiento génico por fragmentación del material genético durante la profase meiótica (revisado en Bleuyard *et al.*, 2006). La ruta NHEJ (del inglés *non-homologous end-joining*) es la encargada de reparar los DSBs mediante recombinación no homóloga. Este paso requiere DNA-PKs que pertenecen a la familia de quinasas PI3. En este sentido, las modificaciones del DNA podrían también obedecer a cambios adaptativos a largo plazo e incluir cambios epigenéticos en el DNA que permitan la supervivencia, tanto del individuo como de la progenie, frente a las condiciones adversas del medio.

En cuanto a la modificación de histonas en plantas, la fosforilación de la histona H3 parece ser crucial para activar la reparación del DNA y la transcripción, así como para la cohesión y segregación de cromosomas dependiente de ciclo celular. En *Arabidopsis*, AUR1 (aurora 1) y AUR3 (aurora 3) son las quinasas responsables de la fosforilación de H3S10 (revisado en Fuchs *et al.*, 2006). En nuestras condiciones experimentales, se observó la activación de la transcripción de AUR3 (Tabla R.1.3). Por otra parte, la acetilación de histonas en lisinas específicas produce descondensación de la estructura nucleosomal facilitando la reparación del DNA y la recombinación, así como la transcripción (revisado en Fuchs *et al.*, 2006). En cuanto a su relación con el Cu, se ha descrito que el tratamiento con elevadas

concentraciones de  $\text{Cu}^{2+}$  (50-100  $\mu\text{M}$ ) induce un descenso significativo de los niveles de acetilación de histonas, mediante inhibición de la acetilación y no por activación de la desacetilación (Kang *et al.*, 2004; Lin *et al.*, 2005). Sin embargo, en nuestras condiciones experimentales se observó el aumento de expresión de la histona desacetilasa HDA18 en medio suplementado con Cu 10  $\mu\text{M}$  (Tabla R.1.3).

**Tabla R.1.3.** Respuesta génica de los posibles mecanismos de reparación y modificación del DNA a un exceso de Cu en *Arabidopsis*.

log <sub>2</sub>	código	gen	anotación
2.002	At5g61070	HDA18	histona desacetilasa
1.657	At2g45490	AUR3	histona serín quinasa (específica de H3-S10)
1.387	At1g66040	VIM4	variante en metilación
1.334	At3g13170	SPO11-1	DNA topoisomerasa
1.220	At5g07810		helicasa
1.216	At4g30870	MUS81	endonucleasa
1.216	At5g18810	SCL28	factor de procesamiento de intrones tipo SC35
1.149	At5g39550	VIM3	metilación de DNA en citosinas
1.130	At1g35530		helicasa
1.108	At5g22140		familia de piridín nucleótido-disulfato oxidoreductasas
1.072	At4g11080		familia del grupo de alta movilidad HMG1/2
1.053	At3g01410		nucleasa

### División celular

En estas condiciones de exceso de Cu, también se detectó una mayor expresión de varias quinesinas, proteínas asociadas a microtúbulos mediante un dominio motor (Tabla R.1.4). Durante la división celular, los microtúbulos se organizan en estructuras dinámicas que conducen a las diferentes etapas de la mitosis. Los microtúbulos también guían las vesículas derivadas del aparato de Golgi hacia la línea media de la célula madre donde se fusionan para formar el tabique celular. Algunas de las quinesinas permiten el movimiento a lo largo de los microtúbulos usando ATP y/o controlan su polimerización. También

podrían estar implicadas en la orientación y polarización de los microtúbulos. La quinesina 13A de *Arabidopsis* se localiza en el aparato de Golgi y contribuye a su distribución en los tricomas (revisado en Vanstraelen *et al.*, 2006). En este sentido, la expresión de quinesinas en exceso de Cu también podría indicar su participación en la distribución del aparato de Golgi en los tricomas para favorecer la destoxicación del metal. Por otro lado, se ha observado que quinasas de tipo CDK (del inglés *cyclin-dependent kinases*) regulan el progreso a través del ciclo celular mediante fosforilación reversible y que esta fosforilación es la que regula la unión de las quinesinas a los microtúbulos. Además, los factores de transcripción E2F son un componente importante en la regulación del progreso a través del ciclo celular mediada por ciclinas. En nuestras condiciones de exceso de Cu, se han detectado niveles incrementados de algunos factores de transcripción E2F como DEL3/E2L2 y DEL2/E2L1 (Tabla R.1.4).

**Tabla R.1.4.** Respuesta génica de los posibles mecanismos de división celular a un exceso de Cu en *Arabidopsis*.

log <sub>2</sub>	código	gen	anotación
1.899	At1g49910		proteína de control mitótico (repeticiones WD-40)
1.533	At5g33300		proteína relacionada con quinesina asociada a cromosoma
1.530	At5g11300	CYC3B	ciclina tipo mitótica
1.512	At1g61450		proteína similar a miosina II
1.459	At3g01330	DEL3 /E2L2	factor de transcripción E2F que regula ciclo celular
1.420	At5g02370		proteína relacionada con proteína del motor quinesina
1.365	At5g05510		proteína relacionada con quinesina similar a proteína control del huso
1.314	At5g23910		similar a quinesina
1.301	At1g20060		proteína relacionada con proteína del motor quinesina
1.274	At2g36200		proteína relacionada con proteína del motor quinesina
1.261	At5g27000	ATK4	ATPasa tipo quinesina
1.220	At1g69400		proteína de control mitótico (repeticiones WD-40)
1.217	At5g14960	DEL2 /E2L1	factor de transcripción E2F que regula ciclo celular
1.144	At3g17360	POK1	quinesina de orientación del fragmoplasto
1.142	At5g11150	VAMP713	familia de proteínas v-SNARE
1.023	At3g16320		familia ciclo división celular
1.004	At2g22610		proteína relacionada con proteína del motor quinesina
0.951	At3g63480		posible quinesina de cadenas pesadas
0.944	At3g19050	POK2	quinesina de orientación del fragmoplasto

### Señalización

Los mecanismos de señalización que se encontraron incrementados en exceso de Cu respecto al déficit del metal, incluyen proteínas con motivos “*EF hand*” de unión a calcio, MAPKs y diversos factores de transcripción (Myb, dedos de Zn, bZIP o factores B3) (Tabla R.1.5).

En respuesta a estrés salino, hídrico y por frío, los niveles de calcio se incrementan de manera transitoria mediante incorporación a partir del espacio apoplástico o liberación de las reservas intracelulares. Este calcio, en forma de ión  $Ca^{2+}$ , es captado por CDPKs (del inglés *Ca^{2+}*-dependent protein kinases), que activan cascadas específicas de fosforilación (revisado en Xiong *et al.*, 2002). Las CDPKs son serina/treonina protein quinasas que poseen hasta 4 motivos “*EF hand*”, los cuales pueden unir directamente el  $Ca^{2+}$ . Estas CDPKs activan genes DRE/CRT de respuesta a estrés

Por otro lado, Jonak y colaboradores (2004) describieron que un exceso de Cu activa específicamente varias rutas MAPK y que esta activación podría estar mediada por los ROS generados en exceso del metal. También se ha postulado que las MAPKs podrían estar implicadas en respuesta al estrés salino, hídrico y por frío, así como relacionadas con el ciclo celular (revisado en Xiong *et al.*, 2002). En concreto, la MAPK NPK1 de *Arabidopsis* activa la expresión de los genes de respuesta a estrés oxidativo, incrementando la tolerancia al mismo.

Además, en exceso de Cu, se han detectado niveles incrementados de factores de transcripción AP2 (apetala 2). En hongos, también se ha descrito esta inducción de factores AP2 por Cu (Cho *et al.*, 2007).



**Tabla R.1.5.** Respuesta génica de las rutas de señalización a un exceso de Cu en *Arabidopsis*.

log <sub>2</sub>	código	gen	anotación
3.061	At3g59450		proteína unión calcio con motivos "EF hand"
2.035	At4g11230		NADPH oxidasa
1.513	At3g06030	ANP3/MAPKKK12	quinasa 3 relacionada con NPK1
1.336	At1g54960	ANP2/MAPKKK2	quinasa 2 relacionada con NPK1
1.289	At2g24680		factor transcripción familia B3
1.284	At1g66050		proteína dedos Zn (dedo RING tipo C3HC4)
1.202	At5g56580	NQK1/MAPKK6	MAP quinasa quinasa
1.121	At4g06746	RAP2.9	factor transcripción con dominio AP2
1.113	At1g43160	RAP2.6	factor transcripción con dominio AP2
1.039	At1g76410	ATL8	proteína dedos Zn (dedo RING tipo C3HC4)
1.037	At4g39070		proteína dedos Zn (tipo caja-B)
1.015	At1g53490		proteína bZIP (basic region/leucine zipper)
0.986	At2g35310		factor transcripción familia B3
0.984	At5g11510	MYB3R-4	factor de transcripción tipo C-Myb

### 1.2.2.2. Procesos diferencialmente activados en déficit de cobre

#### Respuesta al estrés por patógenos

En lo que respecta al déficit de Cu, se han detectado niveles de expresión incrementados para genes relacionados con la respuesta a estrés por patógenos, como las nodulinas (Tabla R.1.6). La familia NIP (del inglés *nodulin 26-like intrinsic protein*) pertenece a un amplio grupo de proteínas integrales de membrana, único en plantas, que median el flujo bidireccional de solutos no cargados eléctricamente (agua, amonio, glicerol, especies reactivas del oxígeno, gases, sustratos metabólicos...) a través de las membranas celulares. Las nodulinas se acumulan durante el estado de endocitosis/infección del desarrollo de nódulos (simbiosis bacteriana) para mantener el balance osmótico, ya que es una época de elevada actividad metabólica. En condiciones de estrés osmótico severo, las nodulinas participan en la adaptación de las células infectadas a este estrés (revisado en Wallace *et al.*, 2006).

**Tabla R.1.6.** Respuesta génica de los posibles mecanismos contra el estrés por patógenos a un déficit de Cu en *Arabidopsis*.

log <sub>2</sub>	código	gen	anotación
-1.415	At3g54830		transportador de aminoacid-poliamina
-1.378	At2g37460		familia nodulinas MtN21
-1.293	At5g58390		posible peroxidasa
-1.286	At1g66100		posible tionina
-1.058	At5g66900		proteína resistencia a enfermedad (clase CC-NBS-LRR)
-1.039	At1g01070		familia nodulinas MtN21
-1.036	At3g28070		familia nodulinas MtN21
-1.034	At1g64500		familia glutaredoxinas
-1.031	At3g47430	PEX11B	familia génica peroxina11
-1.005	At3g18710		complejo ubiquitin ligasa
-0.993	At4g18220		transportador de purinas
-0.974	At4g37150		hidrolasa
-0.964	At5g13170		familia nodulinas MtN3
-0.959	At3g28130		familia nodulinas MtN21
-0.923	At3g28080		familia nodulinas MtN21
-0.903	At1g70580	GGT2	glutamato-glioxilato transaminasa
-0.900	At3g04210		proteína resistencia a enfermedad (clase TIR-NBS)
-0.873	At1g21140		posible nodulina

### Expansión celular

Otro proceso afectado en déficit de Cu es la expansión celular. Hormonas como auxinas y giberelinas controlan la elongación celular, aunque se desconocen los mecanismos responsables de dicho control (revisado en Foster *et al.*, 2003). En nuestro experimento, se encontraron incrementadas en déficit de Cu respecto a un exceso del metal diferentes proteínas de respuesta a auxinas (Tabla R.1.7).

Por otro lado, la ampliación del volumen celular es debida a la incorporación de agua en la vacuola y la relajación y extensión irreversible de la pared celular (revisado en Cosgrove, 2005). En nuestras condiciones de déficit de Cu se encontró una mayor expresión, respecto al exceso del metal, de ciertos componentes responsables de estos procesos (Tabla R.1.7). La superfamilia CSL (del inglés *cellulose synthase-like*) contiene motivos característicos de

glicosiltransferasas y se consideran las sintasas de la matriz de polisacáridos, como la hemicelulosa (glicanos), que se encuentran localizadas en el aparato de Golgi. Estos polisacáridos se empaquetan en vesículas, que se fusionan con la membrana plasmática, donde se entrecruzan mediante glicosiltransferasas. Por otro lado, las expansinas relajan la pared celular a pH ácido, rompiendo los puentes de hidrógeno entre los polisacáridos de la pared, dejando con ello los glucanos accesibles al ataque enzimático y facilitando así la expansión celular (revisado en Cosgrove, 2005).

Estos datos indican que los niveles de Cu alteran los procesos de crecimiento celular y, consecuentemente, pueden influir sobre la morfología de la planta.

**Tabla R.1.7.** Respuesta génica de los posibles mecanismos de expansión celular a un déficit de Cu en *Arabidopsis*.

log <sub>2</sub>	código	gen	anotación
-1.411	At4g12545		familia proteínas transferencia de lípidos (LTP)
-1.230	At3g46700		UDP-glucuronosil/UDP-glucosil transferasa
-1.183	At1g29460		proteína de respuesta a auxinas
-1.164	At2g40610	EXPA8	familia génica alfa-expansina
-1.135	At4g19170	NCED4	9-cis-epoxicarotenoide dioxigenasa
-1.117	At1g32900	GBS1	almidón sintasa unida a gránulo
-1.100	At1g29430		familia proteínas de respuesta a auxinas
-1.088	At4g28250	EXPB3	posible beta-expansina
-1.087	At1g29440		familia proteínas de respuesta a auxinas
-1.064	At2g15390	FUT4	galactósido 2-alfa-L-fucosiltransferasa
-1.040	At5g37690		lipasa con motivo GDSSL, familia hidrolasas
-1.026	At4g33550	LTP	familia proteínas transferencia de lípidos (LTP)
-1.021	At2g37640	EXPA3	familia génica alfa-expansina
-1.019	At5g66690	UGT72E2	UDP-glucuronosil/UDP-glucosil transferasa
-1.004	At1g45201		triacilglicerol lipasa
-1.000	At5g13930	CHS	naringenin-chalcon sintasa, regulación transporte auxinas
-0.986	At5g27780		familia proteínas de respuesta a auxinas
-0.983	At3g22600		familia proteínas transferencia de lípidos (LTP)
-0.976	At5g18020		proteína de respuesta a auxinas
-0.944	At5g18030		proteína de respuesta a auxinas
-0.932	At5g27350	SFP1	familia portadores azúcar
-0.915	At1g60590		posible poligalacturonasa
-0.890	At1g10640		posible poligalacturonasa
-0.888	At2g32540	CSLB4	proteína similar a celulosa sintasa

### Metabolismo del azufre

Varios componentes del metabolismo del azufre presentan una expresión incrementada en deficiencia de Cu. Entre los compuestos azufrados, se encontró el glutatión, las fitoquelatinas y los glucosinolatos (GSL).

Las plantas superiores asimilan azufre en forma de sulfato ( $\text{SO}_4^{2-}$ ) para la síntesis de una gran variedad de metabolitos como cisteína, metionina, sulfolípidos, glucósidos sulfurados y coenzimas (Rausch y Wachter, 2005). Se ha descrito que la expresión y actividad de la primera enzima de la ruta de asimilación de sulfato, la ATP sulfurilasa, se encuentra incrementada en deficiencia de sulfuro en plantas o cuando la necesidad de cisteína para la síntesis de glutatión es elevada (Vauclare *et al.*, 2002).

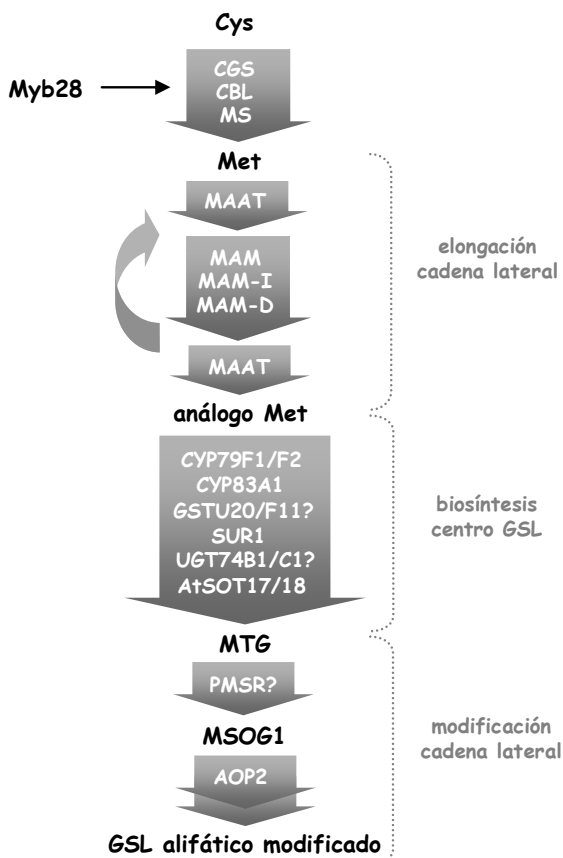
Una de las rutas que más claramente está afectada en deficiencia de Cu es la ruta de biosíntesis de glucosinolatos alifáticos derivados de la metionina (Tabla R.1.8; Figura R.1.4). El regulador positivo de esta ruta es el factor de transcripción Myb28 (PMG1, del inglés *production of methionine-derived glucosinolate 1*) necesario y suficiente para la producción de glucosinolatos a nivel basal en *Arabidopsis* (Hirai *et al.*, 2007). La expresión de este factor de transcripción también se incrementa en déficit de Cu respecto al exceso del metal (Tabla R.1.8). Los glucosinolatos son derivados de aminoácidos específicos como metionina, triptófano y fenilalanina (Hirai *et al.*, 2007). Normalmente, los glucosinolatos están secuestrados en la vacuola y su hidrólisis genera productos bioactivos en la defensa contra patógenos y en la homeostasis de auxinas. Por otro lado, estos productos son de gran interés, dado su efecto de protección frente al cáncer en humanos, en el caso de los isotiocianatos derivados de la metionina (revisado en Grubb y Abel, 2006). En la respuesta a patógenos, la expresión de los genes responsables de la producción de glucosinolatos está mediada por jasmonato, ácido salicílico y etileno. Cabe destacar que estos derivados de la metionina activan un conjunto de genes que

codifican enzimas de detoxificación como la glutatión-S-transferasa. También se ha observado una producción de glucosinolatos no defensiva durante la germinación de semillas y el desarrollo temprano de la planta (revisado en Grubb y Abel, 2006). Además, permiten el almacenamiento no tóxico de sulfuro en la planta, por lo que se ha descrito que un déficit de sulfato provoca una represión de la mayoría de genes en la ruta de los glucosinolatos para aprovechar el sulfuro disponible en la producción de metabolitos primarios sulfurados como la cisteína, metionina y glutatión (Hirai *et al.*, 2005).

Estos datos sugieren que el Cu podría participar en la regulación del metabolismo del azufre en respuesta a los niveles de Cu, quizá para reforzar la respuesta a patógenos o la señalización por auxinas, procesos que ya se han descrito como incrementados en estas condiciones.

**Tabla R.1.8.** Respuesta génica del metabolismo del azufre a un déficit de Cu en *Arabidopsis*.

log <sub>2</sub>	código	gen	anotación
-1.763	At5g38020		metiltransferasa dependiente de S-adenosilmetionina
-1.744	At5g37990		metiltransferasa dependiente de S-adenosilmetionina
-1.157	At3g03190	GSTF11	glutatión-S-transferasa (clase phi)
-1.107	At1g16410	CYP79F1	citocromo P450
-1.059	At4g13770	CYP83A1	citocromo P450
-1.059	At3g23810	SAHH2	S-adenosil-L-homocisteína hidrolasa
-1.015	At2g31790	UGT74C1	UDP-glucuronosil/UDP-glucosil transferasa
-1.003	At5g23010	MAM1	metiltioalquilmalato sintasa
-0.954	At1g16400	CYP79F2	citocromo P450
-0.873	At3g09270		glutatión-S-transferasa
-0.638	At1g18590	SOT17	familia sulfottransferasas
-0.602	At1g78370	GSTU20	glutatión-S-transferasa (clase tau)
-0.524	At5g61420	MYB28	factor transcripcional Myb



**Figura R.1.4.** Modelo de la ruta de biosíntesis de glucosinolatos alifáticos modificados a partir de metionina en *Arabidopsis*. Las flechas gruesas de color gris representan la ruta metabólica. La flecha fina de color negro representa regulación de la ruta. AOP, dioxigenasa dependiente de 2-oxoglutarato (alquenil hidroxipropil glucosinato); CBL, cistationina  $\beta$ -liasa; CGS, cistationina  $\gamma$ -sintasa; CYP, citocromo P450; GSL, glucosinato; GST, glutatión-S-transferasa; MAAT, del inglés *methionine-analog aminotransferase*; MAM, metiltioalquilmalato sintasa; MAM-D, metiltioalquilmalato deshidrogenasa; MAM-I, metiltioalquilmalato isomerasa; MS, metionina sintasa; MSOG, metilsulfinilalquil glucosinato; MTG, metiltioalquil glucosinato; PMSR, péptido metionina sulfóxido reductasa; SOT, sulfotransferasa; SUR1, del inglés *superroot 1 C-S lyase*; UGT, UDP-glucosiltransferasa.

### Metabolismo del Fe

En déficit de Cu, también se detecta un incremento en la expresión de diversos componentes de la homeostasis del Fe (Tabla R.1.9). Estos componentes son miembros de la familia NAS, transportadores YSL y la FeSOD FSD1. Como se ha descrito en el apartado 2.1.3.2 de Introducción, las NAS sintetizan el quelante NA que compleja mayoritariamente  $\text{Fe}^{2+}$  en el floema (Von Wirén *et al.*, 1999). Se ha propuesto que los transportadores YSL participan en el transporte de estos complejos NA- $\text{Fe}^{2+}$  en la planta (Le Jean *et al.*, 2005; Waters *et al.*, 2006). También destaca el elevado número de citocromos P450 cuya expresión se encuentra aumentada en déficit de Cu.

Este resultado sugiere que la distribución de Fe en la planta está incrementada en condiciones deficitarias de Cu. Una de las causas que podrían explicar este aumento, sería la sustitución de un metal por otro en las funciones celulares de la planta, tal y como se describe más adelante.

**Tabla R.1.9.** Respuesta génica del metabolismo del Fe a un déficit de Cu en *Arabidopsis*.

log <sub>2</sub>	código	gen	anotación
-3.415	At4g25100	FSD1	superóxido dismutasa de Fe
-2.547	At5g24380	YSL2	transportador de oligopéptidos (tipo <i>yellow stripe</i> )
-1.377	At3g44970	CYP85	citocromo P450
-1.340	At3g26830	CYP71B15	enzima citocromo P450
-1.148	At4g15393	CYP702A5	citocromo P450
-1.141	At2g30750	CYP71A12	posible citocromo P450
-1.126	At5g53550	YSL3	transportador de oligopéptidos (tipo <i>yellow stripe</i> )
-1.111	At5g25120	CYP71B11	posible citocromo P450
-1.108	At5g04950	NAS1	nicotianamina sintasa
-1.106	At5g56080	NAS2	nicotianamina sintasa
-1.082	At3g26320	CYP71B36	posible citocromo P450
-0.995	At3g48310	CYP71A22	posible citocromo P450
-0.982	At3g46490		oxidoreductasa, familia de oxigenasas 2OG-Fe(II)
-0.952	At4g37310	CYP81H1	posible citocromo P450
-0.949	At3g5328	CYP71B5	citocromo P450 monooxigenasa
-0.931	At1g13080		citocromo P450
-0.924	At1g56430	NAS4	nicotianamina sintasa
-0.923	At1g09240	NAS3	nicotianamina sintasa
-0.913	At3g58990		proteína con dominio C-t de aconitasa

### Señalización

En cuanto a los mecanismos de señalización en deficiencia de Cu en estas condiciones, se encontraron incrementados los niveles de expresión de diversos factores de transcripción, incluyendo proteínas Myb, proteínas con dedos de Zn y proteínas con repeticiones de anquirina (Tabla R.1.10). Las SPLs son, precisamente, proteínas con repeticiones de anquirina y dominios SBP. Como se ha descrito en Introducción, estos motivos están presentes en el factor CRR1 de *C. reinhardtii*, donde participan en la activación de la expresión génica a nivel transcripcional en déficit de Cu, mediante su unión específica a los elementos CuRE de las regiones promotoras (revisado en Merchant *et al.*, 2006).

Otro tipo de proteínas activadas en deficiencia de Cu son los factores de transcripción de la familia AP2. Esta familia de proteínas está presente sólo en plantas e incluye genes implicados en rutas de resistencia a enfermedades (Guttererson y Reuber, 2004). Estos factores AP2 están regulados por hormonas de plantas, como el ácido jasmónico, salicílico y etileno, así como por patógenos, herida y estrés abiótico.

Además, se detectaron quinasas, como las serina/treonina quinasas, involucradas en la transducción de señales en las que participa el calcio como mensajero secundario (revisado en Xiong *et al.*, 2002).



**Tabla R.1.10.** Respuesta génica de las rutas de señalización a un déficit de Cu en *Arabidopsis*.

log <sub>2</sub>	código	gen	anotación
-1.564	At5g51380		familia caja-F
-1.511	At1g68740		familia EXS (ERD1/XPR1/SYG1)
-1.449	At3g02020		aspartato quinasa monofuncional
-1.444	At3g56230		relacionada con proteína POZ tipo <i>speckle</i>
-1.408	At5g10230	ANN7	anexina de unión a calcio
-1.377	At3g09600	LCL5	factores de transcripción familia Myb
-1.375	At5g54720		familia proteínas con repeticiones de anquirina
-1.326	At2g20880	RAP2.4	factor transcripción con dominio AP2
-1.237	At4g30020	SLP3	familia subtilasas
-1.135	At4g23290		familia protein quinastas
-1.117	At3g02380	COL2	proteína dedo Zn tipo CONSTANS (CO) temporizador de floración
-1.078	At4g00970		familia protein quinastas
-1.071	At2g46680	HB7	posible factor transcripción con motivo homeo-leucina ZIP
-1.037	At5g39860	PRE1	factor transcripción resistencia a paclobutrazol
-1.037	At1g54820		familia protein quinastas
-1.025	At3g02750		protein fosfatasa (tipo 2C)
-1.014	At1g51830		serina/treonina quinasa
-0.952	At1g35560		posible factor transcripción familia TCP posible proteína unión DNA
-0.940	At2g31380	STH	proteína dedo Zn (tipo caja-B)
-0.921	At5g51370		familia caja-F
-0.905	At4g04570		familia protein quinastas

Dentro de los mecanismos de señalización se podrían incluir los miRNAs. En nuestras condiciones experimentales, se pudo apreciar un incremento en la expresión de diferentes miRNAs en respuesta a un déficit de Cu respecto a un exceso del metal (Tabla R.1.11). Cabe destacar que el miRNA detectado con un mayor nivel de expresión en esta respuesta al déficit de Cu es miR398, descrito en la regulación negativa de las Cu/ZnSODs CSD1 y CSD2 en condiciones de estrés oxidativo y deficiencia de Cu (Sunkar *et al.*, 2006; Yamasaki *et al.*, 2007). Este mecanismo de regulación, explicado en el apartado 3.1 de Introducción (Figura R.I.6), coincide con los datos obtenidos en este análisis sobre la expresión de CSD1/2 en exceso y déficit de Cu ( $\log_2$  (miR398b) = -4.399;  $\log_2$  (CSD1) = 2.129;  $\log_2$  (CSD2) = 2.842). Este hecho corrobora de

nuevo la validez de nuestro estudio sobre la respuesta de *Arabidopsis* a diferentes condiciones de Cu.

Por otro lado, resulta de gran interés la expresión incrementada de miR156h/f en deficiencia de Cu, descrito en la regulación de factores de transcripción tipo SPL (Jones-Rhoades y Bartel, 2004; Gandikota *et al.*, 2007) (ver apartado 3.1 de Introducción). En nuestro experimento, se detecta una expresión incrementada de la SPL3 en exceso de Cu ( $\log_2 \sim 0.7$ ), lo que podría justificarse con los niveles más altos de expresión de este miR156 en déficit de Cu, y que apoyaría nuevamente la validez de este estudio. Las SPLs reguladas por miRNAs son exclusivamente las formas cortas (Cardon *et al.*, 1999; Jones-Rhoades y Bartel, 2004). Dado que las formas largas de las SPLs (SPL1/12/7) son las únicas que conservan todos los dominios del regulador transcripcional por deficiencia de Cu CRR1 de *Chlamydomonas*, cabría esperar que estas formas largas fueran funcionales en deficiencia de Cu. Aunque no se observa regulación transcripcional de las mismas, la expresión incrementada del miR156 y su posible papel en la represión sobre las formas cortas de las SPLs, sugiere la posibilidad de que al quedar inhibidas las formas cortas, adquieran preponderancia las largas en condiciones de déficit de Cu.

Además, llama la atención el elevado número de factores de transcripción regulados por miRNAs en deficiencia de Cu. La regulación por miRNAs en condiciones de estrés nutricional es una respuesta adaptativa ampliamente utilizada en plantas. La conservación de los miRNAs y sus dianas entre diversas especies de plantas revela la importancia evolutiva de estas respuestas al estrés por nutrientes (revisado en Chiou, 2007; Sunkar *et al.*, 2007).

**Tabla R.1.11.** Respuesta génica de los miRNAs a un déficit de Cu en *Arabidopsis*.

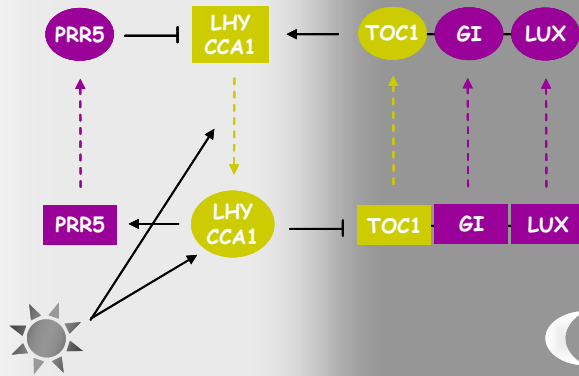
log <sub>2</sub>	código	gen	genes diana
-4.399	At5g14545	miR398b	Cu/ZnSOD CSD1 y CSD2
-2.673	At5g14565	miR398c	Cu/ZnSOD CSD1 y CSD2
-2.565	At3g26819	miR169n	factor transcripción HAP2
-2.519	At5g45307	miR168b	argonaute AGO1
-2.397	At3g26813	miR169j	factor transcripción HAP2
-2.311	At5g55835	miR156h	factor transcripción SPL2/3/4/10
-2.181	At1g69795	miR395e	sulfato adeniltransferasas APS1/3/4 transportador de SO <sub>2</sub> AST68
-2.161	At5g35407	miR396b	factor transcripción GRF (GRL1/2/3/7/8/9) rodenasa
-2.050	At4g23713	miR319a	factor transcripción TCP2/4
-1.397	At5g26147	miR156f	factor transcripción SPL2/3/4/10
-1.183	At1g01183	miR165a	factor transcripción HD-ZIPIII (PHB, PHV, REV, ATHB-8, ATHB-15)
-1.140	At1g66725	miR163	transportador de S-adenosilmetionina SAMT
-1.034	At3g26812	miR169i	factor transcripción HAP2

### 1.2.2.3. Alteración por cobre del ritmo circadiano

Los ritmos circadianos son un conjunto de ritmos biológicos con periodo definido como el tiempo para completar un ciclo de ~ 24 h (Dunlap, 2004). En plantas, estos ritmos biológicos incluyen el movimiento de las hojas, la elongación del hipocotilo y la floración, así como las concentraciones de calcio libre en el citosol y la expresión de genes asociados a la fotosíntesis y otros procesos relacionados (Barak *et al.*, 2000; Harmer *et al.*, 2000). Se ha sugerido que hasta un 35 % del transcriptoma de *A. thaliana* podría estar regulado por el reloj circadiano (revisado en McClung, 2006). Este reloj incluye un oscilador central que es el responsable de generar el ritmo circadiano. En *Arabidopsis*, el oscilador está compuesto por tres genes regulados entre sí: LHY (del inglés *late elongated hypocotyl*), CCA1 (del inglés *circadian clock associated 1*) y TOC1 (del inglés *timing of CAB expresión 1*) (Alabadi *et al.*, 2001). La expresión y

estabilidad protranscripcional de LHY y CCA1 se activa por luz. Sus proteínas inducen la expresión de genes diurnos, como PRR5 (del inglés *pseudo-response regulators*), y reprimen la expresión de TOC1 y otros genes nocturnos, como es el caso de GI (gigantea) y LUX (del inglés *lux arrhythmo*). La reducción progresiva de la expresión de LHY y CCA1 durante el día permite la transcripción de TOC1 y genes nocturnos al llegar la noche. A su vez, TOC1 activa la transcripción de LHY y CCA1, alcanzando los niveles máximos al amanecer y empezando de nuevo el ciclo (Figura R.1.5).

Curiosamente, en nuestras condiciones experimentales, se observa una mayor expresión de los genes TOC1, GI, LUX y PRR5 en exceso de Cu (Tabla R.1.12, roja) y de los genes LHY y CCA1 en déficit del metal (Tabla R.1.12, verde). Este resultado sugiere una posible implicación del Cu en la regulación del oscilador dentro del reloj circadiano. En este sentido, se detectó la presencia de elementos CuRE de respuesta al Cu en las regiones promotoras de los genes descritos en el oscilador del ritmo circadiano (datos no mostrados). Tal y como se ha descrito anteriormente, las proteínas SPL podrían estar implicadas en la regulación transcripcional mediada por los elementos CuRE y, por lo tanto, podrían ser los factores que regulan el ritmo circadiano en respuesta al Cu. Poco se sabe sobre el funcionamiento del oscilador que provoca los ritmos circadianos, pero su alcance parece ser muy amplio. Si la participación del Cu en la regulación del oscilador fuera comprobada, éste podría ser un dato de gran importancia para esclarecer el mecanismo de funcionamiento del reloj circadiano en plantas.



**Figura R.1.5.** Modelo del sistema circadiano en *Arabidopsis*. Los genes están representados por rectángulos y las proteínas por óvalos. Las líneas entrecortadas representan transcripción y las sólidas regulación, positiva en el caso de punta de flecha y negativa en caso de línea perpendicular. Los componentes del oscilador están indicados en amarillo y el resto de genes en morado. La zona clara indica actividades principales durante el “día” y la oscura indica actividades principales durante la “noche”. CCA1, del inglés *circadian clock associated 1*; GI, *gigantea*; LHY, del inglés *late elongated hypocotyl*; LUX, del inglés *lux arrhythmo*; PRR5, del inglés *pseudo-response regulators*; TOC1, del inglés *timing of CAB expresión 1*. Basada en McClung (2006) y Alabadi y colaboradores (2001).

**Tabla R.1.12.** Respuesta génica del reloj circadiano a diferentes niveles de Cu en *Arabidopsis*. La tabla verde muestra los componentes que se expresan principalmente en déficit de Cu y la roja aquellos que se expresan principalmente en exceso de Cu.

log <sub>2</sub>	código	gen	anotación
2.529	At5g24470	PRR5	regulador de la respuesta a ritmo circadiano
1.257	At2g21660	GRP7	proteína unión RNA, feedback negativo que regula ritmo circadiano de su propio transcrito
1.151	At3g46640	LUX	factor transcripción familia Myb (tipo SHAKKYF)
0.956	At1g22770	GI	promueve ruta floración controlada por ritmo circadiano
0.734	At5g61380	TOC1	regulador del ritmo circadiano

log <sub>2</sub>	código	gen	anotación
-1.072	At2g46830	CCA1	represor transcripcional familia Myb
-1.027	At1g01060	LHY1	factor transcripcional relacionado con Myb

### 1.2.3. Resumen de los tipos de respuesta

A partir de todos los resultados mostrados, y a modo de resumen comparativo, se puede concluir que en *Arabidopsis* existen varios grupos de genes implicados en diferentes tipos de respuesta a las variaciones de Cu en el medio de crecimiento, como:

- Respuesta al estrés y alteración del metabolismo. La modificación de los niveles de Cu, del déficit al exceso, implica cambios en el tipo de estrés percibido por la planta. En este sentido, se han podido detectar diversos procesos alterados en las diferentes condiciones de Cu (Tabla R.1.13). En exceso del metal, *Arabidopsis* responde activando mecanismos de respuesta al estrés hídrico y salino, así como de reparación y modificación del DNA, presenta una división celular incrementada respecto al déficit del metal, y todo ello señalizado mediante MAPKs, principalmente. En el caso de condiciones deficitarias de Cu, *Arabidopsis* responde activando mecanismos de respuesta a estrés por patógenos y del metabolismo del azufre, presenta una expansión

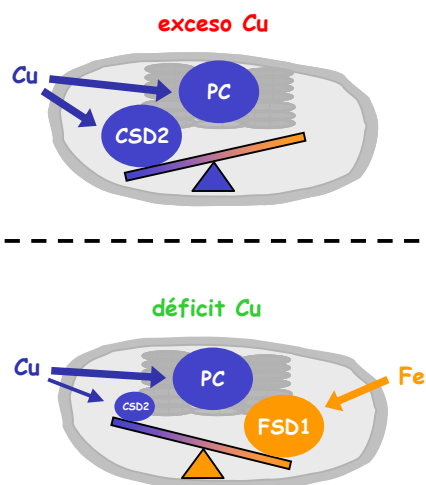
celular incrementada respecto al exceso del metal, y todo ello regulado, en parte, mediante proteínas con repeticiones de anquirina y miRNAs. Además, cabe destacar la alteración observada en el reloj circadiano por los niveles de Cu. Estos resultados han sido obtenidos en las últimas etapas experimentales de la presente Tesis, por lo que no se han podido realizar las comprobaciones pertinentes en los siguientes apartados.

**Tabla R.1.13.** Resumen de los procesos de respuesta a diferentes niveles de Cu en *Arabidopsis*.

exceso Cu	déficit Cu
respuesta al estrés hídrico y salino	respuesta al estrés por patógenos
reparación y modificación DNA	
división celular	expansión celular
	metabolismo del azufre
señalización (MAPK)	señalización (anquirina, miRNAs)
ritmo circadiano (TOC1)	ritmo circadiano (LHY1, CCA1)

- Prioridad en el uso del metal para proteínas esenciales y sustitución de proteínas con función equivalente que utilizan otros metales en sus centros activos. Una de las respuestas a la deficiencia de Cu es el mantenimiento de la distribución del metal hacia proteínas esenciales como la plastocianina en detrimento de otras proteínas que pueden ser sustituidas como la Cu/ZnSOD cloroplástica, CSD2. Esta sustitución tiene lugar por la FeSOD en el cloroplasto, FSD1, la cual ejerce la misma función pero con un elemento metálico diferente en su centro activo (revisado en Pilon *et al.*, 2006; Puig *et al.*, 2007a) (Figura R.1.6). Además, estos resultados señalan a los niveles de mRNA de CSD2 y FSD1 como indicadores moleculares de un exceso y déficit de Cu, respectivamente, dentro de las células de *A. thaliana*. Otros componentes de la

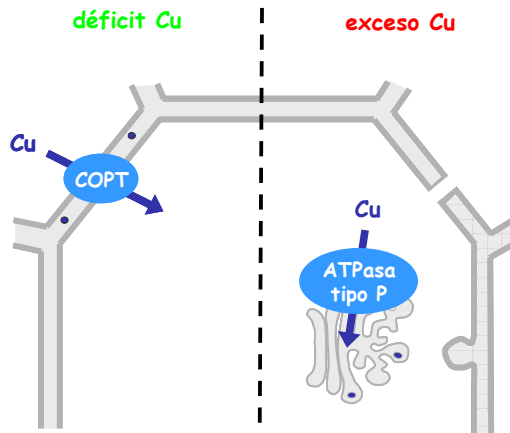
homeostasis del Fe muestran también elevados niveles de expresión en deficiencia de Cu (Tabla R.1.9). Por ello, proponemos un modelo donde la demanda de Fe en la planta aumenta durante el déficit de Cu, probablemente como consecuencia de la sustitución de proteínas de Cu por proteínas de Fe en la célula. El conocimiento de las redes homeostáticas de ambos metales está aumentando en plantas superiores, principalmente en *Arabidopsis*, y ya se han descrito ejemplos de esta interrelación entre la homeostasis de Cu y Fe, tanto en algas como en plantas superiores (revisado en Merchant *et al.*, 2006; Pilon *et al.*, 2006; Puig *et al.*, 2007a).



**Figura R.1.6.** Rutas prioritarias y sustitución de proteínas en el cloroplasto, según los niveles de Cu. La figura representa un cloroplasto completo. Las flechas indican el transporte de iones y su grosor la prioridad de las rutas. Las proteínas diana de Cu están representadas por óvalos azul oscuro y las de Fe en naranja. La abundancia relativa de las proteínas diana está indicada por el tamaño de los óvalos. PC, plastocianina; CSD, del inglés *Cu/Zn superoxide dismutase*; FSD, del inglés *Fe superoxide dismutase*.



- Regulación de los niveles intracelulares de Cu. Uno de los tipos de respuesta de *Arabidopsis* a los niveles de Cu en el medio ha de consistir en una compleja red de regulación de la expresión génica de los diferentes transportadores de Cu, tanto a nivel tisular como intracelular, para que de forma conjunta se produzca un adecuado balance de los niveles del metal que supla las necesidades, mientras que se eviten los daños provocados por el exceso. Entre los componentes que efectúan el transporte de Cu en *A. thaliana*, cuya función puede ser más relevante en respuesta al Cu en el medio, destacamos los siguientes: la familia COPT de transportadores de Cu de alta afinidad, que participan en la incorporación del metal transportándolo hacia el citosol y cuya expresión, en general, aumenta en respuesta a la deficiencia de Cu; y la subfamilia de ATPasas tipo P transportadoras de Cu, que actúan como bombas de exportación del metal, en la mayoría de los casos, e incrementan su expresión en respuesta a un exceso de Cu en el medio (ver apartado 2.2 de Introducción) (Tabla R.1.1 y Figura R.1.7).



**Figura R.1.7.** Transportadores de Cu activados, según los niveles de Cu. La figura representa una célula vegetal genérica. Los transportadores están representados por óvalos azul claro. Las flechas indican el sentido del transporte de iones. COPT, del inglés *copper transporter*.



## **La ATPasa tipo P transportadora de cobre HMA5**

## **2. LA ATPasa TIPO P TRANSPORTADORA DE COBRE HMA5**

Uno de los componentes de la homeostasis del Cu que respondió en *Arabidopsis* a un exceso de este metal, es la ATPasa tipo P transportadora de Cu HMA5 (ver tabla R.1.1 y figura R.1.3). Al inicio de esta Tesis, se disponía de información sobre la función de todas las ATPasas tipo P transportadoras de Cu<sup>+</sup> conocidas en *Arabidopsis*, excepto de HMA5. Las ATPasas de esta familia se han descrito como responsables de la tolerancia a metales en diferentes organismos (Rensing *et al.*, 2000; Van Hoof *et al.*, 2001; Reeve *et al.*, 2002). En este apartado, se abordó una caracterización preliminar de este transportador, con la finalidad de esclarecer su función en la planta.

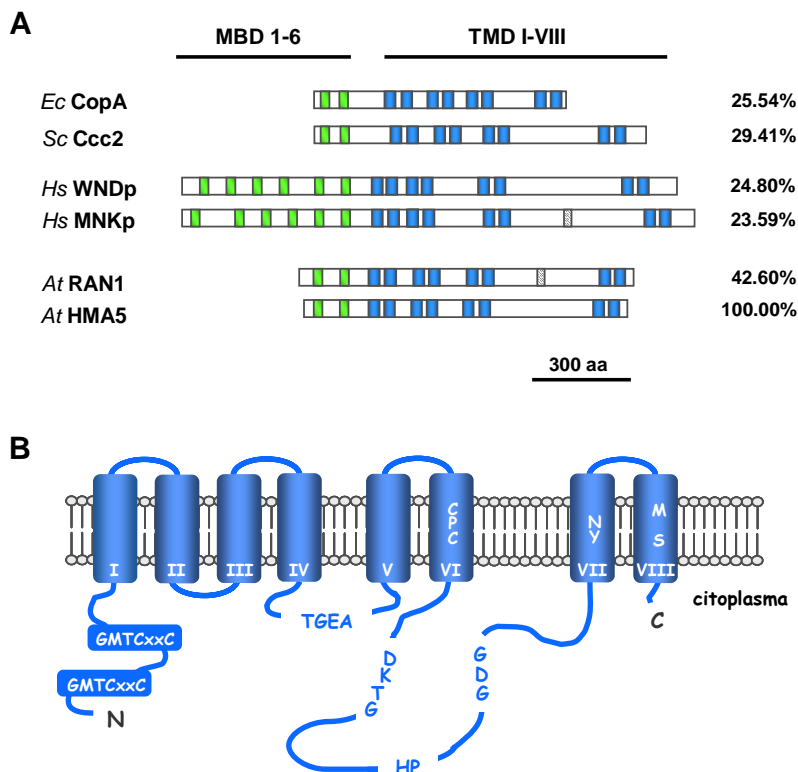
### **2.1. DESCRIPCIÓN DE HMA5 EN *Arabidopsis thaliana***

La secuencia entera de la región codificante de *HMA5*, obtenida como producto de RT-PCR, confirmó la asignación de exones en la base de datos MIPS Munich Institute of Plant Science (<http://mips.gsf.de/proj/thal/db/>; código At1g63440). El gen *HMA5* consta de 3455 nucleótidos, 2988 de ellos en forma de 6 exones, que codifican una proteína de 995 aminoácidos.

La proteína HMA5 conserva las principales características de las ATPasas tipo P transportadoras de Cu, siendo homóloga de las proteínas CopA de *E. coli*, Ccc2 de levadura, WND y MNK de humanos, así como de RAN1 de *Arabidopsis* (Figura R.2.1.A). Las diferencias principales de secuencia entre HMA5 y su homólogo más cercano en *Arabidopsis*, RAN1, residen en las regiones amino y carboxilo terminales y en el lazo citosólico central, cerca del motivo HP, donde existe un corto fragmento insertado en RAN1 pero no en HMA5 (Figura R.2.1.A). Curiosamente, estas diferencias han sido descritas también entre los genes humanos de las proteínas de las enfermedades de

Menkes (MNK) y Wilson (WND) (Figura R.2.1.A) y han sido atribuidas a procesos de regulación (Lutsenko y Petris, 2002). En este sentido, la proteína MNK es más similar a RAN1, mientras que HMA5 se parece a la proteína WND (Figura R.2.1.A).

Las características conservadas en HMA5 comprenden algunos de los principales dominios de las ATPasas tipo P, incluyendo un dominio aspartato quinasa (DKTGT), un dominio de unión a ATP (GDG) y un dominio fosfatasa (TGEA) (Figura R.2.1.B). Además, HMA5 contiene todos los motivos presentes en las ATPasas tipo P transportadoras de metales pesados, incluyendo 8 dominios transmembrana (TMD I-VIII), 2 dominios GMTCxxC de unión a metales (MBD, del inglés *metal binding domain*) amino terminales, el motivo de transducción de iones CPC en TMD VI, y el motivo HP (Figuras R.2.1.A y 2.1.B). La proteína HMA5 pertenece al subgrupo IB-1 de las ATPasas tipo P transportadoras de metales (Argüello, 2003) y conserva los residuos específicos de unión a metales descritos en CopA como posiblemente implicados en la coordinación del  $\text{Cu}^+$  durante el transporte (Mandal *et al.*, 2004). En HMA5, estos residuos son: Cys617 y Cys619 (TMVI), Tyr930 y Asn931 (TMVII) y Met959 y Ser963 (TMVIII) (Figura R.2.1.B). Por otro lado, en la topología propuesta para HMA5, ambas regiones amino y carboxilo terminales, así como el lazo principal entre TMD VI y TMD VII, se localizarían hacia el espacio citosólico (Figura R.2.1.B). Para una descripción detallada de los diferentes motivos, ver las revisiones de Williams y colaboradores (2000), Lutsenko y Petris (2002) y Kühlbrandt (2004).



**Figura R.2.1.** Esquema de la estructura y la topología de las ATPasas tipo P transportadoras de Cu. **(A)** Alineamiento esquemático de las ATPasas tipo P transportadoras de Cu de *E. coli* (*Ec* CopA), *S. cerevisiae* (*Sc* Ccc2), las proteínas humanas de la enfermedad de Menkes (*Hs* MNKp) y de Wilson (*Hs* WNDp), RAN1 y HMA5 de *A. thaliana*. Las características conservadas en la estructura primaria están representadas desde el extremo amino (izquierda) al extremo carboxilo (derecha). Los dominios de unión a metales (MBD) están indicados con cajas verdes y los dominios transmembrana (TMD) en azul. Las inserciones en la secuencia están indicadas con cajas rayadas. El porcentaje de identidad de cada proteína, respecto a HMA5, se muestra a la derecha. **(B)** Vista esquemática de la organización transmembrana propuesta para la proteína HMA5. Los segmentos transmembrana del I al VIII están representados con rectángulos. El dominio amino terminal con las repeticiones de unión a metales (GMTCxxC) y las secuencias conservadas en las ATPasas tipo P transportadoras de Cu están indicadas en el código de aminoácidos de una letra. Los extremos amino y carboxilo están indicados con la letra N y C, respectivamente.

## **2.2. ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DEL GEN *HMA5* EN *Arabidopsis thaliana***

### **2.2.1. Análisis teórico de la secuencia promotora de *HMA5***

En la secuencia de 1.2 kb de la región 5' de *HMA5* se han identificado una serie de presuntos elementos *cis* reguladores de la transcripción (Figura R.2.2). Las posiciones relativas de los diferentes motivos descritos vienen indicadas respecto al inicio de la traducción (al que se le asigna la posición +1), dado que se carece de datos sobre el inicio de la transcripción, al que normalmente se refieren las posiciones de las cajas promotoras.

#### Elementos generales de transcripción en plantas

En la posición -119 aparece una secuencia consenso CAAT, común en regiones 5' no codificantes de genes eucariotas (Shirsat *et al.*, 1989), y se identificó una posible caja TATA en la posición -250 (TTTATATA).

#### Elementos específicos de raíz

En las posiciones -1098, -907, -827, -529, -521 y -410 hay secuencias ATATT descritas en el promotor rol D de *Agrobacterium rhizogenes*, que dirige la expresión mayoritariamente en raíces y a un nivel mucho más bajo en tallos y hojas (Elmayan y Tepfer, 1995).

#### Elementos de regulación por ABA, desecación, germinación y de expresión en semillas y embriones

En la posición -596 hay un motivo descrito en arroz como motivo A (*ABRE-like sequence*), importante para la regulación por ABA mediada por los factores de transcripción TRAB1 y bZIP. Este motivo es similar a otros presentes en 24 genes de *Arabidopsis* reprimidos durante la germinación (Hattori *et al.*, 1995; Ogawa *et al.*, 2003).

```

-1194 TGAAAGGAAA GAAAACGAGT GTTGAATGAT GCAATGCTAA CTAAC TAAAA ACCAACTCT
-1134 CAACTCTGTA AATCAATCGA CTGATTACAA CATTGATAT GTTTTTTTTT TGCTCTGATC
-1074 TTGACGAGTG TGTCTGTGTT CTTGATTAGT TTTGAGTTTT GGGTGGTTC AAGTGTTTGT
-1014 AAATGAAGAG ATGAACATAG TTTCTGAAAG ATTTTCTCTA TTATTTGAAA ATCTATGAGA
-954 GGTGAAGAA TGTTAATGTA GTGTGTTTGG ATCTAACCTT TAATCTTATA TTATATAGAG
-894 CATTGTATCT ATTGTTTGAC ATGATTAGTC TCATTGGAAG AGCTTCAAG GCAATCAATT
-834 TGAGATCAAT ATCAGTCTCA GACAAGTGTG TCGGACCAA GAAGAAGAAG AAACGTAGTT
-774 GAAGTTCATA AATCATAATG CATGGATCAA CTTAATAAAA GGCCACATT TAGCCTCGTA
-714 TCAGTCTAAA TGGCCACAC AAGTCAATAG GCCCATTTAT CAATGCTTTG ACTGTTTCA
-654 ATCTTCAATT TTGGTATGAC TTCTTCTTAC GAGGTGAGT GCCATAAAG ATTAGACAGA
-594 CACGTAAAAAT AGATTCCATT TTACCTTTAG TTAAACAGA TATGGATTAG CCAAGTTTCG
-534 TTAGTATATT GTCATATTAT TTTATTGAAA CAGAAAAAAA CAAGTAAAGA TTACTTAATC
-474 ATTCTTAATC AGGCCGTGTC TTAATTATCA AAAAAAAAAA AAGATTACTT CATCATGTCG
-414 TAATAAATC ACTAATCAAT CCTTTTTTTT TTGTCATCAC TAATCAATCC ATTTTTTTAG
-354 CGAACCTTAA AGTCAAAGGT GTTGTTACTT TGGACGATTA AATTGAATT ATATAATTA
-294 AAAGAAAAT GGAATTTAAT CTGTTGAGGT TGAAATCTC TCTTTTTATA TATGGCGGTT
-234 GAAATTTAAA AGTAAAGTAT TGTTTGGTAG GGCCCTATAG TTAAACATT TACAATCGG
-174 CCCACACATT TTTGTCATTT TAGATGTCGT AAACCGCTTT CCCTCGTCTT CGTTCCAATT
-114 TAAAAAGCAA AACAAATTCA AAAGTCTCA TCATTTCCTA TAAACCTAAA AGCTTTTTAA
-54 AAACCTAAAT TCGATACGAG AAGAACAAGA TTCGCGACA AGACATCGA TTACATG

```



**Figura R.2.2.** Secuencia de nucleótidos de la región promotora de *HMA5* y de sus elementos reguladores. Las cifras indican las posiciones relativas referidas al primer nucleótido del codón de inicio, al que se le asigna la posición +1. Los elementos reguladores más relevantes están representados con colores (naranja, cajas de respuesta a ABA, desecación, germinación y de expresión en semillas y embriones; verde, cajas de expresión en raíz; azul, cajas de respuesta a etileno y de defensa temprana; rosa, cajas de respuesta a luz y ritmo circadiano). La caja TATA está indicada en negrita, la caja CAAT subrayada y el inicio de la traducción con una flecha.

En -932, -1022 y -812 hay una secuencia GTGTTTC, centro del elemento (CA)<sub>n</sub> descrito en genes de proteínas de almacenamiento de *Brassica napus*, como napA, que activan o reprimen su transcripción específicamente en embrión, endospermo y semillas (Ellerstrom *et al.*, 1996).

En la posición -1146 hay un sitio de reconocimiento por factores de transcripción Myb, descrito en el promotor del gen rd22 de respuesta a deshidratación y en muchos otros genes de *Arabidopsis*. Y en -1104 y -812 hay dos sitios de reconocimiento por factores de transcripción Myc, descritos también en estos mismos promotores (Abe *et al.*, 2003).



Por otro lado, en la posición -756 hay una secuencia CATGCA, repetición RY descrita en la caja RY/G del gen *napA* de *Brassica napus*, requerida para la expresión específica en semillas (Ezcurra *et al.*, 1999). En -757 hay esta misma repetición RY pero la descrita en genes que codifican proteínas de almacenamiento en semillas de leguminosas (Fujiwara y Beachy, 1994). Además, coincide con la secuencia TCCATGCAT, centro del elemento Sph descrito en el gen C1 de maíz, donde se une la proteína VP1 requerida específicamente para la expresión del programa de maduración en el desarrollo de las raíces, actuando como factor de transcripción posiblemente involucrado en la potenciación de la respuesta hormonal específica de raíces (McCarty *et al.*, 1991).

#### Elementos de regulación por etileno y de defensa temprana

En las posiciones -312 y -110 hay dos elementos de respuesta a etileno, descritos en los genes E4 y GST1 de tomate. El gen GST1 está relacionado con senescencia (Itzhaki *et al.*, 1994).

Finalmente, en -668 y -344 hay un motivo TTTGACT o caja WB descrita en los promotores de los genes WRKY1 y tres de perejil. WRKY es un factor de transcripción importante en la regulación de genes de respuesta de defensa temprana (Eulgem *et al.*, 2003).

#### Elementos de regulación por luz y ciclo circadiano

En las posiciones -848 y -16 hay secuencias CAANNNNATC descritas en el gen Lhc de tomate, necesarias para la expresión circadiana (Piechulla *et al.*, 1998).

En las posiciones -984, -968, -859, -679, -575, -502, -451 y -291 existen sitios consenso de unión a GT-1 descritas en muchos genes regulados por luz en diferentes plantas. GT-1 puede estabilizar el complejo TFIIA-TBP-DNA (revisado en Terzaghi y Cashmore, 1995a y 1995b).

Hay dos secuencias del elemento Inr en -658 y -651 que han sido descritas en el promotor del gen *psaDB* de tabaco sin caja TATA. La transcripción regulada por luz del gen *psaDB* depende de este elemento Inr (Nakamura *et al.*, 2002).

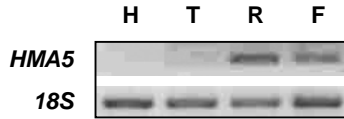
Y en las posiciones -1026 y -328 hay dos motivos ACTTTG o cajas T descritas en el promotor del gen *GAPB* de *A. thaliana*, que son necesarios para la activación transcripcional de un gen mediada por luz. Este gen codifica la subunidad B de la gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa cloroplástica de *A. thaliana* (Chan *et al.*, 2001).

Resulta de interés la presencia de cajas necesarias para la expresión circadiana en el promotor de este transportador de Cu, ya que el Cu podría estar implicado en la regulación del oscilador que genera el ritmo circadiano (ver apartado 1.2.2.3 de Resultados y discusión).

### **2.2.2. Estudio del patrón de expresión del gen *HMA5* por órganos**

La expresión de *HMA5* en plantas de *Arabidopsis* fue estudiada mediante RT-PCR semicuantitativa con oligonucleótidos específicos (ver tabla M.2), ya que los niveles de mRNA para *HMA5* bajo condiciones estándar de crecimiento son extremadamente bajos y los análisis por *Northern* sólo detectan una leve y difusa señal de hibridación (datos no mostrados).

El estudio del patrón de expresión por órganos determinó que *HMA5* se expresa mayoritariamente en raíces y flores, aunque también se detectó un pequeño nivel de expresión en el resto de órganos aéreos analizados (Figura R.2.3). La expresión en flores podría deberse a la alta expresión en el polen como se muestra en la base de datos *Genevestigator* (<https://www.genevestigator.ethz.ch/at/>) y *Functional genomics of plant transporters* (<http://plantst.sdsc.edu/>).



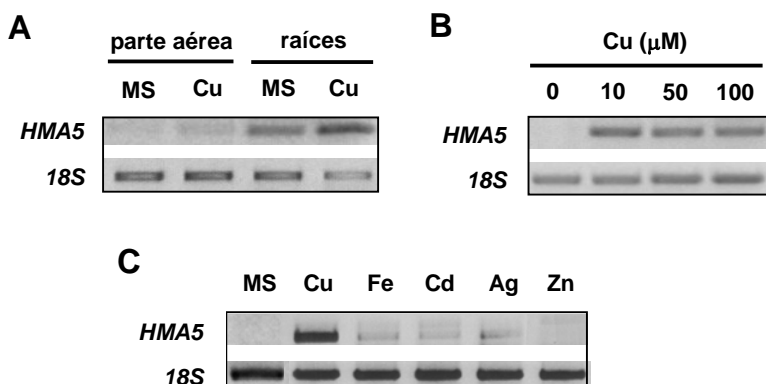
**Figura R.2.3.** Patrón de expresión por órganos de *HMA5*. Productos de RT-PCR a partir de RNA total de hojas (H), tallos (T), raíces (R) y flores (F) de plantas adultas. Los niveles de rRNA del gen *18S* se muestran como control de carga.

Este resultado, junto a otros estudios genómicos (ver análisis por micromatrices incluidos en la base de datos *Ionomics*, <http://hort.agriculture.purdue.edu/Ionomics/database.asp>), indica que la expresión de *HMA5* sigue un patrón similar a *RAN1*, expresándose ésta principalmente en raíces y polen. Además, el análisis de los promotores de *HMA5* y *RAN1* revela la presencia de posibles elementos *cis* de regulación de la expresión en estos órganos (Figura R.2.2). Sin embargo, aunque se debería realizar un estudio más extenso acerca de la expresión de ambos genes a lo largo de la planta entera, un análisis por micromatrices de la expresión génica de *Arabidopsis* en diferentes tipos celulares de la raíz ha mostrado que mientras *RAN1* se encuentra abundantemente en todos los tipos celulares de la raíz, *HMA5* se expresa principalmente en las células del periciclo (Birnbaum *et al.*, 2003). Un estudio más específico de la expresión de *HMA5* en raíces sería de gran interés, ya que determinar las células que lo expresan podría ser de especial importancia para esclarecer su función en la planta.

### 2.2.3. Estudio de la regulación de la expresión del gen *HMA5* por cobre

La adición de Cu 10  $\mu$ M al medio estándar de crecimiento en placa MS provoca un fuerte incremento de los niveles de mRNA de *HMA5* comparado

con el control de carga (Figura R.2.4.A). Sin embargo, la adición de diferentes concentraciones de Cu al medio de crecimiento provoca una inducción robusta de la expresión de *HMA5* independiente de la dosis, indicando que los niveles máximos de expresión ya se alcanzan a una concentración de Cu 10  $\mu\text{M}$ , la concentración de Cu ensayada más baja (Figura R.2.4.B). Ningún otro metal testado, como el Fe, Cd, Ag o Zn a una concentración 30  $\mu\text{M}$ , incrementó la expresión de *HMA5* (Figura R.2.4.C), indicando que el Cu regula de manera específica los niveles de mRNA de *HMA5* en *Arabidopsis*.



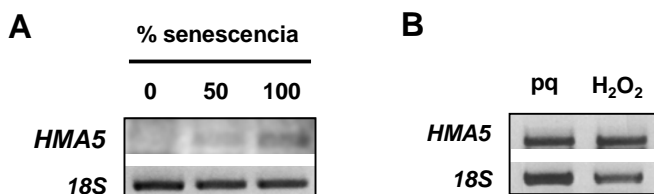
**Figura R.2.4.** Regulación por Cu de la expresión de *HMA5*. **(A)** Expresión de *HMA5* en raíces y parte aérea. Productos de RT-PCR a partir de RNA de raíces y parte aérea de plántulas de 8 días crecidas en medio MS o en el mismo medio suplementado con Cu 10  $\mu\text{M}$ . **(B)** Niveles de mRNA de *HMA5* bajo tratamientos con diferentes concentraciones de Cu. Productos de RT-PCR a partir de RNA total de plántulas de 8 días crecidas en medio MS suplementado con Cu 0, 10, 50 y 100  $\mu\text{M}$ . **(C)** Niveles de mRNA de *HMA5* bajo tratamientos con diferentes metales. Productos de RT-PCR a partir de RNA total de plántulas de 8 días crecidas en medio MS o en el mismo medio suplementado con Cu, Fe, Cd, Ag o Zn 30  $\mu\text{M}$ . Los niveles de rRNA del gen *18S* se muestran como control de carga.

La expresión de *HMA5*, inducida de manera específica por un exceso de Cu, señala una posible función de HMA5 bajo estas condiciones. Otras ATPasas tipo P transportadoras de Cu diferentes a las de plantas, tales como CopA en *E. coli*, se inducen también de manera selectiva por iones de Cu (Rensing *et al.*, 2000). En el caso de los homólogos en humanos, este tipo de transportadores responde postranscripcionalmente al exceso de Cu mediante la redistribución de la proteína desde el aparato de Golgi hacia la membrana plasmática (Petris *et al.*, 1996).

#### **2.2.4. Estudio de la regulación de la expresión del gen *HMA5* durante la senescencia y por agentes oxidantes**

Los cambios de expresión de *HMA5* en los últimos estadios del desarrollo vegetativo se analizaron mediante RT-PCR a partir de hojas verdes maduras y hojas en diferentes estados de senescencia, usando porcentajes de superficie de hoja amarilla como parámetro indicativo. La figura R.2.5.A muestra cómo los niveles de transcrito de *HMA5* se ven incrementados en los estados de 50 % y 100 % de hoja amarilla.

Además, la expresión de *HMA5* se indujo fuertemente tras tratamientos que provocan estrés oxidativo, como paraquat 3 mM y peróxido de hidrógeno 100  $\mu$ M durante 30 min (Figura R.2.5.B), indicando una fuerte y rápida respuesta de la expresión de *HMA5* a condiciones de estrés oxidativo en el medio de crecimiento.



**Figura R.2.5.** Regulación durante la senescencia y por agentes oxidantes de la expresión de *HMA5*. **(A)** Productos de RT-PCR a partir de RNA total de hojas de plantas adultas con diferente grado de senescencia. El % senescencia indica % superficie de hoja amarilla. **(B)** Productos de RT-PCR a partir de RNA total de plantas adultas completas sometidas a diferentes tratamientos tal y como se describe en Materiales y métodos. pq, paraquat 3 mM; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, peróxido de hidrógeno 100 μM. Los niveles de rRNA del gen *18S* se muestran como control de carga.

En lo que respecta a la senescencia, además de *HMA5* (Figura R.2.5.A), se ha visto que otros genes involucrados en la homeostasis del Cu como *CCH* (Himelblau *et al.*, 1998) se sobreexpresan durante esta etapa. Este hecho ha sido interpretado como que *CCH* participa en el reciclaje del Cu desde los órganos vegetativos hacia los órganos reproductivos (Himelblau y Amasino, 2000). Por otra parte, los resultados obtenidos en el hongo *Podospora anserina* sobre la redistribución del Cu intracelular indican que este proceso podría jugar un papel clave durante la senescencia (Borghouts *et al.*, 2002). En este sentido, numerosos datos relacionan la homeostasis del Cu con procesos fisiológicos y estados como el envejecimiento, cáncer y virulencia (Rees y Thiele, 2004). También se ha implicado a la homeostasis del Cu en respuestas a ozono (Himelblau *et al.*, 1998) y a patógenos (Balandin y Castresana, 2002; Company y González-Bosch, 2003). Todos estos procesos comparten el hecho común de incrementar el estrés oxidativo en las células. Así mismo, como se muestra en la figura R.2.5.B, la expresión de *HMA5* se induce fuertemente por tratamientos de

estrés oxidativo, poniendo de manifiesto que *HMA5* forma parte del grupo de genes de la homeostasis del Cu que responden a estos procesos. El análisis teórico que se ha llevado a cabo del promotor (Figura R.2.2), reveló elementos de respuesta a etileno y de defensa temprana quizá implicados en estas respuestas.

### **2.3. ESTUDIO DE LA FUNCIÓN DE HMA5 EN *Arabidopsis thaliana* MEDIANTE PÉRDIDA DE SU EXPRESIÓN**

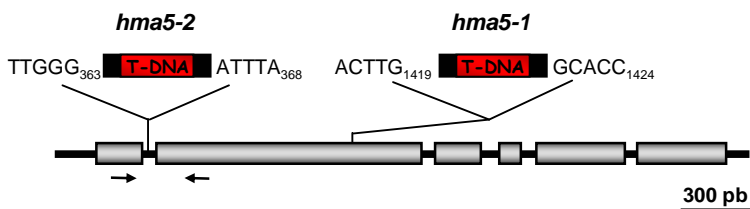
#### **2.3.1. Obtención de líneas mutantes por inserción de T-DNA en el gen *HMA5***

##### *2.3.1.1. Identificación de las líneas con inserción de T-DNA en HMA5 y mapeo de la inserción*

Para investigar la función de HMA5, previamente en nuestro grupo de investigación, el Dr. Vicente Sancenón obtuvo líneas mutantes por pérdida de función para este gen en *Arabidopsis*. Estas líneas mutantes se obtuvieron a partir de la colección de DNAs provenientes de semillas de *A. thaliana*, ecotipo *Columbia*, con inserciones al azar de T-DNA por transformación con el vector pROK2, generada por J.M. Alonso, W. Crosby y J.R. Ecker (*SALK collection*, <http://www.Arabidopsis.org/abrc/alonso.html>). La colección se rastreó mediante PCR con oligonucleótidos específicos del gen de interés y del T-DNA, y mediante análisis por *Southern*.

Para ubicar el lugar exacto de las inserciones del T-DNA en el locus de *HMA5*, se amplificó la región de DNA genómico contigua a las inserciones y se secuenció. Sólo se mapearon aquellas inserciones más próximas a los flancos del gen de interés, estimándose la proximidad según el tamaño de las bandas de

hibridación en el *Southern*. Siguiendo este criterio, se determinó la posición del T-DNA en 2 líneas con inserción de las identificadas previamente (*hma5-1*, n° 06448 y *hma5-2*, n° 15196). El mapeo de las inserciones reveló que el T-DNA está insertado en el segundo exón del gen *HMA5* en la línea *hma5-1* y en el primer intrón en la línea *hma5-2*, 1419 pb y 363 pb tras el codón de comienzo de la traducción, respectivamente (Figura R.2.6).



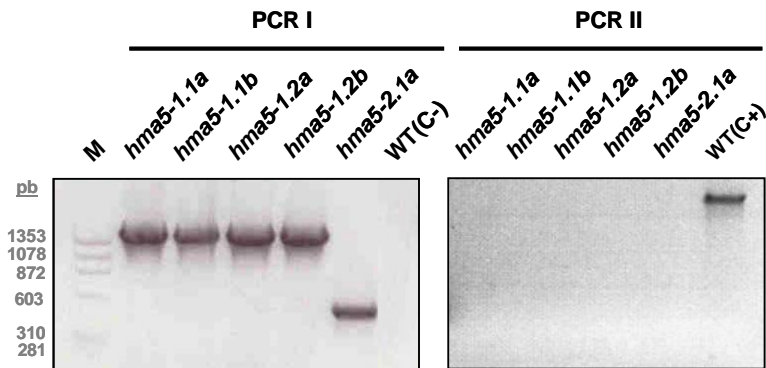
**Figura R.2.6.** Esquema de los sitios de inserción de T-DNA en el gen *HMA5* en las plantas mutantes *hma5-1* y *hma5-2*. Los exones se indican con cajas grises y los intrones con líneas conectoras. El T-DNA está representado en rojo. Las secuencias de *HMA5* que bordean el T-DNA en los sitios de inserción están indicadas. Las flechas muestran la localización de los oligonucleótidos usados en la RT-PCR.

### 2.3.1.2. Identificación de plantas homocigotas y comprobación de la pérdida de expresión de HMA5

A partir de aquí inicié mi trabajo en lo referente a este apartado, obteniendo plantas con inserción estable para ambas líneas mapeadas, por tener el T-DNA insertado dentro de la región codificante. Para genotipar las plantas de la población segregante perteneciente a cada una de las líneas, se efectuaron dos rondas de PCR. La primera de ellas permite detectar la presencia de T-DNA en alguna de las copias del DNA genómico, por la utilización de un



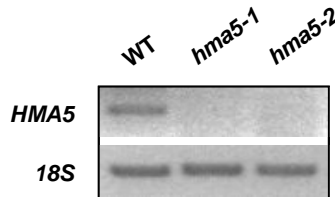
oligonucleótido específico del T-DNA y otro del gen *HMA5*. La segunda determina la ausencia de T-DNA en alguna de las copias del DNA genómico, por la utilización de un par de oligonucleótidos específicos de *HMA5* (ver apartado 2.4 de Materiales y métodos). De esta manera, las plantas que llevan la inserción en homocigosis dan positivo sólo en la primera ronda, ya que el tamaño del T-DNA excede la procesividad de la polimerasa. Como se muestra en la figura R.2.7, se obtuvieron diferentes plantas homocigotas.



**Figura R.2.7.** Genotipado de las plantas mutantes *hma5-1* y *hma5-2*. **PCR I:** 1ª ronda de PCR a partir de DNA genómico con oligonucleótidos específicos de un extremo del T-DNA y el correspondiente al gen *HMA5*, según se describe en Materiales y métodos. **PCR II:** 2ª ronda de PCR con el par de oligonucleótidos específicos del gen *HMA5*. La línea WT se incluye como control de la ausencia de T-DNA. El tamaño (pb) de las diferentes bandas del marcador molecular está indicado.

A continuación, se comprobó la pérdida de expresión del gen *HMA5* en las plantas con inserción estable mediante RT-PCR, a partir de RNA total de raíces usando oligonucleótidos específicos del gen *HMA5* (ver tabla M.2). El producto de la amplificación fue detectado sólo en la línea control silvestre

mientras que no se obtuvo producto en las líneas mutantes *hma5-1* y *hma5-2* (Figura R.2.8). Estos resultados indican que ambas líneas identificadas son verdaderos mutantes nulos del gen *HMA5*.

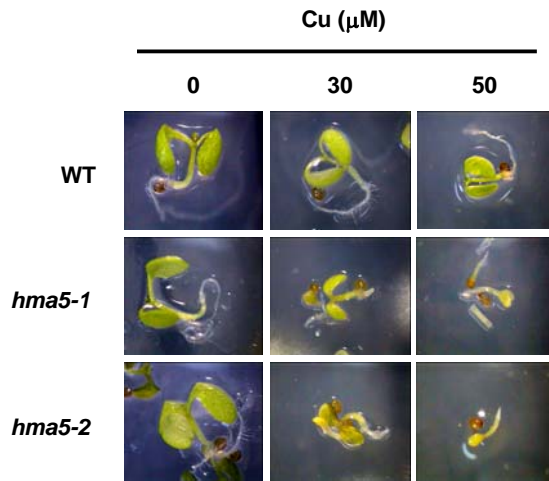


**Figura R.2.8.** Comprobación de la pérdida de expresión de *HMA5* en las plantas mutantes *hma5-1* y *hma5-2*. Productos de RT-PCR a partir de RNA total de raíces de las plantas control silvestres (WT) y las plantas mutantes *hma5-1* y *hma5-2* crecidas en maceta. Los niveles de rRNA del gen *18S* se muestran como control de carga.

### 2.3.2. Caracterización fenotípica de las líneas mutantes *hma5*

#### 2.3.2.1. Estudio de la sensibilidad al cobre

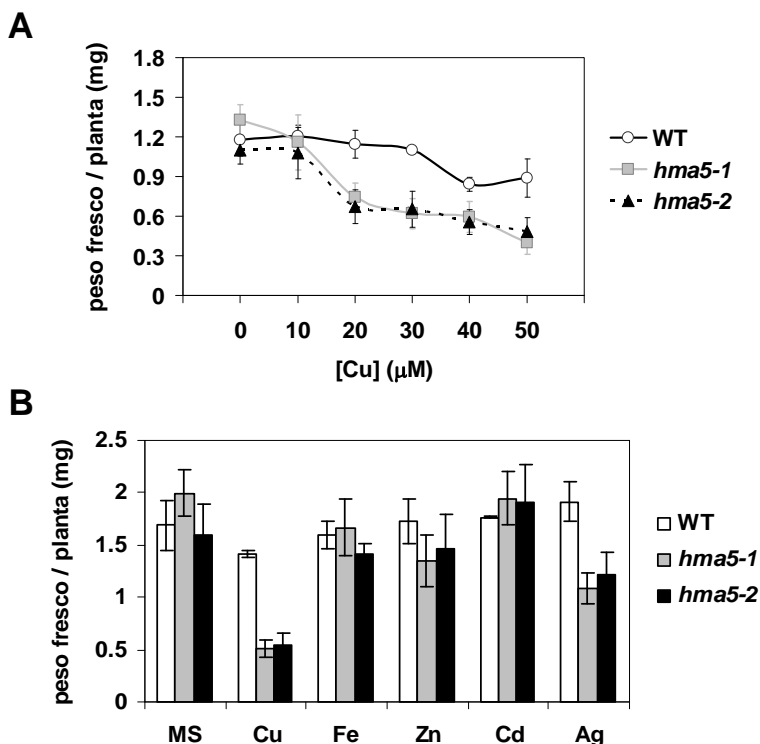
Las características de crecimiento, desarrollo y maduración de los mutantes *hma5* son indistinguibles de las de la línea silvestre cuando son crecidas en sustrato vegetal (datos no mostrados). Pero, dado que la expresión de *HMA5* se induce de manera específica por Cu (Figura R.2.4.C), se ensayó el crecimiento de los mutantes *hma5* en medio MS suplementado con este metal. Como muestra la figura R.2.9, tras 8 días con Cu 30  $\mu$ M sólo se desarrollan cotiledones amarillos en las plántulas *hma5* y el crecimiento de sus raíces se para completamente, mientras que un incremento en la concentración de Cu hasta 50  $\mu$ M inhibe casi por completo su germinación.



**Figura R.2.9.** Fenotipo de las plántulas mutantes *hma5* en presencia de Cu. Plantas control silvestres (WT) y mutantes nulos *hma5-1* y *hma5-2* crecidas durante 8 días en placas con medio MS suplementado con Cu 0, 30 o 50  $\mu\text{M}$ . Las fotos muestran ejemplares representativos de cada línea, a la misma escala.

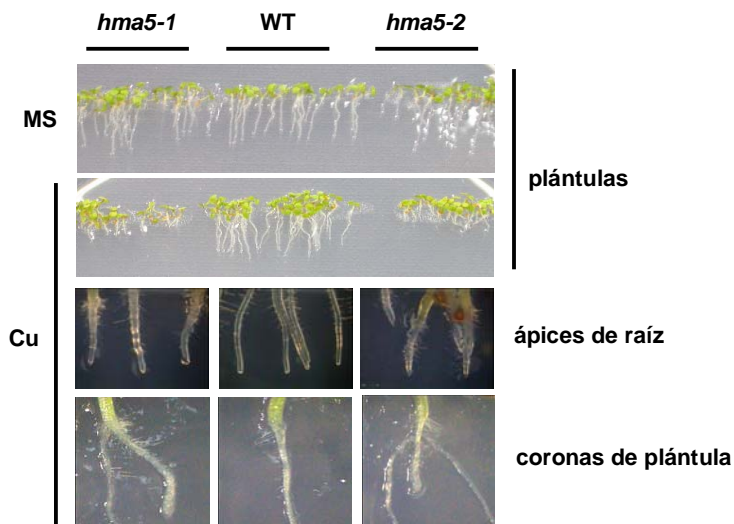
Para cuantificar este efecto del Cu en el crecimiento, se midió el peso fresco de plántulas de 8 días. En la figura R.2.10.A se puede observar cómo el desarrollo de las plántulas se ve retrasado en los mutantes *hma5* cuando el Cu aumenta en el medio estándar de crecimiento en placa MS desde 0 a 50  $\mu\text{M}$ , detectándose una reducción aproximada del 50 % a concentraciones de Cu en el medio entre 20 y 30  $\mu\text{M}$ . Para valorar la especificidad de Cu del fenotipo observado, se añadieron sales de diferentes metales al medio de crecimiento. Sólo el Cu y parcialmente la Ag, metal isoeléctrico al  $\text{Cu}^+$  (pero no fisiológico), provocan un descenso en el peso fresco de las líneas mutantes, mientras que otros metales como Fe, Zn y Cd no tienen ningún efecto detectable (Figura R.2.10.B). Estos resultados indican que el fenotipo observado en los mutantes *hma5* es una respuesta específica de Cu.

De manera conjunta, estos resultados demuestran que las plantas de *Arabidopsis* defectuosas en HMA5 son más sensibles al Cu que los controles silvestres.



**Figura R.2.10.** Cuantificación y especificidad del efecto del Cu sobre el peso fresco de las plántulas mutantes *hma5*. **(A)** Peso fresco de los mutantes *hma5* bajo condiciones de exceso de Cu. Valores promedio del peso fresco de 5 plántulas de las líneas control silvestres (WT) y mutantes *hma5-1* y *hma5-2*, crecidas durante 8 días en medio MS que contenía Cu 0, 10, 20, 30, 40 o 50  $\mu\text{M}$  y con la correspondiente desviación estándar de tres experimentos independientes. **(B)** Efecto de la disponibilidad de diferentes iones metálicos en el peso fresco de los mutantes *hma5*. Valores promedio del peso fresco de 5 plántulas de las líneas control silvestre (WT) y mutantes *hma5-1* y *hma5-2*, crecidas durante 8 días en medio MS o en el mismo medio suplementado con Cu, Fe, Zn, Cd o Ag 30  $\mu\text{M}$  y con la correspondiente desviación estándar de tres experimentos independientes.

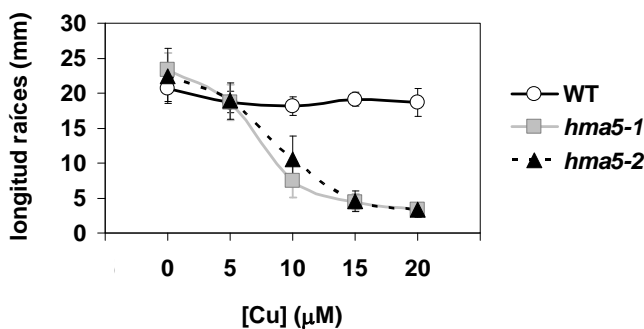
Dado que la expresión del gen *HMA5* se ha observado mayoritariamente en raíces (Figura R.2.3) y se ha descrito previamente asociada especialmente a las células del periciclo (Birnbaum *et al.*, 2003), se decidió investigar más detalladamente el efecto del Cu en el desarrollo de las raíces de los mutantes *hma5*. Como muestra la figura R.2.11 en su panel superior, la longitud de las raíces en plántulas de 8 días disminuye drásticamente en ambas líneas mutantes *hma5* respecto a la línea silvestre en presencia de Cu 20  $\mu$ M, mientras que no se observa un efecto significativo en el medio estándar de crecimiento en placa MS.



**Figura R.2.11.** Fenotipo de las raíces de las plántulas mutantes *hma5* en presencia de Cu. **Panel superior:** plántulas de las líneas control silvestres (WT) y mutantes *hma5-1* y *hma5-2* crecidas durante 8 días en medio MS o en el mismo medio suplementado con Cu 20  $\mu$ M. **Panel intermedio:** detalle del ápice de las raíces de las plántulas mostradas en el panel superior. **Panel inferior:** detalle de las raíces laterales emergiendo cerca de la corona de las mismas plántulas. Las fotos muestran ejemplares representativos de cada línea, a la misma escala.

El efecto del Cu sobre el crecimiento de las raíces de las líneas mutantes resulta evidente desde los primeros días de germinación de las semillas y las fases tempranas del desarrollo. En este periodo, el ápice de las raíces presenta un patrón de crecimiento sinusoidal, descrito como “ondulación de la raíz” (Buer *et al.*, 2003) y caracterizado por una alta frecuencia de ligeras curvaturas (Figura R.2.11, panel intermedio). Además, en plántulas mutantes de 8 días, el ápice de la raíz principal se ensancha y su crecimiento o elongación se detiene completamente, y las raíces laterales emergen cerca de la corona de las plántulas (Figura R.2.11, panel inferior).

Para cuantificar este efecto del Cu en el crecimiento de las raíces, se midió la longitud de las raíces a diferentes concentraciones de Cu en el medio (Sancenón *et al.*, 2004) (Figura R.2.12). Las diferencias entre los mutantes *hma5* y los controles silvestres son evidentes a partir de una concentración de Cu 10  $\mu\text{M}$ , mientras que a 20  $\mu\text{M}$  el crecimiento de las raíces de los mutantes *hma5* se detiene a una longitud de 3 mm.



**Figura R.2.12.** Cuantificación del efecto del Cu en el crecimiento de las raíces de las plántulas mutantes *hma5*. Longitud de las raíces de los mutantes *hma5* bajo condiciones de exceso de Cu. Valores promedio de la longitud de la raíz de 5 plántulas de las líneas control silvestre (WT) y mutantes *hma5-1* y *hma5-2*, crecidas durante 8 días en placas con medio MS suplementado con Cu 0, 5, 10, 15 o 20  $\mu\text{M}$  y con la correspondiente desviación estándar de tres experimentos independientes.

Esta hipersensibilidad específica al Cu en el medio se ha visto también en mutantes por pérdida de función de la ATPasa CopA en *E. coli* (Rensing *et al.*, 2000). Además, que la hipersensibilidad al Cu se haya observado con más relevancia en las raíces de los mutantes *hma5* (Figura R.2.11 y R.2.12), concuerda con el patrón de expresión del gen *HMA5* previamente observado (Figura R.2.3) y descrito como asociado a las células del periciclo de las raíces (Birnbaum *et al.*, 2003). El papel típico atribuido a las células diferenciadas del periciclo es la iniciación de las raíces laterales, lo cual es un clásico ejemplo de cómo la división se reinicia en células vegetales que han abandonado el ciclo celular. En este sentido, los defectos observados en el desarrollo de las raíces en las líneas mutantes *hma5* bajo un exceso de Cu (Figuras R.2.11, panel inferior) podrían reflejar la importancia del Cu en este proceso. Curiosamente, se ha visto que un gen implicado en el crecimiento direccional de las raíces, denominado *SKU5*, codifica una proteína similar a la ascorbato oxidasa, una típica oxidasa múltiple de Cu (Sedbrook *et al.*, 2002). Estas proteínas afectan tanto a la expansión celular (Smirnoff, 2000) como a la elongación celular (Kerk *et al.*, 2000), reforzando el papel de las proteínas de Cu en la morfología de las raíces y quizá explicando los cambios observados tempranamente en el desarrollo de las raíces en los mutantes *hma5* expuestos a un exceso de Cu (Figura R.2.11, panel intermedio). Por otro lado, hormonas tales como auxinas y etileno también se ha demostrado que tienen un papel importante en el desarrollo de las raíces (Malamy y Ryan, 2001), por ejemplo, se ha observado que el etileno interacciona en la modulación de la “ondulación de las raíces”. Dado que el Cu es un cofactor para la unión del etileno, se ha propuesto su participación en este proceso de modulación (Buer *et al.*, 2003). Así pues, no se puede descartar un efecto indirecto de estas hormonas en el fenotipo observado en las raíces de los mutantes *hma5* (Figura R.2.11), quizá debido a una defectuosa incorporación de Cu en el receptor del etileno o su implicación en la redistribución de auxinas (Malamy y Ryan, 2001).

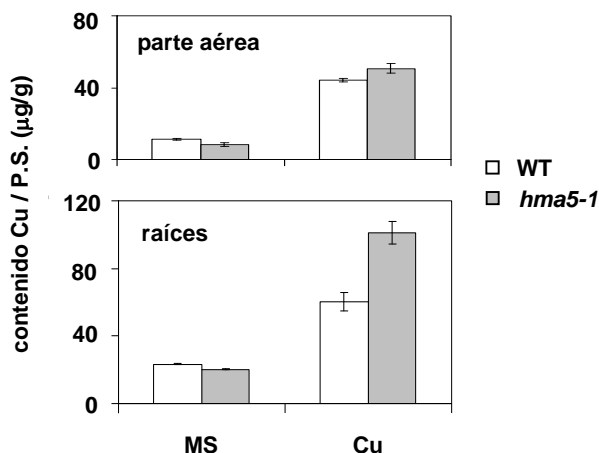
Es interesante destacar que, tanto la división y la elongación celular, como el transporte de auxinas, son procesos controlados por el ritmo circadiano (Harmer *et al.*, 2000). Por otra parte, se ha descrito una ATPasa de Cu en la glándula pineal y la retina de rata (PINA, del inglés *pineal night-specific ATPase*), que es una variante de la proteína de la enfermedad de Wilson. Dicha ATPasa PINA muestra una mayor expresión durante la noche, sugiriendo un papel del metabolismo rítmico del Cu en la función circadiana de la glándula pineal y/o la retina (Borjigin *et al.*, 1999). En este sentido, dado que el promotor de *HMA5* posee cajas reguladoras necesarias para una expresión circadiana (ver apartado 2.2.1 de Resultados y discusión), aunque se necesita la corroboración experimental de dicha expresión, *HMA5* podría provocar oscilaciones de Cu en el compartimento donde se localice. Estas oscilaciones podrían relacionar el metabolismo del Cu con el ritmo circadiano, tal y como se ha observado en el apartado 1.2.2.3 de Resultados y discusión.

#### 2.3.2.2. Análisis del contenido endógeno de cobre en plántulas

Para caracterizar con mayor detalle la respuesta de los mutantes *hma5* al Cu, se determinaron los niveles de Cu acumulados en la parte aérea y las raíces de plántulas de 8 días crecidas en ausencia y presencia de Cu 10  $\mu\text{M}$  en el medio estándar de crecimiento en placa MS (Figura R.2.13). No se observó ninguna diferencia significativa (significancia estadística < 90 %) en la concentración de Cu de las diferentes líneas crecidas en medio MS. Cuando el medio de crecimiento fue suplementado con Cu 10  $\mu\text{M}$ , la acumulación de Cu aumentó, tanto en las raíces, como en la parte aérea de las diferentes líneas. Pero, curiosamente, en este medio suplementado con Cu, el metal se acumula en mayor medida en las raíces del mutante *hma5* respecto a la línea silvestre (significancia estadística > 98 %), mientras que no se observa diferencia en la parte aérea entre las diferentes líneas (significancia estadística < 90 %). Los



niveles de otros metales, como el Fe, permanecen inalterados tanto en la línea silvestre como en las líneas mutantes (datos no mostrados).



**Figura R.2.13.** Niveles de Cu endógeno en las raíces y la parte aérea de las plántulas mutantes *hma5*. Cantidad de Cu, medida por espectroscopía de absorción atómica en cámara de grafito, en raíces y parte aérea de plántulas de las líneas control silvestres (WT) y mutante *hma5-1*, crecidas durante 8 días en medio MS o en el mismo medio suplementado con Cu 10 µM. Valores promedio para la parte aérea de medidas realizadas por triplicado a partir de dos experimentos independientes con sus respectivas desviaciones estándar; en el caso de las raíces, se han representado los valores promedio de los triplicados técnicos con sus respectivas desviaciones estándar a partir de un experimento representativo, aunque experimentos independientes confirman los datos representados.

Todo esto indica que la sensibilidad al Cu de las raíces de los mutantes *hma5* puede ser debida al incremento de la acumulación de Cu en las mismas, quizá por una exportación de Cu defectuosa bajo condiciones de exceso de Cu en el medio de crecimiento. La especial hipersensibilidad al Cu de las raíces de los mutantes *hma5* (Figura R.2.11 y R.2.12), unido al hecho de que las plántulas

mutantes *hma5* acumulan más Cu en las raíces (Figura R.2.13), indica la implicación de la proteína HMA5 en la detoxificación del Cu en las raíces de *Arabidopsis* mediante su exportación desde el citosol.

Por otro lado, se ha descrito en nuestro grupo de investigación que, la inhibición de la expresión del transportador de Cu de alta afinidad COPT1 en plantas antisentido provoca una elongación de las raíces que es revertida completa y específicamente por Cu (Sancenón *et al.*, 2004). El fenotipo descrito aquí para los mutantes *hma5* es el contrario al obtenido para estas plantas COPT1 antisentido: mientras las plantas COPT1 antisentido muestran una longitud incrementada de las raíces, los mutantes *hma5* manifiestan una parada del crecimiento de las mismas. Dado que se ha observado que COPT1 funciona en la adquisición de Cu a través de las raíces de *Arabidopsis* (Sancenón *et al.*, 2004), se podría interpretar que HMA5 participa en la función opuesta, exportando el Cu desde este órgano. Si las ATPasas tipo P transportadoras de Cu funcionan transportando Cu desde el citosol hacia el lumen de los compartimentos de secreción, como se ha demostrado para sus homólogos en levadura (Yuan *et al.*, 1995 y 1997) y humanos (Yamaguchi *et al.*, 1996; Hung *et al.*, 1997), HMA5 podría participar directamente en la eliminación de Cu en las plantas.

Curiosamente, algunas ATPasas tipo P de metales pesados parecen participar en la importación del metal (Solioz y Vulpe, 1996; Rutherford *et al.*, 1999; Husain *et al.*, 2004). Mutaciones en los genes que codifican para las proteínas de las enfermedades de Wilson (WND) y Menkes (MNK), dos ATPasas tipo P transportadoras de Cu identificadas en humanos, causan los respectivos síndromes relacionados con el metabolismo del Cu. Las proteínas mutantes de MNK y WND provocan síntomas aparentemente opuestos relacionados con la deficiencia de Cu y la toxicidad del Cu, respectivamente, debido a su patrón de expresión diferencial en los tejidos humanos (revisado por

Peña *et al.*, 1999; Suzuki y Gitlin, 1999). Sin embargo, se ha visto que ambas proteínas funcionan de manera similar recibiendo Cu de una carabina molecular citosólica y bombeando el Cu hacia el lumen de la red del trans-Golgi (Klomp *et al.*, 1997; Hung *et al.*, 1998). Además, bajo concentraciones supraóptimas de Cu, ambas proteínas redistribuyen el Cu desde la red del trans-Golgi hacia la superficie celular y las vesículas citoplasmáticas, donde funcionan para liberar a la célula del exceso de este metal (Petris *et al.*, 1996 y 2002; Hung *et al.*, 1997; Cobbold *et al.*, 2002; Pase *et al.*, 2004).

Hay datos en la literatura que indican que la planta tolerante al Cu *Silene vulgaris* muestra un aumento en la exportación de Cu dependiente de ATP a través de la membrana plasmática de las células de las raíces (Van Hoof *et al.*, 2001). Esta respuesta fisiológica ha sido reforzada por datos genéticos que indican que la inactivación insercional del gen *ActP*, que codifica una ATPasa de tipo P de la subfamilia P<sub>1B</sub>, genera hipersensibilidad al Cu en *Rhizobium leguminosarum* y *Sinorhizobium meliloti* (Reeve *et al.*, 2002). De modo similar, en células humanas, la sobreexpresión de la proteína MNK incrementa la exportación de Cu y confiere resistencia al Cu (Camakaris *et al.*, 1995). A pesar de las aplicaciones potenciales de las ATPasas tipo P transportadoras de metales que se deducen de estas observaciones, para tolerar altas concentraciones de metales y fitorremediar los suelos contaminados por metales o aliviar los desórdenes nutricionales fortificando las cadenas alimentarias, se conoce muy poco sobre su función en plantas. Nuestros resultados sugieren un modelo donde la ATPasa tipo P transportadora de Cu HMA5 funcione en la destoxicación de Cu en las raíces mediante su exportación al medio. En este sentido, los resultados apuntan a HMA5 como una proteína candidata para ser sobreexpresada con la finalidad de mejorar la destoxicación de Cu en las plantas bajo condiciones de exceso del metal, conduciendo a plantas tolerantes al Cu de uso potencial para procesos biotecnológicos.

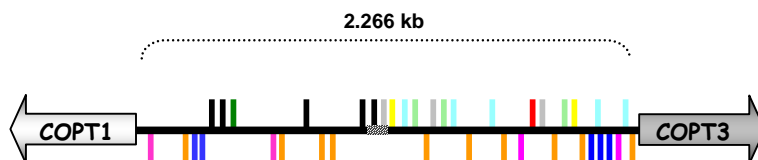


## **El transportador de cobre de alta afinidad COPT3**

### **3. EL TRANSPORTADOR DE COBRE DE ALTA AFINIDAD COPT3**

Una de las familias de transportadores que respondió en *Arabidopsis* a un déficit de Cu es la familia COPT de transportadores de Cu de alta afinidad (ver tabla R.1.1). Diferentes miembros de esta familia están implicados en el transporte de Cu a través de membranas (Sancenón *et al.*, 2003), cualidad que les hace ser posibles dianas de manipulación biotecnológica. Dentro de esta familia, COPT1 y COPT3, pertenecientes a la primera y segunda subfamilia COPT respectivamente, son los miembros con la mayor homología al transportador en levadura Ctr1 dentro de cada subfamilia (Sancenón *et al.*, 2003). COPT3 participa en el transporte de Cu *in vitro*, aunque muestra una menor tasa de complementación heteróloga de la deficiencia respiratoria del mutante nulo *ctr1Δctr3Δ* de levadura que el transportador COPT1 (Sancenón *et al.*, 2003). Además, COPT3 posee una sola caja de unión a Cu en su extremo amino, a diferencia de COPT1 que posee 2. Curiosamente, COPT1 y COPT3 se encuentran localizados contiguos en el cromosoma V del genoma de *A. thaliana* y están codificados en sentidos opuestos, por lo que podrían compartir elementos reguladores o competir parte de estos elementos entre ellos (Figura R.3.1).

Hasta la fecha, sólo existen datos sobre la caracterización funcional del miembro COPT1 en *Arabidopsis* (Sancenón *et al.*, 2004). En este apartado, se abordó un estudio preliminar del transportador COPT3, para esclarecer su función tanto a nivel celular como en la planta entera.



**Figura R.3.1.** Esquema de la región promotora de COPT1 y COPT3, y de sus elementos reguladores. Los elementos reguladores más relevantes están representados con rayas de colores (naranja, cajas de expresión en polen; rosa, cajas de expresión en embrión; verde claro, cajas de expresión en endospermo; amarillo, cajas de expresión en aleurona; rojo, cajas de expresión en plástidos; gris, cajas de regulación por deshidratación y desecación; azul claro, cajas de respuesta a luz; azul oscuro, cajas de respuesta a Cu; negro, cajas de expresión en raíz; verde oscuro, cajas de expresión en células guarda).

### 3.1. ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DEL GEN *COPT3* EN *Arabidopsis thaliana*

#### 3.1.1. Análisis teórico de la secuencia promotora de *COPT3*

En la secuencia de 1.4 kb de la región 5' de *COPT3* se han identificado una serie de posibles elementos *cis* reguladores de la transcripción (Figura R.3.2). Las posiciones relativas de los diferentes motivos descritos vienen indicadas respecto al inicio de la traducción (al que se le asigna la posición +1), dado que se carece de datos sobre el inicio de transcripción, al que normalmente se refieren las posiciones de las cajas promotoras.

#### Elementos generales de transcripción en plantas

En la posición -143 aparece una secuencia consenso CAAT, común en regiones 5' no codificantes de genes eucariotas (Shirsat *et al.*, 1989), y se identificó una posible caja TATA en la posición -71 (TAAATAC).

### Elementos específicos de órganos, tejidos y compartimentos

En las posiciones -31, -146, -303, -611, -787, -1077 y -1132 hay un motivo GTGA descrito en el promotor del gen g10 del polen del tabaco (Rogers *et al.*, 2001). Además, en la posición -10, -178, -297, -318, -397, -490, -496, -519, -808 -812, -823, -828, -1103 y -1113 se encuentra la secuencia AGAAA, descrita como uno de los dos elementos co-dependientes responsables de la activación específica en polen del gen lat52 de tomate (Bate y Twell 1998).

En las posiciones -58, -465 hay secuencias ACACNNG descritas en zanahoria (*Daucus carota*) como sitios de unión de los factores de transcripción DPBF1/2 (*Dc3 promoter-binding factor*). La expresión de Dc3 es específica de embriones y además puede ser inducida por ABA (Kim *et al.*, 1997). En la posición -90 hay un sitio AACCCA de unión para el factor 3 de embrión de soja (Allen *et al.*, 1989)

En la posición -229, -1026, -1199 y -1277 hay un elemento TGHAAARK de expresión específica en endospermo de trigo (Colot *et al.*, 1987; Thomas y Flavell 1990).

En la posición -216 y -1279 hay una sitio CCTTTT de unión del factor transcripcional BPBF involucrado en la regulación de genes de respuesta a giberelinas en la aleurona de la cebada (Mena *et al.*, 2002).

En la posición -389 hay una caja S1F (ATGGTA) conservada en los genes de espinaca RPS1 y RPL21 que codifican la proteína ribosomal de plástido S1 y L21, respectivamente (Zhou *et al.*, 1992; Lagrange *et al.*, 1993).

### Elementos de regulación por deshidratación y desecación

En la posición -316 y -1325 hay un sitio WAACCA (W=A/T) de reconocimiento por Myb descrito en el promotor del gen rd22 de respuesta a deshidratación y en muchos otros genes de *Arabidopsis* (Abe *et al.*, 2003)



En la posición -1036 hay un sitio de reconocimiento por AtMyb2 (TAACTG). AtMyb2 está involucrado en la regulación por desecación (Urao *et al.*, 1993).

#### Elementos de regulación por luz y ritmo circadiano

Además, en la posición -140, -245, -549, -647, -655, -958, -1227 y -1311 hay cajas *I-box* (GATAA) conservada en genes regulados por luz (revisado en Terzaghi y Cashmore, 1995a y 1995b). Esta caja *I-box* es sitio de unión de LeMyb1, que actúa como activador transcripcional (Rose *et al.*, 1999).

En la posición -42 hay una región CAANNNNATC necesaria para la expresión circadiana del gen Lhc de tomate. En las posiciones -16 y -184 hay elementos AAAATATCT, denominados *Evening element*, que se han encontrado 46 veces en los promotores de 31 genes cíclicos de *A. thaliana* (Harmer *et al.*, 2000) y en el promotor del gen de *Solanum melongena* que codifica para una cisteína proteasa (Rawat *et al.*, 2005). Este elemento se requiere para el control circadiano de la expresión génica.

Resulta de interés la presencia de cajas necesarias para la expresión circadiana en el promotor de este transportador de Cu, dada la posible implicación de este metal en la regulación del ritmo circadiano (ver apartado 1.2.2.3 de Resultados y discusión).

#### Elementos de respuesta a Cu

En las posiciones -109, -116 y -170 hay 3 elementos CuRE (GTAC) de respuesta al déficit de Cu, previamente descritos en los promotores de los genes *Cpx1*, *Cyc6* y *Crd1* de *C. reinhardtii*. Estos elementos son sitios diana para el factor transcripcional CRR1 (Quinn *et al.*, 2002). La presencia de estos elementos GTAC sugieren una posible regulación positiva del transportador COPT3 en deficiencia de Cu.

```

-1351 CATAATGTTG ATGTGTTATT ATAAGGTTGG TTTGTTGAAT GATAACATTA ATAATGAACC
-1291 GCTAAAATAC GGCCTTTTAC ATGTTCTTCA TTCAAGGCTT AGTTTACAAA AAGTTTTATA
-1231 ATATTTATCG ATTGGACTAT TGTTTCCGTG TGAAAAATC TAACGGCTAC ATAGTAGTTT
-1171 TATTTGTCAT ATCAAATACT GAAGCATGTC AATATGTCAT CACTGTCCAT AATCTTGTTT
-1111 TCTTGGATTT TCTTAAATAAA TTATTTGTTT CCTTTCACAA ACAGTATTGT TTCATAGACA
-1051 AATTGTATGT TCTGTCAGTT AGCATGAAAA ATTGTATGTT AGTCTACAAA ATAAATCTAA
-991 TAGATTCAAA CATTATAGTT TACTAAAAAA AAAAGATAAAG AAAACATAG GAGCTTTGCC
-931 AATTATTGAA GCAGAGATAT CTGATTGATT GATTAGTTTA AAACTTAACT ACGATTGAAT
-871 AAAGGAACAA CACAAAAGAT ATCGATGACG ACCAGATACC ACAAGAAAAG AAAAGATCAA
-811 GAAAGAAAGAGA AGAAGATATT TGATGTGAGG TCATAAAAAGA GACGTATTAT TATATGGACT
-751 TTCCAAAAAT ACATCGTAAA CATTACGTTG ACGAAACTCA TTCAGGCGAA CGATTACGTC
-691 TGACACCGTT CGAGGGTTTA TTGGCATTTA TTTACTTTAT CCATGATAA ATCTAAATTG
-631 AGTAAATTGA ATTTTGGCCT GTGAGGTTAA TAATGATTAA GAAGGTAATT GTATGTTGTT
-571 GTTTTTTTTT TACTATGGAA CGGATAACAA AAAAAATATT GGGCTTGTTT AAAGAAATTG
-511 TCAATGACTC TGGATTCTTT TTTTCTCAGT CCAATGGCATA AAAATACCAG TGTTTATAAA
-451 AAAATTGAGC CCATAACAAA GCTGTGTTTT TTTTGAACAC GCCCATAACA AACTTTCTA
-391 ATTACCATTT TACGACCATA TTAATAACAA ATATTAGGAT TTTTTTTTTT AATTTGCTTT
-331 TAACAGTCAA GCTAGAAACC AGACGAAATC ACAGTCTTTA GTCAAAAACA ATATAAAAAA
-271 AAAGATTCTA GATTTTTTCA GCTTTGGATA ATTTACTTTT TCAATTTTAA GACTTAAAAG
-211 GAACAGATCT TTGGACATAA TCTCAACAAA ATATCTTTGA AGTACACTTT TAAACTCTAA
-151 TAAAATCACA ATTATCGCAT TATTGTTGTA AAAATGTACA TTGTACTTACA CACCAAACTC
-91 CACCCCAAAA ACAAAACCT TATAAATACA CACACACAG TATACACAC AACAAAACTC
-31 TCACATTGCA CGTAAAAAAT ATCTTTTATAC AATG

```



**Figura R.3.2.** Secuencia de nucleótidos de la región promotora de *COPT3* y de sus elementos reguladores. Las cifras indican las posiciones relativas referidas al primer nucleótido del codón de inicio, al que se le asigna la posición +1. Los elementos reguladores más relevantes están representados con colores (naranja, cajas de expresión en polen; rosa, cajas de expresión en embrión; verde, cajas de expresión en endospermo; amarillo, cajas de expresión en aleurona; rojo, cajas de expresión en plástidos; gris, cajas de regulación por deshidratación y desecación; azul claro, cajas de respuesta a luz y ritmo circadiano; azul oscuro, cajas de respuesta a Cu). La caja TATA está indicada en negrita, la caja CAAT subrayada y el inicio de la traducción con una flecha.

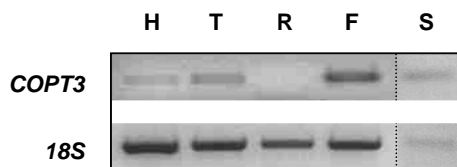
### 3.1.2. Estudio del patrón de expresión del gen *COPT3* por órganos

Los niveles globales de expresión de *COPT3* son muy bajos durante todo el ciclo de vida de la planta en comparación al resto de miembros de la familia COPT, según muestra la base de datos *Genevestigator* (<https://www.genevestigator.ethz.ch/at/>).

Con la finalidad de determinar dónde se expresa mayoritariamente el transportador *COPT3* en la planta, se realizó un ensayo de RT-PCR

semicuantitativa con oligonucleótidos específicos (ver tabla M.2) a partir de RNA de diferentes órganos de planta adulta. El resultado indica que *COPT3* se expresa principalmente en flores y a un menor nivel en tallos (Figura R.3.3). También se detecta algo de expresión en hojas, pero en raíces es indetectable. Este resultado concuerda con los valores de expresión indicados en la base de datos *Genevestigator* (<https://www.genevestigator.ethz.ch/at/>).

Dada la expresión mayoritaria de *COPT3* en flores y la presencia en su promotor de cajas teóricas de expresión en embrión, se decidió determinar si dicha expresión se mantendría en el estado de semilla. A pesar de que no hemos sido capaces de obtener muestras de RNA de semillas con alta concentración de RNA, la figura R.3.3 muestra que los niveles de expresión de *COPT3* en semillas son similares a los de flores, respecto a una misma cantidad de RNA total.



**Figura R.3.3.** Patrón de expresión por órganos de *COPT3*. Productos de RT-PCR a partir de RNA total de hojas (H), tallos (T), raíces (R), flores (F) de plantas adultas y semillas (S). Los niveles de rRNA del gen *18S* se muestran como control de carga.

Los datos aquí obtenidos podrían indicar una posible función de *COPT3* en el transporte de Cu en flores y semillas. En cualquier caso, sería necesario un estudio más detallado de la expresión del gen *COPT3* mediante su fusión al gen testigo *GUS* ( $\beta$ -glucuronidasa), para poder determinar con exactitud el patrón espacial de expresión de este transportador en la planta.

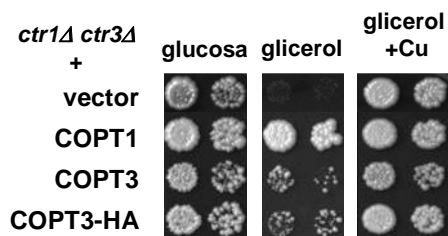
## 3.2. CONSTRUCCIÓN DE LAS FUSIONES UTILIZADAS PARA LA CARACTERIZACIÓN DE COPT3

### 3.2.1. Fusión *CaMV35S::COPT3-HA*

Para la localización subcelular y la sobreexpresión del transportador COPT3 en *Arabidopsis*, la estrategia utilizada consistió en etiquetar el extremo carboxilo del gen con el epítipo HA e introducir la fusión *COPT3-HA* bajo el control del promotor constitutivo del gen *CaMV35S*, (ver apartado 2.3.2 de Materiales y métodos). Esta estrategia permitió más adelante la selección de las plantas transgénicas sobreexpresoras de COPT3, mediante la detección de la proteína etiquetada por *Western blot*.

Antes de transformar las plantas con esta construcción, se comprobó si la proteína, una vez fusionada al epítipo HA, mantenía su capacidad de transportar Cu *in vivo*, mediante complementación funcional en un sistema heterólogo como la levadura *S. cerevisiae* (Figura R.3.4). La cepa utilizada para el ensayo fue el mutante nulo para los homólogos en levadura *ctr1Δctr3Δ*. La fusión *COPT3-HA* y los genes *COPT1* y *COPT3* (controles positivos) fueron expresados en levadura, bajo el control del promotor constitutivo del gen *GPD* en el vector p426GPD (Mumberg *et al.*, 1995) (ver apartado 2.3.4 de Materiales y métodos). Los transformantes crecieron en presencia de glucosa, demostrando que estaban transformados con el vector (Figura R.3.4, glucosa). La falta de crecimiento en ausencia de Cu (Figura R.3.4, glicerol) del mutante que contiene únicamente el vector p426GPD (control negativo) fue revertida al transformarlo con el mismo vector expresando los genes *COPT1* y *COPT3* (controles positivos). Como ya se había descrito previamente, la capacidad de complementación de COPT3 es menor que la de COPT1 (Sancenón *et al.*, 2003). Además, la adición de Cu complementa funcionalmente la deficiencia

respiratoria de la cepa (Figura R.3.4, glicerol + Cu). La fusión de interés COPT3-HA complementó el defecto de crecimiento de la cepa mutante de levadura en diferentes medios de manera similar al control positivo COPT3 (Figura R.3.4), indicando que el epítipo no interfiere en la función de la proteína COPT3 en el transporte de Cu en levadura.



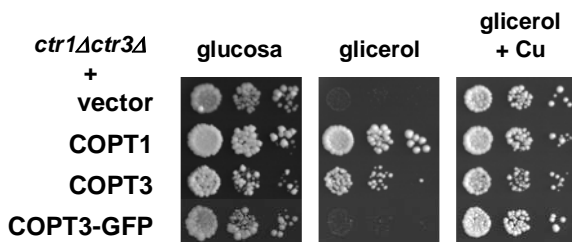
**Figura R.3.4.** Funcionalidad de la construcción COPT3-HA en levadura. Complementación del mutante *ctr1Δctr3Δ* de *S. cerevisiae* con el control negativo (vector p426GPD vacío), los controles positivos (COPT1 y COPT3 en el vector p426GPD) y la construcción de interés (COPT3-HA en el vector p426GPD). Los medios utilizados fueron SC-ura (glucosa) e YPG (glicerol) suplementado o no con Cu 100  $\mu$ M.

### 3.2.2. Fusión *CaMV35S::COPT3-GFP*

Otra de las estrategias utilizadas para la localización subcelular del transportador COPT3 en *Arabidopsis*, consistió en la fusión del gen testigo *GFP* al gen de interés (ver apartado 2.3.3 de Materiales y métodos).

Al igual que en el punto anterior, para comprobar si la construcción obtenida era funcional, se llevó a cabo un estudio de la capacidad de la construcción *COPT3-GFP* para complementar mutantes de levadura (Figura R.3.5). En este caso, la fusión de interés COPT3-GFP no complementó el defecto de crecimiento de la cepa mutante de levadura en deficiencia de Cu

(Figura R.3.5). Este resultado indica que la GFP puede estar interfiriendo en la función de COPT3 en levadura, aunque no necesariamente en la planta, por tratarse de sistemas biológicos diferentes.



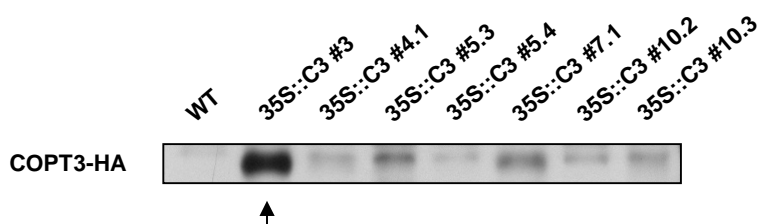
**Figura R.3.5.** Funcionalidad de la construcción COPT3-GFP en levadura. Complementación del mutante *ctr1Δctr3Δ* de *S. cerevisiae* con el control negativo (vector p426GPD vacío), los controles positivos (COPT1 y COPT3 en el vector p426GPD) y la construcción de interés (COPT3-GFP en el vector p426GPD). Los medios utilizados fueron SC-ura (glucosa) e YPG (glicerol) suplementado o no con Cu 100  $\mu$ M.

### 3.3. LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE COPT3 EN *Arabidopsis thaliana*

#### 3.3.1. Inmunolocalización mediante el epítipo HA

Debido a las diferencias mostradas respecto a COPT1, se había postulado que COPT3 podría estar localizado en membranas intracelulares (Sancenón *et al.*, 2003). La membrana destino para la inserción de COPT3 podría ser la cloroplástica, dada la presencia de una caja teórica de expresión en plástidos en el promotor del gen *COPT3* (ver figura R.3.2) y la existencia de una posible secuencia señal de localización en el cloroplasto predicha teóricamente (*PSORT*

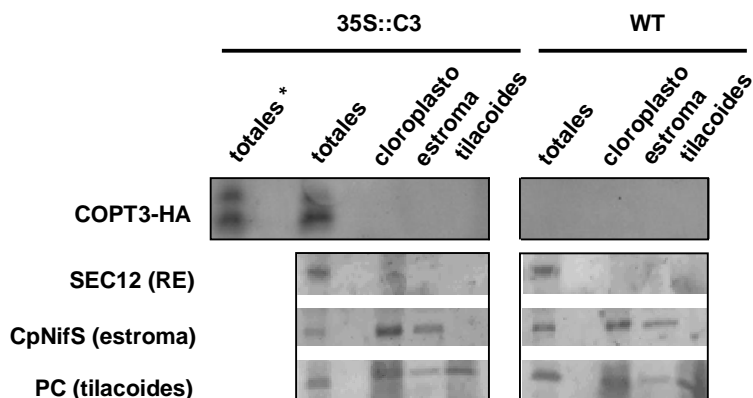
*Prediction of Protein Localization Sites version 6.4*, <http://psort.nibb.ac.jp/form.html>). A partir de estos datos, se decidió comprobar la localización del transportador COPT3 en cloroplastos. Dicho análisis se realizó mediante inmunolocalización gracias a la fusión *CaMV35S::COPT3-HA* (35S::C3). Para ello, se transformaron de manera estable plantas de *Arabidopsis* con la construcción *CaMV35S::COPT3-HA* mediante *Agrobacterium tumefaciens* (ver apartado 1.3.2 de Materiales y métodos) y se seleccionó la línea con mayor nivel de proteína etiquetada COPT3-HA por *Western blot* con anticuerpos comerciales frente al epítipo HA (ver apartado 3 de Materiales y métodos) (Figura R.3.6).



**Figura R.3.6.** Niveles de HA en las plantas sobreexpresoras de *COPT3*. *Western blot* de COPT3-HA mediante anticuerpo comercial anti-HA a partir de extractos proteicos totales de hojas de las líneas silvestre (WT) y transgénicas (35S::C3). La flecha indica la línea seleccionada.

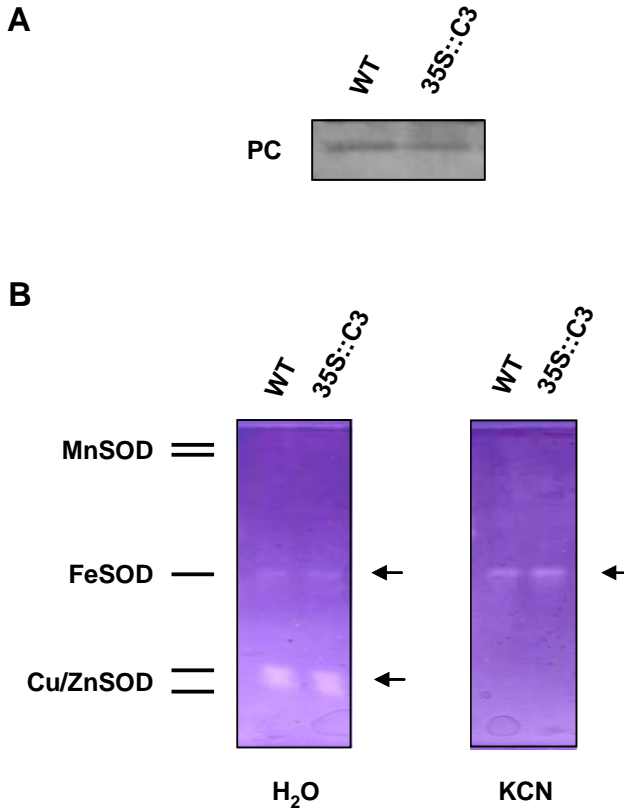
A partir de la línea transgénica seleccionada, se obtuvieron extractos proteicos totales, de cloroplasto, y de diferentes fracciones cloroplásticas como el estroma y los tilacoides (ver apartado 3.1 de Materiales y métodos). La presencia de la proteína etiquetada COPT3-HA en los diferentes extractos se determinó mediante *Western blot* (ver apartado 3.2 y 3.3 de Materiales y métodos) (Figura R.3.7, panel superior). Se utilizaron como controles, anticuerpos frente a distintas proteínas consideradas marcadores de localización

como la plastocianina en el lumen de los tilacoides (aunque durante el proceso de fraccionamiento, si se rompen los sacos granales, puede contaminar la fracción de estroma), CpNifS en el estroma y SEC12 en el retículo endoplasmático (ver tabla M.7) (Figura R.3.7, paneles inferiores). La proteína etiquetada COPT3-HA sólo pudo ser detectada en el extracto total, al igual que la proteína SEC12 localizada en el retículo endoplasmático. Para desechar la posibilidad de que el epítipo se hubiera degradado debido al tampón utilizado para aislar los cloroplastos, se comprobó su detección en un extracto proteico total mantenido en dicho tampón durante todo el proceso (Figura R.3.7, panel superior).



**Figura R.3.7.** Inmunolocalización de la proteína COPT3. **Panel superior:** *Western blot* de COPT3-HA mediante anticuerpo comercial anti-HA a partir de extractos proteicos totales, de cloroplasto y de diferentes fracciones cloroplásticas como el estroma y los tilacoides, para las líneas silvestre (WT) y transgénica (35S::C3). El asterisco (\*) indica que dicho extracto se ha mantenido en el tampón de aislamiento de cloroplastos durante todo el proceso de fraccionamiento. **Paneles inferiores:** *Western blot* mediante anticuerpos frente a SEC12, CpNifS y PC, como marcadores de retículo endoplasmático (RE), estroma y tilacoides, respectivamente, a partir de las mismas muestras que en el panel superior.





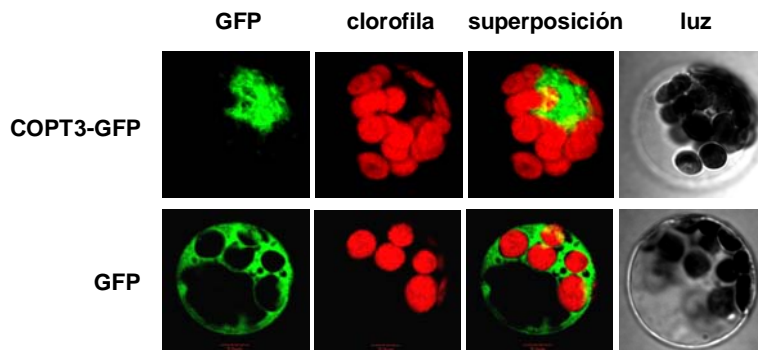
**Figura R.3.8.** Análisis de la plastocianina y de las actividades SOD en las plantas sobrepresoras de *COPT3*. **(A)** *Western blot* de plastocianina a partir de extractos proteicos totales de hojas de las líneas silvestre (WT) y transgénica (35S::C3). Condiciones no desnaturalizantes. PC, plastocianina. **(B)** Geles de actividad SOD. Geles de proteínas no desnaturalizantes a partir de extractos proteicos totales de hojas de las líneas silvestre (WT) y transgénica (35S::C3), teñidos para observar la actividad SOD (bandas claras, señaladas con flechas). Los geles se preincubaron con el inhibidor KCN de la Cu/ZnSOD (derecha) o H<sub>2</sub>O (izquierda).

Por otro lado, dado que la construcción *CaMV35S::COPT3-HA* utilizada estaría sobrexpresando el transportador de Cu de alta afinidad COPT3, si COPT3 se encontrara localizado en el cloroplasto, podría alterar la cantidad o actividad de otras cuproproteínas cloroplásticas en la línea transgénica obtenida. Para testar dicha posibilidad, se analizó la cantidad de plastocianina mediante *Western blot* (ver apartado 3 de Materiales y métodos) y la actividad de algunas de las cuproproteínas cloroplásticas como la Cu/ZnSOD y la FeSOD mediante ensayos en gel de proteínas (ver apartado 4.3 y 4.4 de Materiales y métodos) (Figura R.3.8). Ninguna de las cuproproteínas analizadas mostró una cantidad o actividad alterada en la línea sobrepresora de *COPT3* respecto a la línea silvestre, ya que la intensidad de las bandas obtenidas para cada una de las proteínas fue similar en ambas líneas analizadas.

Tomados conjuntamente, estos resultados indican que el transportador COPT3 no se encuentra localizado en el cloroplasto.

### **3.3.2. Localización subcelular mediante el gen testigo *GFP***

Con la finalidad de determinar la localización del transportador COPT3 dentro de la célula, se procedió a la transformación transitoria de protoplastos de *Arabidopsis* con la construcción *CaMV35S::COPT3-GFP* (ver apartado 1.3.3 de Materiales y métodos). El vector p35Ω-sGFP(S65T) vacío, usado para la construcción de interés, fue utilizado como control positivo de la señal GFP localizada en el citosol. La señal correspondiente a la construcción *CaMV35S::COPT3-GFP* se detectó en una zona no identificada dentro del citosol que podría corresponder a algún compartimento de la ruta de secreción (Figura R.3.9).



**Figura R.3.9.** Localización subcelular de COPT3. Protoplastos aislados de *Arabidopsis* transformados con la construcción de interés *COPT3-GFP* o con el gen *GFP* sin fusionar (control positivo en el citosol). Se muestra la fluorescencia verde (530 nm) y roja (660 nm) indicativa de la localización de la proteína GFP y la clorofila respectivamente, la superposición de ambas y el campo de luz. Las fotos muestran ejemplares representativos de cada transformación, a la misma escala.

Este resultado demuestra que el transportador COPT3 no se encuentra en cloroplastos, corroborando los datos obtenidos en el apartado anterior, y sugiere una posible localización del mismo en la ruta de secreción. Por otro lado, esta localización intracelular del transportador COPT3 explicaría el menor grado de complementación del correspondiente mutante en levadura respecto a COPT1 (Sancenón *et al.*, 2003). Sin embargo, dado que la construcción utilizada no complementa el correspondiente mutante en levadura (Figura R.3.5), el resultado obtenido de localización subcelular mediante el gen testigo *GFP* no es concluyente.

Se ha descrito la localización intracelular de transportadores de Cu homólogos en levadura, como Ctr2 y Ctr6, que se encuentran en el tonoplasto, donde funcionan movilizándolo desde las vacuolas (Bellemare *et al.*, 2002;

Rees *et al.*, 2004). También se ha localizado un homólogo en humanos, hCtr2, en los endosomas tardíos y lisosomas (Van Den Berghe *et al.*, 2007). Además, los transportadores de metales divalentes NRAMP3/4 (del inglés *natural resistance associated macrophage protein*), que participan en la distribución intracelular de Fe, han sido localizados en la vacuola de semillas de *Arabidopsis*, donde participan en la movilización de las reservas de Fe (Thomine *et al.*, 2003; Lanquar *et al.*, 2005).

Dado que los transportadores COPT generan un flujo de Cu hacia el citosol (revisado en Puig *et al.*, 2007a), una localización del transportador COPT3 en la ruta de secreción podría significar su participación en la recuperación de Cu de esta ruta para su utilización en el citosol.

### **3.4. ESTUDIO DE LA FUNCIÓN DE COPT3 EN *Arabidopsis thaliana* MEDIANTE SU SOBREPRESIÓN**

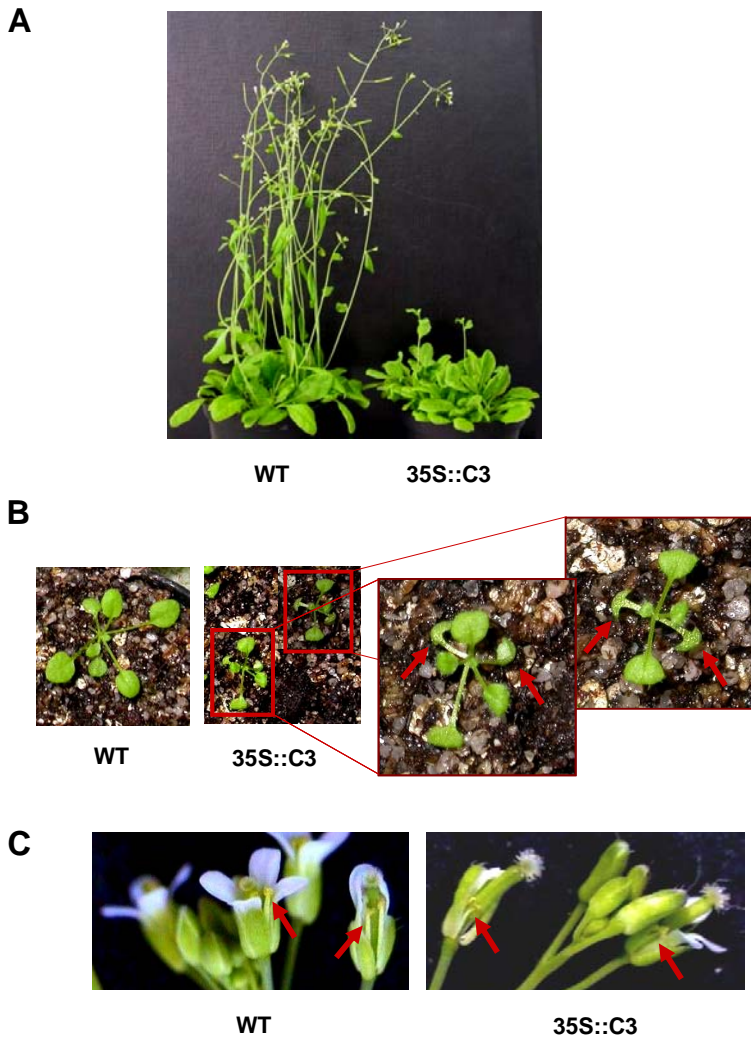
#### **3.4.1. Obtención de líneas transgénicas sobrepresoras de *COPT3* mediante el promotor constitutivo del gen *CaMV35S***

La función del transportador de Cu de alta afinidad COPT3 en la planta entera es desconocida. Con el objetivo de determinar su función, se generaron plantas transgénicas sobrepresoras de *COPT3*, gracias a la construcción *CaMV35S::COPT3-HA*. Estas plantas transgénicas fueron las mismas que las utilizadas para la inmunolocalización del transportador (ver apartado 3.3.1 de Resultados y discusión).

### **3.4.2. Caracterización fenotípica de las líneas transgénicas sobreexpresoras de *COPT3***

#### *3.4.2.1. Descripción del fenotipo en sustrato vegetal*

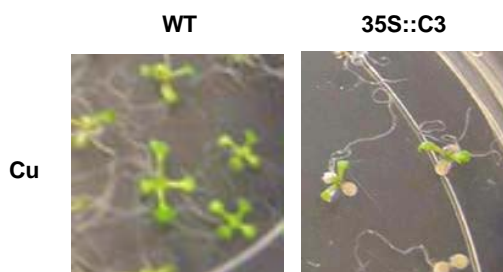
Las plantas transgénicas obtenidas muestran un retraso general acusado en su desarrollo. Bajo condiciones estándar de crecimiento en sustrato vegetal, estas plantas en estado adulto (4 semanas de edad) apenas han empezado a desarrollar sus brotes, mientras que las plantas silvestres han alcanzado el estado de floración y fructificación (Figura R.3.10.A). En plantas de 2 semanas de edad, el diferente número de hojas en la roseta entre las plantas transgénicas y las silvestres también indica este retraso en el desarrollo (Figura R.3.10.B). Un estudio más detallado permitió observar una curvatura característica de los cotiledones, que los enrosca hacia el suelo y en una disposición que hemos denominado “forma caída” (Figura R.3.10.B). Además, es interesante observar que en las flores, órgano donde *COPT3* se expresa abundantemente (ver apartado 3.1.2 de Resultados y discusión), los estambres no alcanzan su longitud habitual (Figura R.3.10.C). Este mismo fenotipo ha sido observado en diferentes líneas independientes sobreexpresoras de *COPT3* (datos no mostrados). La expresión ectópica del transportador, y quizá la consecuente modificación de los niveles intracelulares de Cu, podría ser la responsable del fenotipo observado.



**Figura R.3.10.** Fenotipo de las plantas sobrepresoras de *COPT3* en sustrato vegetal. **(A)** Plantas de las líneas silvestre (WT) y transgénica (35S::C3) crecidas durante 4 semanas. **(B)** Plantas de las líneas silvestre (WT) y transgénica (35S::C3) crecidas durante 2 semanas. Una visión detallada de las plantas transgénicas se destaca en la figura. Las flechas señalan los cotiledones con la curvatura característica. **(C)** Flores de las líneas silvestre (WT) y transgénica (35S::C3). Las flechas señalan los estambres. Todas las fotos muestran ejemplares representativos de cada línea, a la misma escala.

### 3.4.2.2. Estudio de la sensibilidad al cobre

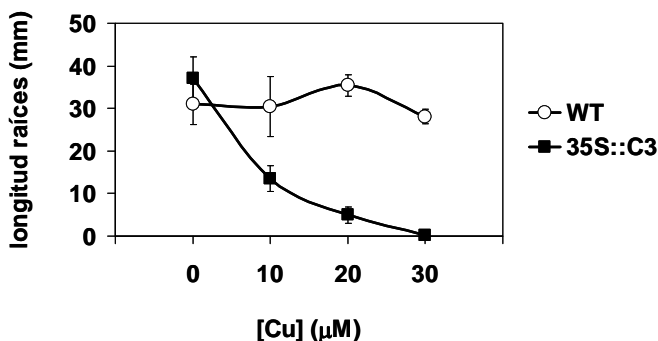
Con el objetivo de determinar la sensibilidad al Cu en el medio de las plantas sobrepresoras de *COPT3*, se hicieron crecer en el medio estándar de crecimiento en placa MS con una concentración de Cu 10  $\mu$ M. Los cotiledones desarrollados en las plantas transgénicas en presencia del exceso de Cu son cloróticos (Figura R.3.11). Sin embargo, estas mismas plantas fueron capaces de desarrollar las primeras hojas verdaderas que, aunque no mostraban clorosis, tenían un aspecto alargado y enroscado. Estas plantas transgénicas no pudieron sobrevivir una vez alcanzado este estado del desarrollo.



**Figura R.3.11.** Fenotipo de las plántulas sobrepresoras de *COPT3* en presencia de Cu. Plántulas de las líneas silvestre (WT) y transgénica (35S::C3) crecidas en medio MS o en el mismo medio suplementado con Cu 10  $\mu$ M. Las fotos muestran ejemplares representativos de cada línea, a la misma escala.

Para cuantificar la sensibilidad al Cu en el medio de estas plantas, se midió la longitud de las raíces (Sancenón *et al.*, 2004; Andrés-Colás *et al.*, 2006). En plántulas crecidas durante 8 días, la longitud de las raíces se redujo un 50 % en la línea sobrepresora de *COPT3* a una concentración de Cu 10  $\mu$ M respecto al medio MS. Además, el crecimiento de la raíz de estas plantas

transgénicas se inhibió casi por completo a una concentración de Cu 30  $\mu\text{M}$ , mientras que no se observaba ningún efecto significativo en las raíces de plantas silvestres en las mismas condiciones (Figura R.3.12).



**Figura R.3.12.** Cuantificación del efecto del Cu en el crecimiento de las raíces de las plántulas sobreexpresoras de *COPT3*. Valores promedio de la longitud de la raíz de 5 plántulas de las líneas silvestre (WT) y transgénica (35S::C3) crecidas durante 8 días en medio MS suplementado con Cu 0, 10, 20 o 30  $\mu\text{M}$  y con la correspondiente desviación estándar de tres experimentos independientes.

En conjunto, estos resultados demuestran que las plantas de *Arabidopsis* sobreexpresoras de *COPT3* son hipersensibles al Cu.

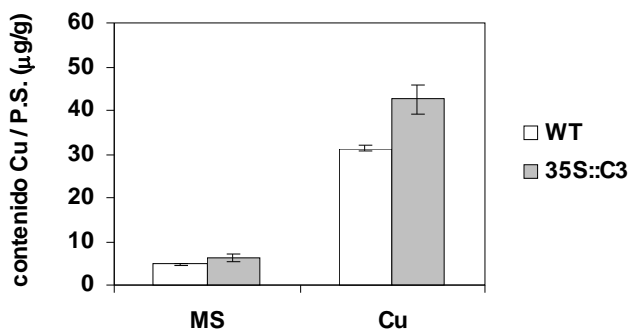
El hecho de que *COPT3* se exprese mayoritariamente en flores y semillas (ver apartado 3.1.2 de Resultados y discusión), apunta a un papel del mismo en la movilización del Cu en la fase reproductiva. Dado que los cotiledones se desarrollan a partir de los nutrientes almacenados en las semillas, el fenotipo clorótico característico de las plantas sobreexpresoras de *COPT3* podría implicar el efecto tóxico del Cu en estos órganos.



### 3.4.2.3. Análisis del contenido endógeno de cobre en plántulas y semillas

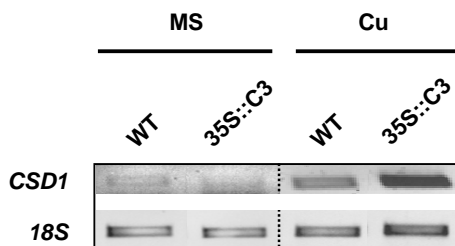
Para determinar si el fenotipo observado en la línea transgénica es debido a una alteración de los niveles intracelulares de Cu en la planta, y evaluar así la participación de COPT3 en el transporte de Cu en *Arabidopsis*, se midió el contenido en Cu en esta línea mediante absorción atómica.

Por una parte, se compararon plántulas de la línea transgénica con la silvestre, en medio estándar de crecimiento en placa MS y en el mismo medio suplementado con Cu 10  $\mu$ M, donde se observó el fenotipo descrito en el apartado anterior. La figura R.3.13 muestra que, en el medio con un exceso de Cu, la concentración de Cu es mayor en la línea sobrepresora de *COPT3* que en la silvestre, lo que podría explicar la sensibilidad de esta línea transgénica al Cu en el medio.



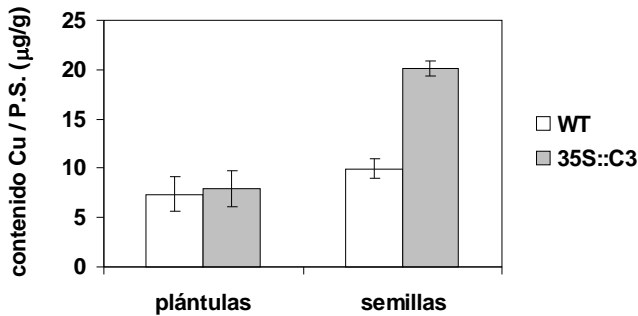
**Figura R.3.13.** Niveles de Cu endógeno en las plántulas sobrepresoras de *COPT3*. Cantidad de Cu, medida por espectroscopía de absorción atómica en cámara de grafito, en plántulas de las líneas silvestre (WT) y transgénica (35S::C3), crecidas durante 8 días en medio MS o en el mismo medio suplementado con Cu 10  $\mu$ M. Valores promedio de medidas realizadas por triplicado a partir de dos experimentos independientes con sus respectivas desviaciones estándar.

Con la finalidad de apoyar este resultado, se analizó la expresión de un gen indicador del exceso de Cu en el interior celular como *CSD1* (ver apartado 1 de Resultados y discusión) en la línea transgénica respecto a la silvestre, por RT-PCR semicuantitativa. Dicho gen indicador se expresó mayoritariamente en presencia de Cu en el medio, especialmente en la línea sobrepresora de *COPT3* (Figura R.3.14). Este resultado corrobora la concentración de Cu en plántulas detectada anteriormente por absorción atómica.



**Figura R.3.14.** Niveles de expresión del gen *CSD1* como indicador de la cantidad de Cu, en las plantas sobrepresoras de *COPT3*. Productos de RT-PCR a partir de RNA total de plántulas de las líneas silvestre (WT) y transgénica (35S::C3) crecidas durante 8 días en medio MS o el mismo medio suplementado con Cu 10  $\mu$ M. Los niveles de rRNA del gen *18S* se muestran como control de carga.

Por otra parte, se analizó la concentración de Cu en las semillas, uno de los órganos de expresión de *COPT3* (ver apartado 3.1.2 de Resultados y discusión), observando el doble de Cu en las semillas transgénicas que en las silvestres, mientras que no se observan diferencias en la concentración de Cu de plántulas crecidas durante 8 días en medio estándar de crecimiento en placa MS (Figura R.3.15).



**Figura R.3.15.** Niveles de Cu endógeno en las plántulas y semillas sobrexpresoras de *COPT3*. Cantidad de Cu, medida por espectroscopía de absorción atómica en cámara de grafito, en semillas y plántulas crecidas durante 8 días en medio MS, para las líneas silvestre (WT) y transgénica (35S::C3). Valores promedio de medidas realizadas por triplicado a partir de dos experimentos independientes con sus respectivas desviaciones estándar.

En definitiva, estas plantas sobrexpresoras de *COPT3* son acumuladoras de Cu principalmente en semillas y en presencia de un exceso de Cu en el medio. Este hecho, junto a los resultados previamente obtenidos sobre el patrón de expresión y localización del transportador, sugieren que *COPT3* podría ejercer su función en las flores, recuperando el Cu de la ruta de secreción para su almacenamiento en compartimentos de reserva en las semillas de *Arabidopsis*. Esta función sería similar a la realizada por las proteínas NRAMP3/4, pero siendo el Cu en vez del Fe el metal transportado y la ruta de secreción en vez de la vacuola el lugar desde el que lo moviliza (Thomine *et al.*, 2003; Lanquar *et al.*, 2005). La sobrexpresión de los transportadores de metales divalentes NRAMP3/4 también genera hipersensibilidad y acumulación de metales (Thomine *et al.*, 2000). Por lo tanto, la acumulación de Cu en las semillas de plantas sobrexpresoras de *COPT3* parece ser la responsable del

fenotipo observado anteriormente bajo un exceso de Cu, que agrave la alteración de los niveles intracelulares del metal. Además, esta acumulación de Cu en las semillas parece extenderse a la plántula entera, cuando se hacen crecer en medio con un exceso de Cu.

Por otra parte, si COPT3 recupera Cu de la ruta de secreción y, como se ha descrito en el análisis teórico de su promotor, COPT3 tuviera un patrón de expresión circadiano, el compartimento donde COPT3 se localiza, podría sufrir oscilaciones rítmicas en el contenido en Cu. Estas oscilaciones de Cu podrían ser las responsables de la interacción observada entre ritmo circadiano y Cu en las primeras fases del desarrollo en *Arabidopsis* (ver apartado 1.2.2.3 de Resultados y discusión).

## **El transportador de cobre de alta afinidad COPT1**

#### **4. EL TRANSPORTADOR DE COBRE DE ALTA AFINIDAD COPT1**

El transportador COPT1 es el miembro de la familia COPT con mayor homología al transportador en levadura Ctr1. Estudios previos en nuestro grupo de investigación demostraron que la expresión del gen *COPT1*, mayoritaria en el ápice de las raíces y el polen, es inhibida por un exceso de Cu en el medio de crecimiento (Sancenón *et al.*, 2003 y 2004). Entre otras funciones, COPT1 participa en la incorporación de Cu en la planta a través del ápice de las raíces (Sancenón *et al.*, 2004). Este hecho sugiere que COPT1 podría ser una buena diana para manipular su expresión con fines biotecnológicos que ayuden a aliviar la contaminación medioambiental por Cu. Previamente al diseño de este tipo de estrategias, se requiere un estudio más detallado del transportador a manipular. En este apartado, se abordó la localización subcelular de este transportador, así como el análisis del fenotipo causado por su sobreexpresión.

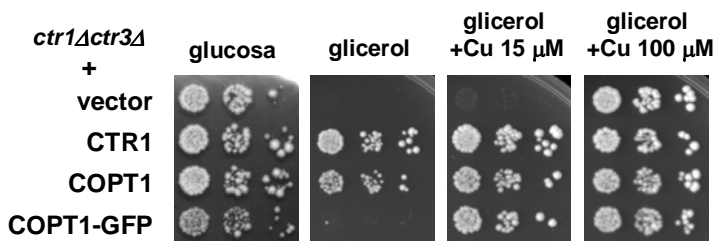
#### **4.1. CONSTRUCCIÓN DE LAS FUSIONES UTILIZADAS PARA LA CARACTERIZACIÓN DE COPT1**

##### **4.1.1. Fusión *CaMV35S::COPT1-GFP***

La estrategia utilizada para determinar la localización subcelular del transportador COPT1 en *Arabidopsis* consistió en la fusión del gen testigo *GFP* al gen de interés (ver apartado 2.3.3 de Materiales y métodos).

Para comprobar si la construcción obtenida era funcional, se llevó a cabo un ensayo de complementación en un sistema heterólogo como la levadura *S. cerevisiae*. La cepa utilizada fue el mutante nulo para los homólogos en levadura *ctr1Δctr3Δ*. La fusión de interés *COPT1-GFP* y los genes *ScCTR1* y *COPT1* (controles positivos) fueron expresados en la cepa de levadura, bajo el

control del promotor constitutivo del gen *GPD* en el vector p426GPD (ver apartado 2.3.4 de Materiales y métodos). Los transformantes crecieron en medio sintético completo SC-ura, demostrando la expresión del vector (Figura R.4.1, glucosa). En medio mínimo YPG, la deficiencia respiratoria de la cepa fue complementada por la adición de Cu 100  $\mu$ M (Figura R.4.1, glicerol + Cu 100  $\mu$ M). Además, la falta de crecimiento del mutante que contiene únicamente el vector p426GPD (control negativo) fue revertida mediante la expresión de los genes *ScCTR1* y *COPT1* en el mismo vector (controles positivos) (Figura R.4.1, glicerol). La fusión de interés COPT1-GFP complementó el defecto de crecimiento de esta cepa de levadura de manera similar a los controles positivos, aunque necesitó la ayuda de Cu 15  $\mu$ M (insuficiente para revertir la deficiencia respiratoria de la cepa mutante *ctr1 $\Delta$ ctr3 $\Delta$*  con el vector p426GPD usado como control negativo) (Figura R.4.1, glicerol + Cu 15  $\mu$ M).



**Figura R.4.1.** Funcionalidad de la construcción COPT1-GFP en levadura. Complementación del mutante *ctr1 $\Delta$ ctr3 $\Delta$*  de *S. cerevisiae* con el control negativo (vector p426GPD vacío), los controles positivos (CTR1 y COPT1 en el vector p426GPD) y la construcción de interés (COPT1-GFP en el vector p426GPD). Los medios utilizados fueron SC-ura (glucosa) e YPG (glicerol) suplementado con las concentraciones de Cu indicadas en cada caso.

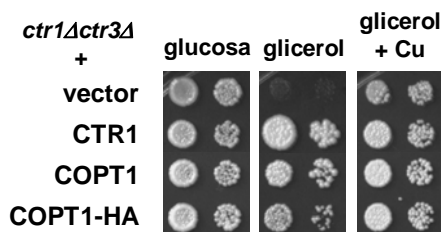
Este resultado indica que la GFP fusionada a COPT1 podría interferir parcialmente en la función de este transportador en plantas. Sin embargo, por tratarse de un ensayo en un sistema biológico heterólogo, la interferencia parcial no es la única explicación posible para el resultado observado. En este sentido, no tendría que producirse necesariamente interferencia de la GFP en la función de COPT1 en las plantas transformadas con dicha construcción.

#### **4.1.2. Fusión *CaMV35S::COPT1-HA***

Para la sobreexpresión del transportador COPT1 en *Arabidopsis*, la estrategia utilizada consistió en aumentar la expresión del gen *COPT1* introduciéndolo bajo el control del promotor constitutivo del gen *CaMV35S* (ver apartado 2.3.2 de Materiales y métodos). En esta estrategia, se etiquetó el extremo carboxilo del gen al epítipo HA, lo que permitió posteriormente la selección de las plantas sobreexpresoras de *COPT1* mediante la detección de la proteína etiquetada por *Western blot*.

Antes de transformar las plantas con esta construcción, al igual que en el apartado anterior, se comprobó si la proteína, una vez fusionada al epítipo HA, mantenía su capacidad de transportar Cu *in vivo*, mediante complementación funcional en *S. cerevisiae* (Figura R.4.2). En este caso, la fusión de interés COPT1-HA complementó el defecto de crecimiento de la cepa mutante de levadura de igual modo que los controles positivos (Figura R.4.2). Este resultado indica que el epítipo HA no interfiere en la función de la proteína COPT1 en el transporte de Cu en levadura.





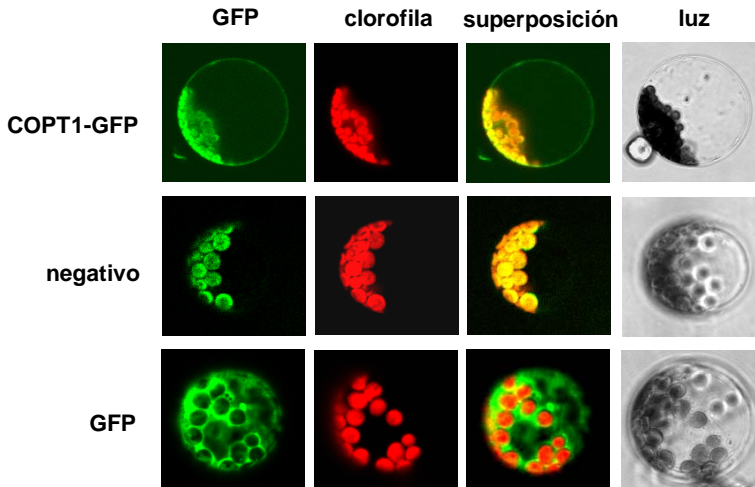
**Figura R.4.2.** Funcionalidad de la construcción COPT1-HA en levadura. Complementación del mutante *ctr1Δctr3Δ* de *S. cerevisiae* con el control negativo (vector p426GPD vacío), los controles positivos (CTR1 y COPT1 en el vector p426GPD) y la construcción de interés (COPT1-HA en el vector p426GPD). Los medios utilizados fueron SC-ura (glucosa) e YPG (glicerol) suplementado o no con Cu 100  $\mu$ M.

## 4.2. LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE COPT1

Con el objetivo de determinar la localización subcelular de COPT1, se procedió a la transformación transitoria de protoplastos de *Arabidopsis* con la construcción *CaMV35S::COPT1-GFP* previamente obtenida (ver apartado 1.3.3 de Materiales y métodos). El vector pGFPau vacío, el mismo usado para la construcción de interés, fue utilizado como control positivo de la señal GFP localizada en el citosol. Los protoplastos sin transformar fueron utilizados como control negativo de la señal GFP, aunque permiten la detección de la autofluorescencia propia de los cloroplastos.

La señal correspondiente a la construcción *COPT1-GFP* se observó de manera más intensa alrededor de la célula, aparte de en los cloroplastos que poseen una alta autofluorescencia, pero no en la vacuola ni en el citosol (Figura R.4.3). Esta señal indica que el transportador COPT1 se encuentra localizado en

la membrana plasmática de las células de *Arabidopsis*. Todos los datos obtenidos hasta la fecha sugerían esta localización del transportador COPT1 (Sancenón *et al.*, 2003 y 2004), sin embargo, no había sido demostrada todavía en *A. thaliana*. El resultado aquí obtenido sobre la localización subcelular de COPT1 en *Arabidopsis*, coincide con lo descrito en otros organismos eucariotas desde levadura a humanos (Dancis *et al.*, 1994a y 1994b; Knight *et al.*, 1996; Zhou y Gitschier, 1997; Lee *et al.*, 2001).



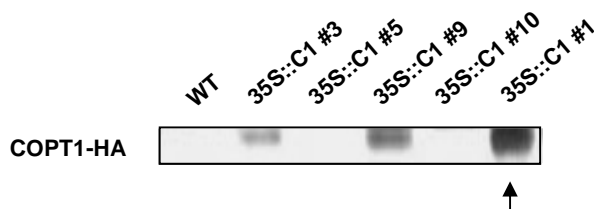
**Figura R.4.3.** Localización subcelular de COPT1. Protoplastos aislados de *Arabidopsis* transformados con la construcción *COPT1-GFP*, sin transformar (control negativo) o con el gen *GFP* (control positivo en el citosol). Se muestra la fluorescencia verde (530 nm) y roja (660 nm) indicativa de la localización de la proteína GFP y la clorofila respectivamente, la superposición de ambas y el campo de luz. Las fotos muestran ejemplares representativos de cada transformación, a la misma escala.

### 4.3. ESTUDIO DE LA FUNCIÓN DE COPT1 EN *Arabidopsis thaliana* MEDIANTE SU SOBREEXPRESIÓN

#### 4.3.1. Obtención de líneas transgénicas sobrepresoras de *COPT1* mediante el promotor constitutivo del gen *CaMV35S*

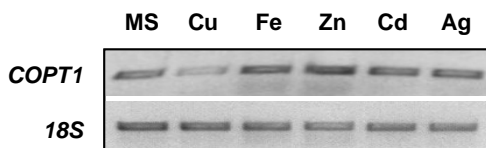
Dado que los datos moleculares conocidos hasta el momento sugieren que la manipulación de COPT1 podría tener aplicaciones biotecnológicas en fitorremediación (Sancenón *et al*, 2003 y 2004), se obtuvieron plantas con un elevado nivel de expresión de este transportador de Cu. Para ello, se utilizó la construcción *CaMV35S::COPT1-HA* (35S::C1) para transformar de manera estable plantas de *Arabidopsis*, mediante *Agrobacterium tumefaciens* (ver apartado 1.3.2 de Materiales y métodos).

La proteína etiquetada COPT1-HA se detectó, mediante *Western blot* (ver apartado 3 de Materiales y métodos), en la mayoría de las líneas obtenidas (Figura R.4.4). La línea transgénica con el mayor nivel de proteína COPT1-HA se seleccionó para seguir con su estudio.



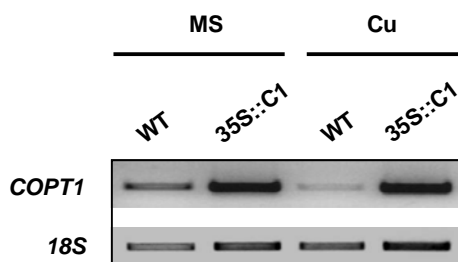
**Figura R.4.4.** Niveles de HA en las plantas sobrepresoras de *COPT1*. *Western blot* de COPT1-HA mediante anticuerpo comercial anti-HA a partir de extractos proteicos totales de hojas de las líneas silvestre (WT) y transgénicas (35S::C1). La flecha indica la línea seleccionada

Dada la posible aplicación biotecnológica de estas plantas para aliviar la contaminación por Cu del suelo, resulta imprescindible que el gen se exprese en presencia de este metal. Por este motivo, se realizó un estudio previo de la regulación de la expresión de *COPT1* en presencia de varios metales en el medio de crecimiento. Se observó que la expresión de este gen se reprimía de manera específica por un exceso de Cu (Figura R.4.5). Este hecho refuerza la importancia del transportador COPT1 en la homeostasis del Cu.



**Figura R.4.5.** Regulación por metales de la expresión de *COPT1*. Productos de RT-PCR a partir de RNA total de plántulas silvestres crecidas durante 8 días en placas con medio MS o en el mismo medio suplementado con Cu, Fe, Zn, Cd o Ag 30 $\mu$ M. Los niveles de rRNA del gen *18S* se muestran como control de carga.

A partir de este resultado, se comprobó la sobreexpresión del transportador COPT1 en las plantas transgénicas obtenidas, analizando los niveles de expresión de *COPT1* en la línea seleccionada mediante RT-PCR semicuantitativa, tanto en condiciones de inducción, como de represión por Cu. La línea transgénica seleccionada mostró unos niveles de mensajero de COPT1 incrementados respecto a la línea silvestre. Mientras que en las plantas WT los niveles de COPT1 disminuyen en exceso de Cu, en las plantas sobreexpresoras dichos niveles se mantienen (Figura R.4.6). Probablemente, este efecto se debe al uso del promotor constitutivo.



**Figura R.4.6.** Niveles de expresión de *COPT1* en las plantas sobrepresoras de *COPT1* en deficiencia y exceso de Cu. Productos de RT-PCR a partir de RNA total de plántulas de las líneas silvestre (WT) y transgénica (35S::C1) crecidas durante 8 días en medio MS o el mismo medio suplementado con Cu 10  $\mu$ M. Los niveles de rRNA del gen *18S* se muestran como control de carga.

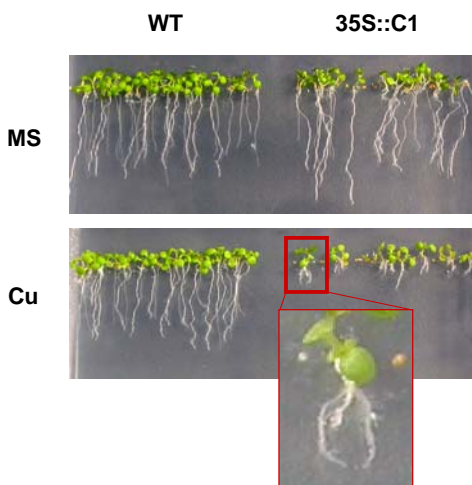
El hecho de que las plantas transgénicas obtenidas son plantas sobrepresoras de *COPT1*, incluso en presencia de un exceso de Cu en el medio, es fundamental para su posible aplicación como herramienta en procesos biotecnológicos como la fitorremediación de suelos contaminados por Cu.

### 4.3.2. Caracterización fenotípica de las líneas transgénicas sobrepresoras de *COPT1*

#### 4.3.2.1. Estudio de la sensibilidad al cobre

Se analizó la sensibilidad al Cu en el medio de las plantas sobrepresoras de *COPT1* comparando su crecimiento en medio MS y en presencia de Cu 10  $\mu$ M respecto a plantas silvestres. Mientras que en medio MS no se observó ninguna diferencia fenotípica respecto a los controles, las plantas

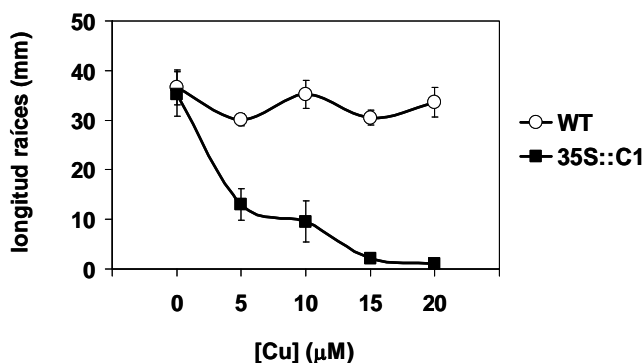
sobrexpresoras de *COPT1* son extremadamente sensibles al Cu en el medio, como se pudo observar por el crecimiento inhibido de la raíz principal y la aparición de raíces laterales cerca de la corona de las plántulas (Figura R.4.7). Además, se observó que cuando la concentración de Cu aumenta, el desarrollo de las plántulas se encuentra retardado en las transgénicas respecto a las silvestres (datos no mostrados).



**Figura R.4.7.** Fenotipo de las raíces de las plántulas sobrexpresoras de *COPT1* en presencia de Cu. Plántulas de las líneas silvestre (WT) y transgénica (35S::C1) crecidas durante 8 días en medio MS o en el mismo medio suplementado con Cu 10  $\mu$ M. Detalle de la morfología de la raíz de las plántulas transgénicas se destaca en la figura.

Para cuantificar este efecto, se midieron diferentes parámetros. Por un lado, la longitud de las raíces en plántulas crecidas durante 8 días (Sancenón *et al.*, 2004; Andrés-Colás *et al.*, 2006), tanto en medio estándar de crecimiento en placa MS, como en el mismo medio suplementado con diferentes concentraciones de Cu (Figura R.4.8). La longitud de las raíces se redujo un 60

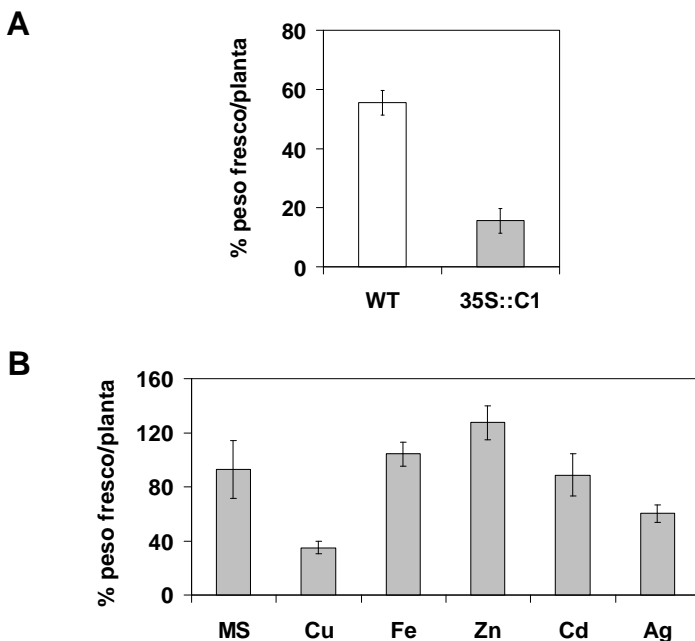
% en las plantas sobrepresoras de *COPT1* a una concentración de Cu 5  $\mu\text{M}$  respecto al medio MS, mientras que este parámetro no se encontraba afectado de manera significativa en las plantas silvestres a una concentración de Cu 20  $\mu\text{M}$  en el medio de crecimiento.



**Figura R.4.8.** Cuantificación del efecto del Cu en el crecimiento de las raíces de las plántulas sobrepresoras de *COPT1*. Longitud de las raíces de las plantas transgénicas en presencia de un exceso de Cu. Valores promedio de la longitud de la raíz de 5 plántulas de las líneas silvestre (WT) y transgénica (35S::C1) crecidas durante 8 días en medio MS suplementado con Cu 0, 5, 10, 15 o 20  $\mu\text{M}$  y con la correspondiente desviación estándar de tres experimentos independientes.

Por otro lado, se midió el peso fresco de estas plántulas crecidas durante 8 días en presencia y ausencia de Cu en el medio estándar de crecimiento en placa MS. Como muestra la figura R.4.9.A, el peso fresco se redujo alrededor de un 75 % más en las plantas sobrepresoras de *COPT1* que en las plantas silvestres en presencia de Cu 50  $\mu\text{M}$  respecto al medio MS. Además, utilizando este mismo parámetro, se analizó la especificidad de Cu para esta respuesta en las plantas transgénicas obtenidas, mediante la adición de diferentes sales metálicas

al medio de crecimiento (Figura R.4.9.B). Sólo el Cu y parcialmente la Ag, metal isoeléctrico al Cu, provocaron un descenso en el peso fresco, mientras que el resto de metales ensayados como el Fe, Zn y Cd no tuvieron ningún efecto, indicando la especificidad de la sensibilidad frente al Cu.



**Figura R.4.9.** Cuantificación y especificidad del efecto del Cu sobre el peso fresco de las plántulas sobrepresoras de *COPT1*. **(A)** Peso fresco de las plantas transgénicas en presencia de un exceso de Cu. Porcentajes del peso fresco por planta como promedio de 5 plántulas de las líneas silvestre (WT) y transgénica (35S::C1), crecidas durante 8 días en medio MS suplementado con Cu 50  $\mu$ M respecto al medio MS y con la correspondiente desviación estándar de tres experimentos independientes. **(B)** Efecto de diferentes iones metálicos en las plantas transgénicas. Porcentajes del peso fresco por planta como promedio de 5 plántulas de la línea transgénica (35S::C1) respecto a la línea silvestre (WT), crecidas durante 8 días en medio MS o en el mismo medio suplementado con Cu, Fe, Zn, Cd o Ag 30  $\mu$ M y con la correspondiente desviación estándar de tres experimentos independientes.

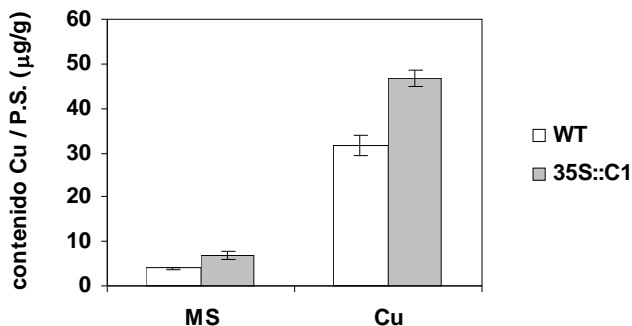


Precisamente, la sobreexpresión de *COPT1* genera el fenotipo más característico en respuesta al exceso de Cu en uno de los principales lugares de su expresión, el ápice de las raíces, como la inhibición del crecimiento de la raíz principal y la formación de raíces laterales. La importancia funcional de la reorientación del crecimiento de las raíces inducida por estrés está relacionada con un intento de la planta por eludir el propio estrés (Pasternak *et al.*, 2005). Estos mismos autores, también apuntan a un posible control de los cambios estructurales de la raíz en condiciones de estrés por parte de los ROS aumentados por un exceso de Cu. Este control podría darse, directamente, mediante un entrecruzamiento oxidativo de los componentes de la pared celular que afecta la capacidad de expansión celular, ya que gran parte de las oxidasas y enzimas que participan en el entrecruzamiento de la matriz extracelular son enzimas de Cu. También es posible que el control de la inhibición del crecimiento de la raíz sea a través de un proceso complejo que integre cambios hormonales, debido a que hormonas como citoquininas, auxinas, etileno o giberelinas afectan a la elongación, la división celular y la reorientación del crecimiento de la planta.

#### 4.3.2.2. *Análisis del contenido endógeno de cobre en plántulas*

Para determinar si el fenotipo de sensibilidad al Cu en el medio observado en las líneas transgénicas es debido a un incremento en los niveles endógenos de este metal en la planta, se midió el contenido en Cu en plántulas mediante absorción atómica. Se compararon las líneas transgénicas con la silvestre, tanto en medio estándar de crecimiento en placa MS como en el mismo medio suplementado con Cu 10  $\mu$ M, donde se observó el fenotipo característico descrito anteriormente. La figura R.4.10 muestra que la concentración de Cu es mayor en la línea sobreexpresora de *COPT1* que en la silvestre. En presencia de un exceso de Cu en el medio, esta diferencia en la concentración de Cu es

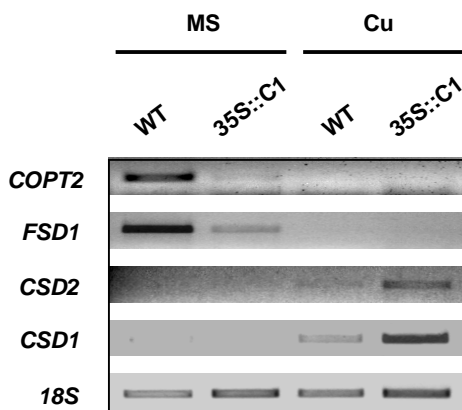
mayor, lo que podría explicar la sensibilidad de esta línea transgénica al Cu en el medio.



**Figura R.4.10.** Niveles de Cu endógeno en las plántulas sobrepresoras de *COPT1*. Cantidad de Cu, medida por espectroscopía de absorción atómica en cámara de grafito, en plántulas de las líneas silvestre (WT) y transgénica (35S::C1), crecidas durante 8 días en medio MS o en el mismo medio suplementado con Cu 10 µM. Valores promedio de medidas realizadas por triplicado a partir de dos experimentos independientes con sus respectivas desviaciones estándar.

Adicionalmente, se llevó a cabo un estudio de la expresión de genes indicadores de condiciones de exceso y déficit de Cu en el interior celular, como *CSD1/CSD2* y *COPT2/FSD1* respectivamente (ver apartado 1.2.1 de Resultados y discusión), por RT-PCR semicuantitativa (Figura R.4.11). La expresión de *COPT2* y *FSD1* sólo pudo ser detectada en el medio MS, principalmente en la línea silvestre, y disminuyó notablemente en la línea transgénica. Sin embargo, la expresión de *CSD1* y *CSD2* se detectó en exceso de Cu, especialmente en la línea transgénica sobrepresora de *COPT1*. El resultado obtenido corrobora la

mayor concentración de Cu detectada anteriormente en las plántulas sobrepresoras de *COPT1* respecto a las plántulas silvestres.

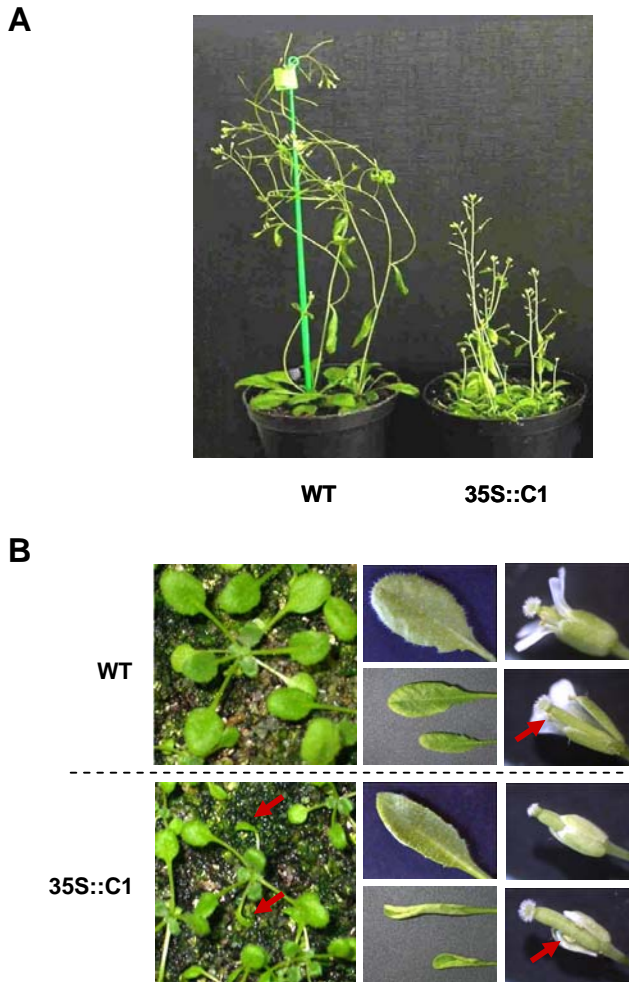


**Figura R.4.11.** Niveles de expresión de genes indicadores de la cantidad de Cu, en las plantas sobrepresoras de *COPT1*. Productos de RT-PCR a partir de RNA total de plántulas de las líneas silvestre (WT) y transgénica (35S::C1) crecidas durante 8 días en medio MS o el mismo medio suplementado con Cu 10  $\mu$ M. Los niveles de rRNA del gen *18S* se muestran como control de carga.

Por lo tanto, las plantas sobrepresoras de *COPT1* acumulan más Cu, debido a un aumento en la incorporación de este metal en las células por la sobrepresión del transportador de Cu de alta afinidad COPT1, lo que corrobora la función de COPT1 en el transporte de Cu.

#### 4.3.2.3. Descripción del fenotipo en sustrato vegetal

Bajo condiciones estándar de crecimiento en sustrato vegetal, las plantas transgénicas adultas (4 semanas de edad) presentan un fenotipo consistente en la reducción del tamaño global de la planta, comparado con el control silvestre (Figura R.4.12.A), mostrando un amplio rango de intensidades en la severidad del fenotipo entre diferentes individuos de la progenie. Esta diferencia de tamaño también es evidente en plantas de 2 semanas de edad, donde el número de hojas de la roseta es idéntico entre las plantas transgénicas y las silvestres, indicando que las diferencias en el tamaño no son debidas a un retraso en el estado del desarrollo (Figura R.4.12.B, panel izquierdo). Un estudio más detallado permitió observar una curvatura característica de los cotiledones que se disponen en perpendicular al plano del suelo y en una disposición que hemos denominado “forma de remo” (Figura R.4.12.B, panel izquierdo). Además, mientras las hojas adultas son convexas en los controles, en las plantas transgénicas están curvadas en sentido opuesto presentando una forma cóncava (Figura R.4.12.B, panel central). Las plantas que muestran fenotipos más severos presentan un enrollamiento completo de la hoja, tal y como muestra la figura R.4.12.B en el panel central. Las flores también se encuentran afectadas en las plantas sobrepresoras de *COPTI*. La mayoría de ellas muestran pétalos y estambres protegidos por los sépalos, lo que impide el proceso natural del desarrollo de las flores (Figura R.4.12.B, panel derecho). Este hecho podría ser la causa de la escasa fertilidad observada en la línea transgénica, ya que el polen no es capaz de alcanzar el pistilo en estas flores. Este mismo fenotipo ha sido observado en diferentes líneas independientes sobrepresoras de *COPTI* (datos no mostrados).



**Figura R.4.12.** Fenotipo de las plantas sobrepresoras de *COPT1* en sustrato vegetal. **(A)** Plantas de las líneas silvestre (WT) y transgénica (35S::C1) crecidas durante 4 semanas. **(B)** Detalles de las plantas transgénicas en comparación con las silvestres. **Panel izquierdo:** plantas crecidas durante 2 semanas. Las flechas señalan los cotiledones con la curvatura característica en la línea transgénica. **Panel central:** hojas adultas donde se observa la curvatura cóncava y convexa de las líneas transgénica y silvestre, respectivamente. Fenotipo severo de hojas enroscadas en la línea transgénica. **Panel derecho:** flores enteras y con algunos sépalos y pétalos eliminados para visualizar los estambres. Las flechas señalan los estambres. Todas las fotos muestran ejemplares representativos de cada línea, a la misma escala.

La expresión natural de *COPT1* se ha demostrado que está restringida específicamente a las células del ápice de las raíces, tricomas y granos de polen (Sancenón *et al.*, 2004). Probablemente, la expresión ectópica y constitutiva de *COPT1* en estas plantas transgénicas hace que la incorporación de Cu sea una ruta prácticamente general en todos los tipos celulares. Si ciertas células son más susceptibles que otras al aumento de los niveles intracelulares de Cu, el incremento indiscriminado en el transporte de Cu en las plantas transgénicas podría causar los diversos fenotipos observados en las plantas sobrepresoras de *COPT1* crecidas en sustrato vegetal. En este sentido, se podría estar observando lo que ocurre en diferentes órganos y tejidos cuando la incorporación y distribución de Cu no está regulada, así como los efectos en la planta entera durante su desarrollo.

La reducción del tamaño celular parece ser una respuesta común al exceso de Cu (Marschner, 2002). No sorprende el efecto del Cu en la expansión celular desde que se conoce que una variedad de oxidasas y enzimas que participan en el entrecruzamiento extracelular son enzimas de Cu, como las lacasas, las amino oxidasas o las ascorbato oxidasas (Nakamura y Go, 2005; Cona *et al.*, 2006; Marusek *et al.*, 2006), ya que el entrecruzamiento de los componentes de la pared celular afecta la capacidad celular de expansión. Además, la generación de ROS por un exceso de Cu puede controlar estos procesos de cambio estructural en la planta (Pasternak *et al.*, 2005). Por otro lado, las expansinas son unas proteínas que parecen participar en la relajación de la pared celular permitiendo su expansión, por lo que su supresión provoca rigidez a la pared e impide así el crecimiento celular (revisado en Cosgrove, 2005). En este sentido, se ha podido detectar que varias expansinas parecen estar inhibidas en condiciones de exceso de Cu (ver apartado 1.2.2.2 de Resultados y discusión). Además, existe una gran diversidad de expansinas quizá de expresión específica en diferentes tipos celulares o etapas del desarrollo, lo que podría explicar el fenotipo característico de estas plantas transgénicas en los diferentes órganos

(“forma de remo” de los cotiledones, curvatura invertida de las hojas, y pétalos y estambres protegidos en la flor).

#### **4.4. OBTENCIÓN DE PLANTAS TRANSGÉNICAS CON POSIBLES APLICACIONES BIOTECNOLÓGICAS EN FITORREMEDIACIÓN**

##### **4.4.1. Cruce de líneas transgénicas sobrepresoras de *COPT1* y de *TcMT3***

Las estrategias de fitorremediación precisan plantas acumuladoras del metal que sean tolerantes al mismo (Krämer, 2005). Las plantas sobrepresoras de *COPT1* obtenidas son acumuladoras de Cu gracias a un aumento en la incorporación del metal, pero también son sensibles al Cu y tienen poca biomasa. Por lo tanto, para una posible aplicación de nuestras plantas sobrepresoras de *COPT1* en procesos de fitorremediación, se necesitaría aliviar su sensibilidad al Cu, de modo que aumente su biomasa en presencia de un exceso de Cu y con ello la cantidad de Cu acumulada.

Como ya se ha descrito en Introducción, entre los principales sistemas celulares de protección frente a la citotoxicidad derivada del Cu en plantas se encuentran las metalotioneínas, un grupo de proteínas que secuestran los cationes metálicos. A partir de estudios previos, se ha propuesto que la MT3 de *Thlaspi caerulescens* es capaz de quelar más Cu que la propia MT3 de *A. thaliana* (Roosens *et al.*, 2004). En nuestro laboratorio disponemos de plantas de *Arabidopsis* sobrepresoras de esta *TcMT3*, facilitadas por el laboratorio de Nathalie Verbruggen (*Université Libre de Bruxelles, Belgium*) (datos no publicados). Estas plantas sobrepresan *TcMT3* gracias a la construcción *CaMV35S::TcMT3* (35S::TcMT3). Las plantas sobrepresoras de *TcMT3* crecidas en sustrato vegetal muestran un fenotipo similar, respecto a la cantidad

de biomasa, al observado en las plantas sobrexpresoras de *COPT1*. Además, también muestran fenotipo en presencia del metal en el medio estándar de crecimiento en placa MS.

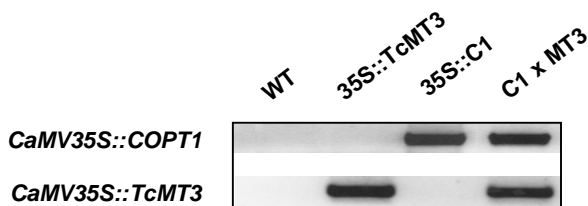
A partir de estos datos, y con el objetivo de obtener plantas sobrexpresoras de *COPT1* tolerantes al Cu, se decidió aumentar la capacidad quelante de Cu en nuestras plantas sobrexpresoras de *COPT1* mediante su cruce con las plantas sobrexpresoras de *TcMT3*. Concretamente, se polinizaron pistilos de plantas sobrexpresoras de *COPT1* con polen de plantas sobrexpresoras de *TcMT3* (♀ 35S::C1 x ♂ 35S::TcMT3). Debido al fenotipo mostrado por las plantas sobrexpresoras de *TcMT3*, estas plantas fueron tratadas con una disolución de Cu (ver apartado 1.3.1 de Materiales y métodos), para disponer de polen en buen estado para el cruce.

La selección de las plantas transgénicas sobrexpresoras simultáneamente de *COPT1* y *TcMT3* (C1 x MT3) se realizó mediante PCR (Figura R.4.13). Las secuencias primarias de las metalotioneínas AtMT3 y TcMT3 poseen una elevada homología, lo que hace prácticamente imposible la detección de la expresión propia de *TcMT3* mediante PCR. Sin embargo, la regulación de *TcMT3* y no de *AtMT3* bajo el control del promotor constitutivo del gen *CaMV35S*, permite seleccionar las plantas transgénicas con la construcción *CaMV35S::TcMT3* por PCR a partir de DNA genómico con un oligonucleótido específico de este promotor *CaMV35S* (ver tabla M.1). La presencia de la construcción *CaMV35S::COPT1-HA* se detectó, al igual que para *TcMT3*, mediante PCR con un oligonucleótido específico del promotor *CaMV35S* a partir de DNA genómico (ver tabla M.1).

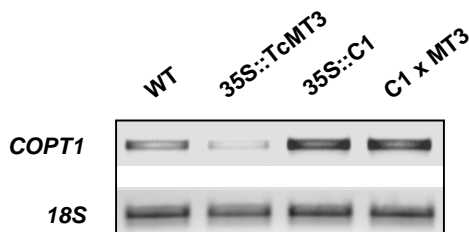
También se pudo comprobar la sobreexpresión de *COPT1* en las plantas transgénicas obtenidas, por PCR a partir de cDNA con oligonucleótidos internos del gen *COPT1* (ver tabla M.2) (Figura R.4.14). Finalmente, se



seleccionó una línea sobrepresora de *COPT1* y *TcMT3* (C1 x MT3) (datos no mostrados).



**Figura R.4.13.** Detección de las construcciones de interés en las plantas sobrepresoras de *COPT1* y *TcMT3*. Productos de PCR a partir de DNA genómico de hojas de las líneas silvestre (WT) y transgénicas (35S::TcMT3, 35S::C1 y C1xMT3).



**Figura R.4.14.** Comprobación de la sobrepresión de *COPT1* en las plantas sobrepresoras de *COPT1* y *TcMT3*. Productos de RT-PCR a partir de RNA total de hojas de las líneas silvestre (WT) y transgénicas (35S::TcMT3, 35S::C1 y C1xMT3). Los niveles de rRNA del gen *18S* se muestran como control de carga.

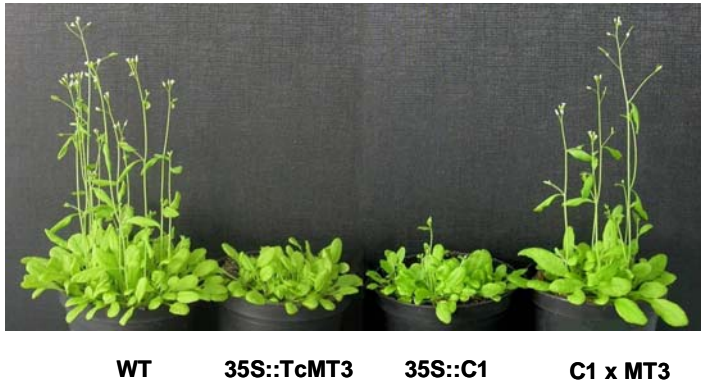
#### **4.4.2. Caracterización fenotípica de las líneas transgénicas sobreexpresoras de *COPT1* y *TcMT3***

##### *4.4.2.1. Descripción del fenotipo en sustrato vegetal*

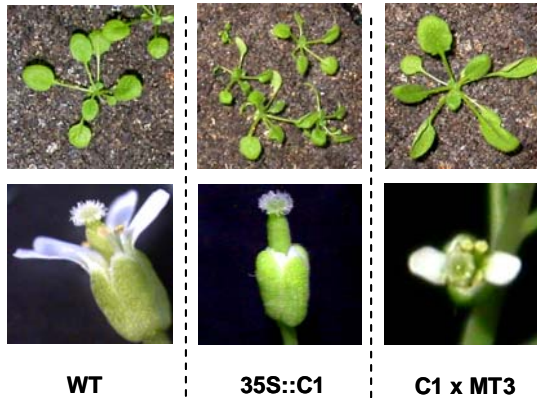
Las plantas de la primera generación de la línea sobreexpresora de *COPT1* y *TcMT3* mostraron un fenotipo interesante desde el punto de vista de la fitorremediación. A nivel global, poseían un tamaño de planta mayor que la línea sobreexpresora de *COPT1*, siendo bastante similar al observado para la línea control silvestre (Figura R.4.15). Más detalladamente, se pudo observar que seguían manteniendo el fenotipo característico de hoja cóncava propio de las plantas sobreexpresoras de *COPT1* y de flores sin desarrollar, pero menos severo (Figura R.4.15.B)

Por el hecho de ser plantas sobreexpresoras de *COPT1* y *TcMT3*, este fenotipo parece indicar que la presencia de *TcMT3* ayuda a tolerar el Cu incorporado en exceso debido a la expresión ectópica de *COPT1*. Sin embargo, se precisan estudios más detallados que permitan comprobar que ambos genes están funcionando en la acumulación de Cu y la tolerancia al metal.

**A**



**B**

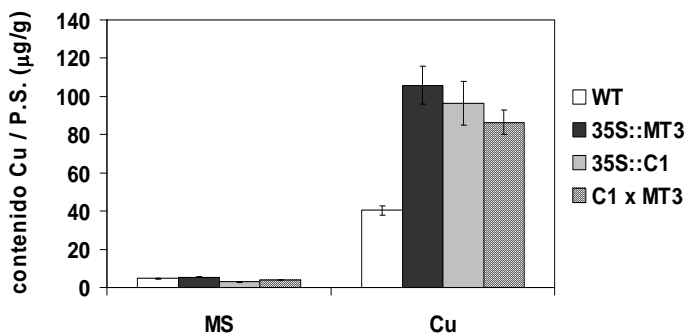


**Figura R.4.15.** Fenotipo de las plantas sobreexpresoras de *COPT1* y *TcMT3* en sustrato vegetal. **(A)** Plantas de las líneas silvestre (WT) y transgénicas (35S::TcMT3, 35S::C1 y C1xMT3) crecidas durante 4 semanas. **(B)** Detalles de las plantas transgénicas en comparación con las silvestres. **Panel superior:** plantas de las líneas silvestre (WT) y transgénicas (35S::C1 y C1xMT3) crecidas durante 2 semanas. **Panel inferior:** flores de las líneas silvestre (WT) y transgénicas (35S::C1 y C1xMT3). Todas las fotos muestran ejemplares representativos de cada línea, a la misma escala.

#### 4.4.2.2. Análisis del contenido endógeno de cobre en plántulas

Para comprobar si las plantas sobrepresoras de *COPT1* y *TcMT3* mantienen la elevada concentración de Cu detectada previamente en las plantas sobrepresoras de *COPT1* (ver apartado 4.3.2.2 de Resultados y discusión), se midió la concentración de Cu en plántulas mediante absorción atómica al igual que en el caso de dichas plantas. Las plantas sobrepresoras de *COPT1* y *TcMT3* acumularon más Cu que las plantas silvestres en presencia de un exceso de metal en el medio, siendo dicho nivel muy similar al detectado en las líneas parentales (Figura R.4.16).

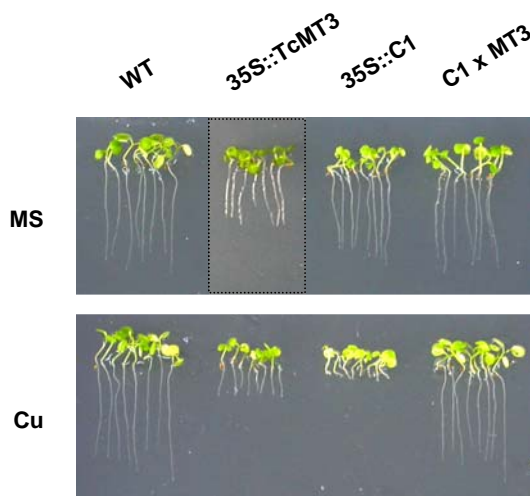
Por lo tanto, se puede decir que las plantas sobrepresoras de *COPT1* y *TcMT3* acumulan Cu, al igual que en el caso de las plantas sobrepresoras de *COPT1* o *TcMT3*, probablemente debido al incremento en la incorporación del metal por parte de *COPT1* o en su quelación por parte de *TcMT3*.



**Figura R.4.16.** Niveles de Cu endógeno en las plántulas sobrepresoras de *COPT1* y *TcMT3*. Cantidad de Cu, medida por espectroscopía de absorción atómica en cámara de grafito, en plántulas de las líneas silvestre (WT) y transgénicas (35S::TcMT3, 35S::C1 y C1xMT3), crecidas durante 8 días en medio MS o en el mismo medio suplementado con Cu 10 µM. Valores promedio de 6 réplicas con sus respectivas desviaciones estándar.

#### 4.4.2.3. Estudio de la tolerancia al cobre

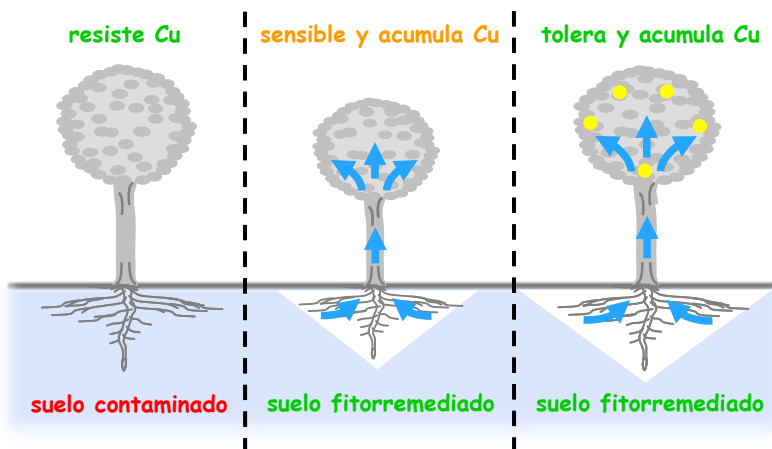
Para determinar el grado de tolerancia al Cu de las plantas sobrepresoras de *COPT1* y *TcMT3*, se observó el crecimiento de las raíces (Sancenón *et al.*, 2004; Andrés-Colás *et al.*, 2006), en MS y un exceso de Cu 10  $\mu\text{M}$ , y se compararon con plantas silvestres y sobrepresoras de *COPT1* o *TcMT3*. Se pudo observar que, así como las plantas sobrepresoras de *COPT1* o *TcMT3* tenían dificultades para crecer en presencia de Cu 10  $\mu\text{M}$  en el medio (ver apartado 4.3.2.1 de Resultados y discusión), las plantas sobrepresoras obtenidas del cruce toleran el Cu en un grado similar al control silvestre en estas condiciones (Figura R.4.17).



**Figura R.4.17.** Fenotipo de las raíces de las plántulas sobrepresoras de *COPT1* y *TcMT3* en presencia de Cu. Plántulas de las líneas silvestre (WT) y transgénicas (35S::TcMT3, 35S::C1 y C1xMT3) crecidas durante 8 días en medio MS o en el mismo medio suplementado con Cu 10  $\mu\text{M}$ . Las fotos muestran ejemplares representativos de cada línea.

Este resultado indica que la sobreexpresión adicional de *TcMT3* mejora la capacidad de tolerancia al Cu incorporado en exceso en las plantas sobreexpresoras de *COPT1*, probablemente mediante la quelación del metal.

A pesar de que es necesario realizar un estudio más detallado, tanto de la capacidad de acumular Cu, como de las bases de la tolerancia al Cu de las plantas obtenidas del cruce, los resultados obtenidos hasta la fecha señalan a la estrategia utilizada como candidata para ser aplicada en especies locales y de cultivo para fitorremediar suelos contaminados por Cu, ya que en las plantas obtenidas convergen las dos características primordiales para llevar a cabo este tipo de aplicaciones: acumulación y tolerancia al Cu (Figura R.4.18).



**Figura R.4.18.** Esquema de la aplicación biotecnológica de la sobreexpresión de *COPT1* y *TcMT3*. Las flechas azul oscuro indican los flujos de entrada de Cu y las azul claro los flujos extra de entrada. Los puntos amarillos indican quelantes de Cu.

## **CONCLUSIONES**

## 1. La respuesta a diferentes niveles de Cu en *Arabidopsis thaliana*

1.1.) El medio estándar de crecimiento en placa ½ MS es deficitario en Cu para las plántulas (~ 4 µg/g P.S.), mientras que el mismo medio suplementado con Cu 10 µM provoca una elevada concentración endógena del metal próxima al exceso (~ 30 µg/g P.S.).

1.2.) Las respuestas moleculares observadas mediante micromatrices a estos niveles de déficit y exceso de Cu en el medio se dividen en tres categorías:

- Respuesta al estrés y alteración del metabolismo, incluyendo la respuesta al estrés hídrico y salino, la división celular y la modificación de DNA en exceso de Cu, así como la respuesta al estrés por patógenos, expansión celular y metabolismo del azufre en déficit del metal. El ritmo circadiano también se encuentra alterado por los niveles de Cu. En estas respuestas están implicados factores de regulación por déficit de Cu como las SPLs y los miRNAs.

- Prioridad en el uso del Cu para proteínas esenciales, como la plastocianina, y sustitución de proteínas con función equivalente que utilizan diferentes metales en sus centros activos, como la Cu/ZnSOD y la FeSOD cloroplásticas. En este sentido, la CSD2 y FSD1 son buenos indicadores de niveles elevados y deficitarios de Cu, respectivamente, dentro de la célula en *Arabidopsis thaliana*.

- Regulación de los niveles intracelulares de Cu mediante alteración de los mecanismos de incorporación del metal en la célula, como los transportadores de Cu de alta afinidad COPT, y de destoxificación del metal, como la familia de ATPasas tipo P transportadoras de Cu.



## **2. La ATPasa tipo P transportadora de Cu HMA5**

2.1.) HMA5 se expresa principalmente en raíces y su expresión se induce en plántula entera de manera específica por Cu.

2.2.) Mutantes por pérdida de función *hma5* son hipersensibles específicamente al Cu en el medio y acumulan más Cu en las raíces que las plantas silvestres en presencia de un exceso de Cu en el medio de crecimiento.

## **3. El transportador de Cu de alta afinidad COPT3**

3.1.) COPT3 se expresa principalmente en flores y semillas.

3.2.) COPT3 se localiza intracelularmente, probablemente en algún compartimento de la ruta de secreción en *Arabidopsis*.

3.3.) La sobreexpresión de *COPT3* en plantas transgénicas provoca un fenotipo en sustrato vegetal que consiste en retraso en el desarrollo de la planta, cotiledones en “forma caída” y estambres más cortos que los de plantas silvestres. Estas plantas sobreexpresoras muestran hipersensibilidad al Cu en el medio, acumulan más Cu en las semillas y, en presencia de Cu en exceso, acumulan más Cu en plántula entera que las plantas silvestres.

#### **4. El transportador de Cu de alta afinidad COPT1**

**4.1.)** El nivel de expresión de COPT1 en plántula entera se reprime de manera específica por Cu.

**4.2.)** COPT1 se localiza en la membrana plasmática en *Arabidopsis*.

**4.3.)** La sobreexpresión del gen *COPT1* en plantas transgénicas provoca un fenotipo en sustrato vegetal que consiste en reducción del tamaño global de la planta, cotiledones en “forma de remo”, curvatura cóncava de las hojas, pétalos y estambres protegidos por los sépalos y escasa fertilidad. Estas plantas sobreexpresoras son hipersensibles específicamente al Cu en el medio y acumulan más Cu que las plantas silvestres.

**4.4.)** La sobreexpresión simultánea de *COPT1* y el quelante de metales *TcMT3* en plantas podría ser una estrategia candidata en procesos de fitorremediación de suelos contaminados por Cu. Estas plantas reúnen dos características fundamentales para este tipo de aplicaciones biotecnológicas ya que, aún acumulando Cu a un nivel similar a las plantas sobreexpresoras de *COPT1*, se ha mejorado la tolerancia al Cu de las mismas.

## **BIBLIOGRAFÍA**

- Abdel-Ghany, S.E., Burkhead, J.L., Gogolin, K.A., Andrés-Colás, N., Bodecker, J.R., Puig, S., Peñarrubia, L. y Pilon, M. (2005a)** AtCCS is a functional homolog of the yeast copper chaperone Ccs1/Lys7. *FEBS Letters* **579**, 2307-2312.
- Abdel-Ghany, S.E., Muller-Moule, P., Niyogi, K.K., Pilon, M. y Shikanai, T. (2005b)** Two P-type ATPases are required for copper delivery in *Arabidopsis thaliana* chloroplasts. *The Plant Cell* **17**, 1233-1251.
- Abe, H., Urao, T., Ito, T., Seki, M., Shinozaki, K. y Yamaguchi-Shinozaki, K. (2003)** Arabidopsis AtMYC2 (bHLH) and AtMYB2 (MYB) function as transcriptional activators in abscisic acid signaling. *The Plant Cell* **15**, 63-78.
- Agrawal, G.K., Rakwal, R., Jwa, N.S. y Agrawal, V.P. (2002)** Characterization of a novel rice gene OsATX and modulation of its expression by components of the stress signalling pathways. *Physiologia Plantarum* **116**, 87-95.
- Alabadi, D., Oyama, T., Yanovsky, M., Harmon, F.G., Ma, P. y Kay, S.A. (2001)** Reciprocal regulation between *TOC1* and *LHY/CCA1* within the *Arabidopsis* circadian clock. *Science* **293**, 880-883.
- Allen, R.D. (1995)** Dissection of oxidative stress tolerance using transgenic plants. *Plant Physiology* **107**, 1049-1054.
- Allen, R.D., Bernier, F., Lessard, P.A. y Beachy, R.N. (1989)** Nuclear factors interact with a soybean beta-conglycinin enhancer. *The Plant Cell* **1**, 623-31.
- Aller, S.G. y Unger, V.M. (2006)** Projection structure of the human copper transporter CTR1 at 6-Å resolution reveals a compact trimer with a novel channel-like architecture. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **103**, 3627-3632.
- Aller, S.G., Eng, E.T., De Feo, C.J. y Unger, V.M. (2004)** Eukaryotic CTR copper uptake transporters require two faces of the third transmembrane domain for helix packing, oligomerization, and function. *The Journal of Biological Chemistry* **279**, 53435-53441.
- Andrés-Colás, N., Sancenón, V., Rodríguez-Navarro, S., Mayo, S., Thiele, D.J., Ecker, J.R., Puig, S. y Peñarrubia, L. (2006)** The Arabidopsis heavy metal P-type ATPase HMA5 interacts with metallochaperones and functions in copper detoxification of roots. *The Plant Journal* **45**, 25-236.
- Argüello, J.M. (2003)** Identification of ion-selectivity determinants in heavy-metal transport PIB-type ATPases. *The Journal of Membrane Biology* **195**, 93-108.
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. y Struhl, K. (1995)** Current protocols in molecular biology. John Wiley & Sons (Eds) New York.
- Axelsen, K.B. y Palmgren, M.G. (2001)** Inventory of the superfamily of P-type ion pumps in Arabidopsis. *Plant Physiology* **126**, 696-706.

- Balandin, T. y Castresana, C. (2002)** AtCOX17, an Arabidopsis homolog of the yeast copper chaperone COX17. *Plant Physiology* **129**, 1852-1857.
- Banci, L., Bertini, I., Ciofi-Baffoni, S., Kandias, N.G., Robinson, N.J., Spyroulias, G.A., Su, X.C., Tottey, S. y Vanarotti, M. (2006)** The delivery of copper for thylakoid import observed by NMR. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **103**, 8320-5.
- Barak, S., Tobin, E.M., Andronis, C., Sugano, S. y Green, R.M. (2000)** All in good time: the *Arabidopsis* circadian clock. *Trends in Plant Science* **5**, 517-522.
- Bar-Peled, M. y Raikhel, N.V. (1997)** Characterization of AtSEC12 and AtSAR1. Proteins likely involved in endoplasmic reticulum and Golgi transport. *Plant Physiology* **114**, 315-24.
- Barth, C., De Tullio, M. y Conklin, P.L. (2006)** The role of ascorbic acid in the control of flowering time and the onset of senescence. *Journal of Experimental Botany* **57**, 1657-65.
- Bate, N. y Twell, D. (1998)** Functional architecture of a late pollen promoter: pollen-specific transcription is developmentally regulated by multiple stage-specific and co-dependent activator elements. *Plant Molecular Biology* **37**, 859-869.
- Baxter, I., Tchieu, J., Sussman, M.R., Boutry, M., Palmgren, M.G., Gribskov, M., Harper, J.F. y Axelsen, K.B. (2003)** Genomic Comparison of P-type ATPase ion pumps in Arabidopsis and rice. *Plant Physiology* **132**, 618-628.
- Beauchamp, C. y Fridovich, I. (1971)** Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytical Biochemistry* **44**, 276-87.
- Bell, P.F., Chaney, R.L. y Angle, J.S. (1991)** Determination of copper activity required by maize using chelator-buffered nutrient solution. *Soil Science Society of America Journal* **55**, 7824-7828.
- Bellemare, D.R., Shaner, L., Morano, K.A., Beaudoin, J., Langlois, R. y Labbe, S. (2002)** Ctr6, a vacuolar membrane copper transporter in *Schizosaccharomyces pombe*. *The Journal of Biological Chemistry* **277**, 46676-46686.
- Bernal, M., Testillano, P.S., Alfonso, M., del Carmen Risueño, M., Picorel, R. y Yruela, I. (2007)** Identification and subcellular localization of the soybean copper P<sub>1B</sub>-ATPase GmHMA8 transporter. *Journal of Structural Biology* **158**, 46-58.
- Bienfait, H. F. (1988)** Proteins under the control of the gene for Fe efficiency in tomato. *Plant Physiology* **88**, 785-787.
- Birkenbihl, R.P., Jach, G., Saedler, H. y Huijser, P. (2005)** Functional dissection of the plant-specific SBP-domain: overlap of the DNA-binding and nuclear localization domains. *The Journal of Biological Chemistry* **352**, 585-596.
- Birnbaum, K., Shasha, D.E., Wang, J.Y., Jung, J.W., Lambert, G.M., Galbraith, D.W. y Benfey, P.N. (2003)** A gene expression map of the *Arabidopsis* root. *Science* **302**, 1956-

- 1960.
- Bleuyard, J-Y., Gallego, M.E. y White, C.I. (2006)** Recent advances in understanding of the DNA double-strand break repair machinery of plants. *DNA Repair* **5**, 1–12.
- Borghouts, C., Scheckhuber, O.S. y Osiewacz, H.D. (2002)** Copper homeostasis and aging in the fungal model system *Podospora anserina*: differential expression of PaCtr3 encoding a copper transporter. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **34**, 1355-1371.
- Borjigin, J., Payne, A., Deng, J., Li, X., Wang, M.M., Ovodenko, B., Gitlin, J.D. y Snyder, S.H. (1999)** A novel pineal night-specific ATPase encoded by the Wilson disease gene. *The Journal of Neuroscience* **19**, 1018–1026.
- Bowler, C., Alliotte, T., De Loose, M., Van Montagu, M., y Inzé, D. (1989)** The induction of manganese superoxide dismutase in response to stress in *Nicotiana plumbaginifolia*. *The EMBO Journal* **8**, 31-8.
- Bowler, C., Van Camp, W., Van Montagu, M. e Inzé, D. (1994)** Superoxide dismutases in plants. *Critical Reviews in Plant Sciences* **13**, 199-218.
- Bradford, M.M. (1976)** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**, 248-54.
- Briat, J.F., Curie, C. y Gaymard, F. (2007)** Iron utilization and metabolism in plants. *Current Opinion in Plant Biology*. **10**, 276-82.
- Brown, S.L., Chaney, R.L., Angle, J.S. y Baker, A.J.M. (1995)** Zinc and cadmium uptake of *Thlaspi caerulescens* grown under nutrient solution. *Soil Science Society of America Journal* **59**, 125-133.
- Bruinsma, J. (1961)** A comment on the spectrophotometric determination of chlorophyll. *Biochimica et Biophysica Acta* **52**, 576-8.
- Brun, L.A., Maillet, J., Hinsinger, P. y Pepin, M. (2001)** Evaluation of copper availability to plants in copper-contaminated vineyard soils. *Environmental Pollution* **111**, 293-302.
- Buer, C.S., Wasteneys, G.O. y Masle, J. (2003)** Ethylene modulates root-wave responses in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **132**, 1085–1096.
- Burkhead, J.L., Abdel-Ghany, S.E., Morrill, J.M., Pilon-Smits, E.A. y Pilon, M. (2003)** The *Arabidopsis thaliana* *CUTA* gene encodes an evolutionarily conserved copper binding chloroplast protein. *The Plant Journal* **34**, 856-67.
- Camakaris, J., Petris, M.J., Bailey, L., Shen, P., Lockhart, P., Glover, T.W., Barcroft, C., Patton, J. y Mercer, J.F. (1995)** Gene amplification of the Menkes (MNK; ATP7A) P-type ATPase gene of CHO cells is associated with copper resistance and enhanced copper efflux.

*Human Molecular Genetics* **4**, 2117-2123.

- Cardon, G., Höhmann, S., Klein, J., Nettesheim, K., Saedler, H. y Huijser, P. (1999)** Molecular characterisation of the *Arabidopsis* SBP-box genes. *Gene* **237**, 91–104.
- Carroll, M.C., Girouard, J.B., Ulloa, J.L., Subramaniam, J.R., Wong, P.C., Valentine, J.S. y Culotta, V.C. (2004)** Mechanisms for activating Cu- and Zn-containing superoxide dismutase in the absence of the CCS Cu chaperone. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **101**, 5964-5969.
- Chan, C.S., Guo, L. y Shih, M.C. (2001)** Promoter analysis of the nuclear gene encoding the chloroplast glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase B subunit of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology* **46**, 131-141.
- Chen, Y.F., Randlett, M.D., Findell, J.L. y Schaller, G.E. (2002)** Localization of the ethylene receptor ETR1 to the endoplasmic reticulum of *Arabidopsis*. *The Journal of Biological Chemistry* **277**, 19861-19866.
- Chiou, T.-J. (2007)** The role of microRNAs in sensing nutrient stress. *Plant, Cell & Environment* **30**, 323–332.
- Cho, S.H., Hoang, Q.T., Phee, J.W., Kim, Y.Y., Shin, H.Y. y Shin, J.S. (2007)** Modified suppression subtractive hybridization identifies an AP2-containing protein involved in metal responses in *Physcomitrella patens*. *Molecules and Cells* **23**, 100-107.
- Choi, H., Hong, J., Ha, J., Kang, J. y Kim, S.Y. (2000)** ABFs, a family of ABA-responsive element binding factors. *The Journal of Biological Chemistry* **275**, 1723-30.
- Chu, C.C., Lee, W.C., Guo, W.Y., Pan, S.M., Chen, L.J., Li, H.M. y Jinn, T.L. (2005)** A copper chaperone for superoxide dismutase that confers three types of copper/zinc superoxide dismutase activity in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*. **139**, 425-436.
- Clemens, S., Palmgen, M.G. y Krämer, U. (2002)** A long way ahead: understanding and engineering plant metal accumulation. *Trends in Plant Science* **7**, 309-315.
- Clough, S.J. y Bent, A.F. (1998)** Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* **12**, 735-743.
- Cobbett, C. y Goldsbrough, P. (2002)** Phytochelatins and metallothioneins: roles in heavy metal detoxification and homeostasis. *Annual Review of Plant Biology* **53**, 159-82.
- Cobbold, C., Ponnambalam, S., Francis, M.J. y Monaco, A.P. (2002)** Novel membrane traffic steps regulate the exocytosis of the Menkes disease ATPase. *Human Molecular Genetics* **11**, 2855-2866.
- Cobine, P.A., Pierrel, F. y Winge, D.R. (2006)** Copper trafficking to the mitochondrion and assembly of copper metalloenzymes. *Biochimica et Biophysica Acta* **1763**, 759-72.
- Cohen, C.K., Norwell, W.A. y Kochian, L.V. (1997)** Induction of root cell plasma membrane

- ferric reductase. *Plant Physiology* **114**, 1061-1069.
- Colot, V., Robert, L.S., Kavanagh, T.A., Bevan, M.W. y Thompson, R.D. (1987)** Localization of sequences in wheat endosperm protein genes which confer tissue-specific expression in tobacco. *The EMBO Journal* **6**, 3559-64.
- Company, P. y González-Bosch, C. (2003)** Identification of a copper chaperone from tomato fruits infected with *Botrytis cinerea* by differential display. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **304**, 825-830.
- Cona, A., Rea, G., Angelini, R., Federico, R. y Tavladoraki, P. (2006)** Functions of amine oxidases in plant development and defence. *Trends in Plant Science* **11**, 80-.
- Connolly, E.L., Campbell, N.H., Grotz, N., Prichard, C.L. y Guerinot, M.L. (2003)** Overexpression of the FRO2 ferric chelate reductase confers tolerance to growth on low iron and uncovers posttranscriptional control. *Plant Physiology* **133**, 1102-1110.
- Cosgrove, D.J. (2005)** Growth of the plant cell wall. *Nature reviews. Molecular Cell Biology* **6**, 850-861.
- Crichton, R.R. y Pierre, J.L. (2001)** Old iron, young copper: from Mars to Venus. *Biometals* **14**, 99-112.
- Crouch, P.J., White, A.R. y Bush, A.I. (2007)** The modulation of metal bio-availability as a therapeutic strategy for the treatment of Alzheimer's disease. *The FEBS Journal* **274**, 3775-83.
- Culotta, V.C., Yang, M. y O'Halloran, T.V. (2006)** Activation of superoxide dismutases: Putting the metal to the pedal. *Biochimica et Biophysica Acta* **1763**, 747-758.
- Curie, C., Panaviene, Z., Loulergue, C., Dellaporta, S.L., Briat, J-F. y Walker, E.L. (2001)** Maize yellow stripe1 encodes a membrane protein directly involved in Fe(III) uptake. *Nature* **409**, 346-349.
- Dancis, A., Haile, D., Yuan, D.S. y Klausner, R.D. (1994a)** The *Saccharomyces cerevisiae* copper transport protein (Ctr1p). Biochemical characterization, regulation by copper and physiologic role in copper uptake. *The Journal of Biological Chemistry* **269**, 25660-25667.
- Dancis, A., Yuan, D.S., Haile, D., Askwith, C., Eide, D., Mohele, C., Kaplan, J. y Klausner, R.D. (1994b)** Molecular characterization of a copper transport protein in *S. cerevisiae*: an unexpected role for copper in iron transport. *Cell* **76**, 393-402.
- De Boer, D., Cremers, F., Teertstra, R., Smits, L., Hille, J., Smeekens, S. y Weisbeek, P. (1988)** In vivo import of plastocyanin and a fusion protein into developmentally different plastids of transgenic plants. *The EMBO Journal* **7**, 2631-35.
- De Vos, C.H.R., Vooijs, R., Schat, H. y Ernst, W.H.O. (1989)** Copper-induced damage to the permeability barrier in roots of *Silene cucubalus*. *Journal of Plant Physiology* **135**, 164-169.



- DiDonato, R.J., Roberts, L.A., Sanderson, T., Eisley, R.B. y Walker, E.L. (2004)** Arabidopsis Yellow Stripe-Like2 (YSL2): a metal-regulated gene encoding a plasma membrane transporter of nicotianamine–metal complexes. *The Plant Journal* **39**, 403–414.
- Dietz, K.J., Jacob, S., Oelze, M.L., Laxa, M., Tognetti, V., de Miranda, S.M., Baier, M. y Finkemeier, I. (2006)** The function of peroxiredoxins in plant organelle redox metabolism. *Journal of Experimental Botany* **57**, 1697-709.
- Dong, J., Kim, S.T. y Lord, E.M. (2005)** Plantacyanin plays a role in reproduction in Arabidopsis. *Plant Physiology*. **138**, 778–789.
- Drazkiewicz, M., Skórzyńska-Polit, E. y Krupa, Z. (2004)** Copper-induced oxidative stress and antioxidant defence in *Arabidopsis thaliana*. *Biometals* **17**, 379-87.
- Dunlap, J.C. (2004)** Kinases and circadian clocks: per goes it alone. *Developmental cell* **6**, 160-1.
- Durrett, T.P., Gassmann, W., Rogers, E.E. (2007)** The FRD3-mediated efflux of citrate into the root vasculature is necessary for efficient iron translocation. *Plant Physiology*. **144**, 197-205.
- Eisses, J.F. y Kaplan, J.H. (2002)** Molecular characterization of hCTR1, the human copper uptake protein. *The Journal of Biological Chemistry* **277**, 29162-29171.
- Ellerstrom, M., Stalberg, K., Ezcurra, I. y Rask, L. (1996)** Functional dissection of a napin gene promoter: identification of promoter elements required for embryo and endosperm-specific transcription. *Plant Molecular Biology* **32**, 1019-1027.
- Elmayan, T. y Tepfer, M. (1995)** Evaluation in tobacco of the organ specificity and strength of the rol D promoter, domain A of the 35S promoter and the 35S2 promoter. *Transgenic Research* **4**, 388-396.
- Eriksson, M., Moseley, J.L., Tottey, S., Del Campo, J.A., Quinn, J., Kim, Y. y Merchant, S. (2004)** Genetic dissection of nutritional copper signaling in *Chlamydomonas* distinguishes regulatory and target genes. *Genetics* **168**, 795-807.
- Eulgem, T., Rushton, P.J., Schmelzer, E., Hahlbrock, K. y Somssich, I.E. (2003)** Early nuclear events in plant defence signalling: rapid gene activation by WRKY transcription factors. *The EMBO Journal* **18**, 4689-4699.
- Ezcurra, I., Ellerstrom, M., Wycliffe, P., Stalberg, K. y Rask, L. (1999)** Interaction between composite elements in the napA promoter: both the B-box ABA-responsive complex and the RY/G complex are necessary for seed-specific expression. *Plant Molecular Biology* **40**, 699-709.
- Ferrando, A., Farràs, R., Jásik, J., Schell, J. y Koncz, C. (2000)** Intron-tagged epitope: a tool for facile detection and purification of proteins expressed in *Agrobacterium*-transformed plant cells. *The Plant Journal* **22**, 553-60.
- Foley, R.C. y Singh, K.B. (1994)** Isolation of a *Vicia faba* metallothionein-like gene: expression

- in foliar trichomes. *Plant Molecular Biology* **26**, 435-444.
- Foster, R., Mattsson, O. y Mundy, J. (2003)** Plants flex their skeletons. *Trends in Plant Science* **8**, 202-204.
- Fox, T.C. y Guerinot, M.L. (1998)** Molecular biology of cation transport in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **49**, 669-696.
- Fuchs, J., Demidov, D., Houben, A. y Schubert, I. (2006)** Chromosomal histone modification patterns – from conservation to diversity. *Trends in Plant Science* **11**, 199-208.
- Fujiwara, T. y Beachy, R.N. (1994)** Tissue-specific and temporal regulation of a beta-conglycinin gene: roles of the RY repeat and other cis-acting elements. *Plant Molecular Biology* **24**, 261-272.
- Gandikota, M., Birkenbihl, R.P., Höhmann, S., Cardon, G.H., Saedler, H. y Huijser, P. (2007)** The miRNA156/157 recognition element in the 3' UTR of the Arabidopsis SBP box gene SPL3 prevents early flowering by translational inhibition in seedlings. *The Plant Journal* **49**, 683–693.
- García-Hernández, M., Murphy, A. y Taiz, L. (1998)** Metallothioneins I and II have distinct but overlapping expression patterns in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **118**, 387-397.
- Gaxiola, R.A., Palmgren, M.G. y Schumacher, K. (2007)** Plant proton pumps. *FEBS Letters* **581**, 2204-14.
- Gietz, R.D., Schiestl, R.H., Willems, A.R y Woods, R.A. (1995)** Studies on the transformation of intact yeast cells by the LiAc/SS-DNA/PEG procedure. *Yeast* **11**, 355-360.
- Graham, R.D. (1975)** Male sterility in wheat plants deficient in copper. *Nature* **254**, 514-515.
- Gredilla, R., Grief, J. y Osiewacz, H.D. (2006)** Mitochondrial free radical generation and lifespan control in the fungal aging model *Podospora anserina*. *Experimental Gerontology* **41**, 439-47.
- Grotz, N. y Guerinot, M.L. (2006)** Molecular aspects of Cu, Fe and Zn homeostasis in plants. *Biochimica et Biophysica Acta* **1763**, 595–608.
- Grotz, N., Fox, T., Connolly, E., Park, W., Guerinot, M.L. y Eide, D. (1998)** Identification of a family of zinc transporter genes from *Arabidopsis* that respond to zinc deficiency. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **95**, 7220-7224.
- Grubb, C.D. y Abel, S. (2006)** Glucosinolate metabolism and its control. *Trends in Plant Science* **11**, 89-100.
- Grusak, M.A. y Pezeshgi, S. (1996)** Shoot-to-root signal transmission regulates root Fe(III) reductase activity in the *dgl* mutant of pea. *Plant Physiology* **110**, 329-334.
- Gutiérrez-Alcalá, G., Gotor, C., Meyer, A.J., Fricker, M., Vega, J.M. y Romero, L.C. (2000)** Glutathione biosynthesis in *Arabidopsis* trichome cells. *Proceedings of the National*

- Academy of Sciences USA* **97**, 11108-13.
- Gutterson, N. y Reuber, T.L. (2004)** Regulation of disease resistance pathways by AP2/ERF transcription factors. *Current Opinion in Plant Biology* **7**, 465-71.
- Halliwell, B. y Gutteridge, J.M.C. (1989)** Free radicals in biology and medicine. Clarendon Press (Eds), Oxford, U.K.
- Hanahan, D. (1983)** Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology* **166**, 557-580.
- Harmer, S.L., Hogenesch, J.B., Straume, M., Chang, H-S., Han, B., Zhu, T., Wang, X., Kreps, J.A. y Kay, S.A. (2000)** Orchestrated transcription of key pathways in *Arabidopsis* by the circadian clock. *Science* **290**, 2110-2113.
- Harrison, M.D., Jones, C.E., Solioz, M. y Dameron, C.T. (2000)** Intracellular copper routing: the role of copper chaperones. *Trends in Biochemical Sciences* **25**, 29-32.
- Hartung, F. y Puchta, H. (2006)** The RecQ gene family in plants. *Journal of Plant Physiology* **163**, 287-296.
- Hattori, T., Terada, T. y Hamasuna, S. (1995)** Regulation of the Osem gene by abscisic acid and the transcriptional activator VP1: analysis of cis-acting promoter elements required for regulation by abscisic acid and VP1. *The Plant Journal* **7**, 913-925.
- Haydon, M.J. y Cobbett, C.S. (2007)** Transporters of ligands for essential metal ions in plants. *The New Phytologist* **174**, 499-506.
- He Z.L., Yang X. E. y Stoffella P. J. (2005)** Trace elements in agroecosystems and impacts on the environment. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* **19**, 125-140.
- Hell, R. y Stephan, U.W. (2003)** Iron uptake, trafficking and homeostasis in plants. *Planta* **216**, 541-551.
- Herschbach, C., van Der Zalm, E., Schneider, A., Jouanin, L., De Kok, L.J. y Rennenberg, H. (2000)** Regulation of sulfur nutrition in wild-type and transgenic poplar over-expressing gamma-glutamylcysteine synthetase in the cytosol as affected by atmospheric H<sub>2</sub>S. *Plant Physiology* **124**, 461-73.
- Himelblau, E. y Amasino, R.M. (2000)** Delivering copper within plant cells. *Current Opinion in Plant Biology* **3**, 205-210.
- Himelblau, E., Mira, H., Lin, S-J., Culotta, V.C., Peñarrubia, L., y Amasino, R.M. (1998)** Identification of a functional homolog of the yeast copper-binding gene *ATX1* from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology* **117**, 1227-1234.
- Hirai, M.Y., Klein, M., Fujikawa, Y., Yano, M., Goodenowe, D.B., Yamazaki, Y., Kanaya, S., Nakamura, Y., Kitayama, M., Suzuki, H., Sakurai, N., Shibata, D., Tokuhisa, J., Reichelt, M., Gershenzon, J., Papenbrock, J. y Saito, K. (2005)** Elucidation of gene-to-

- gene and metabolite-to-gene networks in arabidopsis by integration of metabolomics and transcriptomics. *The Journal of Biological Chemistry* **280**, 25590–25595.
- Hirai, M.Y., Sugiyama, K., Sawada, Y., Tohge, T., Obayashi, T., Suzuki, A., Araki, R., Sakurai, N., Suzuki, H., Aoki, K., Goda, H., Nishizawa, O.I., Shibata, D. y Saito, K. (2007)** Omics-based identification of Arabidopsis Myb transcription factors regulating aliphatic glucosinolate biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **104**, 6478-6483.
- Hirayama, T., Kieber, J.J., Hirayama, N., Kogan, M., Guzman, P., Nourizadeh, S., Alonso, J.M., Dailey, W.P., Dancis, A. y Ecker, J.R. (1999)**. RESPONSIVE-TO-ANTAGONIST1, a Menkes/Wilson disease-related copper transporter, is required for ethylene signaling in *Arabidopsis*. *Cell* **97**, 383-393.
- Howitt, C.A. y Pogson, B.J. (2006)** Carotenoid accumulation and function in seeds and non-green tissues. *Plant, Cell & Environment* **29**, 435-45.
- Huffman, D.L. y O'Halloran, T.V. (2001)** Function, structure, and mechanism of intracellular copper trafficking proteins. *Annual Review of Biochemistry* **70**, 677-701.
- Hung, I.H., Casareno, R.L., Labesse, G., Mathews, F.S. y Gitlin, J.D. (1998)**. HAH1 is a copper-binding protein with distinct amino acid residues mediating copper homeostasis and antioxidant defense. *The Journal of Biological Chemistry* **273**, 1749-1754.
- Hung, I.H., Suzuki, M., Yamaguchi, Y., Yuan, D.S., Klausner, R.D. y Gitlin, J.D. (1997)**. Biochemical characterization of the Wilson disease protein and functional expression in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Biological Chemistry* **272**, 21461-21466.
- Hussain, D., Haydon, M.J., Wang, Y., Wong, E., Sherson, S.M., Young, J., Camarakis, J., Harper, J.F. y Cobbett, C.S. (2004)** P-type ATPase heavy metal transporters with roles in essential zinc homeostasis in Arabidopsis. *The Plant Cell*, **16**, 1327-1339.
- Inzé, D. y Van Montagu, M. (1995)** Oxidative stress in plants. *Current Opinion in Biotechnology* **6**, 153-158.
- Itzhaki, H., Maxson, J.M. y Woodson, W.R. (1994)** An ethylene-responsive enhancer element is involved in the senescence-related expression of the carnation glutathione-S-transferase (GSTI) gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **91**, 8925-8929.
- Jensen, L.T. y Culotta, V.C. (2005)** Activation of Cu/Zn superoxide dismutases from *Caenorhabditis elegans* does not require the copper chaperone CCS. *The Journal of Biological Chemistry* **280**, 41373-41379.
- Jewell, B.G., Murray, B.J. y Alloway, B.J. (1988)** Light and electron microscope studies on pollen development in barley (*Hordeum vulgare* L.) grown under copper-sufficient and deficient conditions. *Plant, Cell & Environment* **11**, 273-281.

- Jiang, L.Y., Yang, X.E. y He, Z.L. (2004)** Growth response and phytoextraction of copper at different levels in soils by *Elsholtzia splendens*. *Chemosphere* **55**, 1179-1187.
- Jiang, W., Liu, D. y Li, H. (2000)** Effects of Cu<sup>2+</sup> on root growth, cell division, and nucleolus of *Helianthus annuus* L. *The Science of the Total Environment* **256**, 59-65.
- Jonak, C., Nakagami, H., y Hirt, H. (2004)** Heavy metal stress. Activation of distinct mitogen-activated protein kinase pathways by copper and cadmium. *Plant Physiology* **136**, 3276-3283.
- Jones-Rhoades, M.W. y Bartel, D.P. (2004)** Computational identification of plant microRNAs and their targets, including a stress-induced miRNA. *Molecular Cell* **14**, 787-799.
- Kampfenkel, K., Kushnir, S., Babiychuk, E., Inze, D. y Van Montagu, M. (1995)** Molecular characterization of a putative *Arabidopsis thaliana* copper transporter and its yeast homologue. *The Journal of Biological Chemistry* **270**, 28479-28486.
- Kanamaru, K., Kashiwagi, S. y Mizuno, T. (1994)** A copper-transporting P-type ATPase found in the thylacoid membrane of the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC7942. *Molecular Microbiology* **13**, 369-377.
- Kang, J., Lin, C., Chen, J. y Liu, Q. (2004)** Copper induces histone hypoacetylation through directly inhibiting histone acetyltransferase activity. *Chemico-Biological Interactions* **148**, 115-123.
- Karley A.J., Leigh, R.A. y Sanders, D. (2000)** Where do all the ions go? The cellular basis of differential ion accumulation in leaf cells. *Trends in Plant Science* **5**, 465-470.
- Kerk, N.M., Jiang, K. y Feldman, L.J. (2000)** Auxin metabolism in the root apical meristem. *Plant Physiology* **122**, 925-932.
- Kim, S., Mollet, J-C., Dong, J., Zhang, K., Park, S-Y., y Lord, E.M. (2003)** Chemocyanin, a small basic protein from the lily stigma, induces pollen tube chemotropism. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **100**, 16125-16130.
- Kim, S.A. y Guerinot, M.L. (2007)** Mining iron: iron uptake and transport in plants. *FEBS Letters* **581**, 2273-80.
- Kim, S.J., Chung, H.J. y Thomas, T.L. (1997)** Isolation of bZIP transcription factors that interact with ABA-responsive and embryo-specification elements in the *Dc3* promoter using a modified yeast one-hybrid system. *The Plant Journal* **11**, 1237-1251.
- Kliebenstein, D.J., Monde, R-A., y Last, R.L. (1998)** Superoxide dismutase in Arabidopsis: An eclectic enzym family with disparate regulation and protein localization. *Plant Physiology* **118**, 637-650.
- Klomp, A.E., Juijn, J.A., Van Der Gun, L.T., Van Den Berg, I.E., Berger, R. y Klomp, L.W. (2003)** The N-terminus of the human copper transporter 1 (hCTR1) is localized

- extracellularly, and interacts with itself. *The Biochemical Journal* **370**, 881-9.
- Klomp, L.W., Lin, S.J., Yuan, D.S. Klausner, R.D., Cullotta, V.C. y Gitlin, J.D. (1997)** Identification and functional expression of HAH1, a novel human gene involved in copper homeostasis. *The Journal of Biological Chemistry* **272**, 9221-9226.
- Knight, S.A.B., Labbé, S., Kwon, L.F., Kosman, D.J. y Thiele, D.J. (1996)** A widespread transposable element masks expression of a yeast copper transport gene. *Genes & Development* **10**, 1917-1929.
- Koch, K.A., Peña, M.M. y Thiele, D.J. (1997)** Copper-binding motifs in catalysis, transport, detoxification and signaling. *Chemistry & Biology* **4**, 549-560.
- Krämer, U. (2005)** Phytoremediation: novel approaches to cleaning up polluted soils. *Current Opinion in Biotechnology* **16**, 133-141.
- Krämer, U., Cotter-Howells, J.D., Charnock, J.M., Baker, A.J.M. y Smith, A.C. (1996)** Free histidine as a metal chelator in plants that accumulate nickel. *Nature* **379**, 635-638.
- Krämer, U., Pickering, I.J., Prince, R.C., Raskin, I. y Salt, D.E. (2000)** Subcellular localization and speciation of nickel in hyperaccumulator and non-accumulator *Thlaspi* species. *Plant Physiology* **122**, 1343-1353.
- Krämer, U., Smith, R.D., Wenzel, W.W., Raskin, I. y Salt, D.E. (1997)** The Role of metal transport and tolerance in nickel hyperaccumulation by *Thlaspi goesingense* Halacsy. *Plant Physiology* **115**, 1641-1650.
- Krämer, U., Talke, I.N. y Hanikenne, M. (2007)** Transition metal transport. *FEBS Letters* **581**, 2263-72.
- Krieger-Liszkay, A. y Trebst, A. (2006)** Tocopherol is the scavenger of singlet oxygen produced by the triplet states of chlorophyll in the PSII reaction centre. *Journal of Experimental Botany* **57**, 1677-84.
- Kropat, J., Tottey, S., Birkenbihl, R.P., Depege, N., Huijser, P. y Merchant, S. (2005)** A regulator of nutritional copper signaling in *Chlamydomonas* is an SBP domain protein that recognizes the GTAC core of copper response element. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **102**, 18730-18735.
- Krüger, C., Berkowitz, O., Stephan, U.W. y Hell, R. (2002)** A metal-binding member of the late embryogenesis abundant protein family transports iron in the phloem of *Ricinus communis* L. *The Journal of Biological Chemistry* **277**, 25062-25069.
- Kubo, A., Saji, H., Tanaka, K. y Kondo, N. (1992)** Cloning and sequencing of a cDNA encoding ascorbate peroxidase from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology* **18**, 691-701.
- Kühlbrandt, W. (2004)** Biology, structure and mechanism of P-type ATPases. *Nature reviews*.

*Molecular Cell Biology* **5**, 282-295.

- Kuper, J., Angel Llamas , Hans-Jürgen Hecht , Ralf R. Mendel y Günter Schwarz (2004)** Structure of the molybdopterin-bound Cnx1G domain links molybdenum and copper metabolism. *Nature* **430**, 803-806.
- La Fontaine, S., Quinn, J. y Merchant, S. (2002)** Comparative analysis of copper and iron metabolism in photosynthetic eukaryots vs yeast and mammals. *Handbook of Pharmacology and Toxicology*, Massaro E.J. ed. Humana Press (Eds.), Totowa, N.J., 481-502.
- Laemmli, U.K. (1970)** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lagrange, T., Hakimi, M.A., Pontier, D., Courtois, F., Alcaraz, J.P., Grunwald, D., Lam, E. y Lerbs-Mache, S. (2003)** Transcription factor IIB (TFIIB)-related protein (pBrp), a plant-specific member of the TFIIB-related protein family. *Molecular and Cellular Biology* **23**, 3274-86.
- Lanquar, V., Lelièvre, F., Bolte, S., Hamès, C., Alcon, C., Neumann, D., Vansuyt, G., Curie, C., Schröder, A., Krämer, U., Barbier-Brygoo, H. y Thomine, S. (2005)** Mobilization of vacuolar iron by AtNRAMP3 and AtNRAMP4 is essential for seed germination on low iron. *The EMBO Journal* **24**, 4041-51.
- Le Jean, M., Schikora, A., Mari, S., Briat, J-F. y Curie, C. (2005)** A loss-of-function mutation in ATYSL1 reveals its role in iron and nicotianamine seed loading. *The Plant Journal* **44**, 769-782.
- Lee, J., Peña, M.M.O., Nose, Y. y Thiele, D.J. (2002)** Biochemical characterization of the human copper transporter Ctrl. *The Journal of Biological Chemistry* **272**, 4380-4387.
- Lee, J., Prohaska, J.R. y Thiele, D.J. (2001)** Essential role for mammalian copper transporter Ctrl in copper homeostasis and embryonic development. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **98**, 6842-7.
- Li, H.H. y Merchant, S. (1995)** Degradation of plastocyanin in copper-deficient *Chlamydomonas reinhardtii*. Evidence for a protease-susceptible conformation of the apoprotein and regulated proteolysis. *The Journal of Biological Chemistry* **270**, 23504-10.
- Lin, C., Kang, J. y Zheng, R. (2005)** Oxidative stress is involved in inhibition of copper on histone acetylation in cells. *Chemico-Biological* **151**, 167-176.
- Ling, H.Q., Pich, A., Scholz, G. y Ganai, M.W. (1996)** Genetic analysis of two tomato mutants affected in the regulation of iron metabolism. *Molecular & General Genetics* **252**, 87-92.
- Lippard, S.J. y Berg, J.M. (1994)** Principles of bioinorganic chemistry. *University Science Books* (Eds.), Mill Valley, CA.
- Liu, D., Jiang, W.S. y Hou, W.Q. (2001a)** Uptake and accumulation of copper by roots and

- shoots of maize (*Zea mays* L.). *Journal of Environmental Sciences* **13**, 228-232.
- Liu, D., Xie, J., Yang, S. y Shen, H. (2001b)** Effects of copper mine tailing on growth and developmental and physiological function of wheat. *The Journal of Applied Ecology* **12**, 455-457.
- Llorens, N., Arola, L., Blade, C. y Mas, A. (2000)** Effects of copper exposure upon nitrogen metabolism in tissue-cultured *Vitis vinifera*. *Plant Science* **160**, 159-163.
- Lutsenko, S. y Petris, M.J. (2002)** Function and regulation of the mammalian copper-transporting ATPases: Insights from biochemical and cell biological approaches. *The Journal of Membrane Biology* **191**, 1-12.
- Ma, J.F., Ryan, P.R. y Delhaize, E. (2001)** Aluminum tolerance in plants and the complexing role of organic acids. *Trends in Plant Science* **6**, 273-282.
- MacFarlane, G.R. y Burchett, M.D. (2002)** Toxicity, growth and accumulation relationships of copper, lead and zinc in the grey mangrove *Avicennia marina* (Forsk.) Vierh. *Marine Environmental Research* **54**, 65-84.
- Macnair, M.R. (1993)** The genetics of metal tolerance in vascular plants. *The New Phytologist* **124**, 541-559.
- Malamy, J.E. y Ryan, K.S. (2001)** Environmental regulation of lateral root initiation in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **127**, 899-909.
- Mandal, A.K., Yang, Y., Kertesz, T.M. y Argüello, J.M. (2004)** Identification of the transmembrane metal binding site in Cu<sup>+</sup>-transporting P<sub>1B</sub>-type ATPases. *The Journal of Biological Chemistry* **279**, 54802-7.
- Marschner, H. (2002)** Mineral nutrition in higher plants. *Academic Press (Eds.)*, London, UK.
- Marusek, C.M., Trobaugh, N.M., Flurkey, W.H. y Inlow, J.K. (2006)** Comparative analysis of polyphenol oxidase from plant and fungal species. *Journal of Inorganic Biochemistry* **100**, 108-23.
- May, M.J., Vernoux, T., Sánchez-Fernández, R., Van Montagu, M. e Inzé, D. (1998)** Evidence for posttranscriptional activation of gamma-glutamylcysteine synthetase during plant stress responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **95**, 12049-12054.
- McBride, M.B. (2001)** Cupric ion activity in peat soil as a toxicity indicator for maize. *Journal of Environmental Quality* **30**, 78-84.
- McCarty, D.R., Hattori, T., Carson, C.B., Vasil, V., Lazar, M. y Vasil, I.K. (1991)** The Viviparous-1 developmental gene of maize encodes a novel transcriptional activator. *Cell* **66**, 895-905.
- McClung, C.R. (2006)** Plant circadian rhythms. *The Plant Cell* **18**, 792-803.



- Mena, M., Cejudo, F.J., Isabel-Lamoneda, I. y Carbonero, P. (2002)** A role for the DOF transcription factor BPBF in the regulation of gibberellin-responsive genes in barley aleurone. *Plant Physiology* **130**, 111-119.
- Mendel, R.R. (2005)** Molybdenum: biological activity and metabolism. *Dalton Transactions* **21**, 3404-9.
- Mendel, R.R. y Bittner, F. (2006)** Cell biology of molybdenum. *Biochimica et Biophysica Acta* **1763**, 621-35.
- Merchant, S.S., Allen, M.D., Kropat, J., Moseley, J.L., Long, J.C., Tottey, S. y Terauchi, A.M. (2006)** Between a rock and a hard place: Trace element nutrition in *Chlamydomonas*. *Biochimica et Biophysica Acta* **1763**, 578-94.
- Mira, H., Martínez-García, F. y Peñarrubia, L. (2001a)** Evidence for the plant-specific intercellular transport of the Arabidopsis copper chaperone CCH. *The Plant Journal* **25**, 521-528.
- Mira, H., Vilar, M., Esteve, V., Martinell, M., Kogan, M.J., Giralt, E., Salom, D., Mingarro, I., Peñarrubia, L. y Pérez-Payá, E. (2004)** Ionic self-complementarity induces amyloid-like fibril formation in an isolated domain of a plant copper metallochaperone protein. *BMC Structural Biology* **4**, 7.
- Mira, H., Vilar, M., Pérez-Payá, E. y Peñarrubia, L. (2001b)** Functional and conformational properties of the exclusive C-domain from the *Arabidopsis* copper chaperone (CCH). *The Biochemical Journal* **357**, 545-549.
- Mithöfer, A., Schulze, B. y Boland, W. (2004)** Biotic and heavy metal stress response in plants: evidence for common signals. *FEBS Letters* **566**, 1-5.
- Mittler, R. y Zilinskas, B.A. (1991)** Molecular cloning and nucleotide sequence analysis of a cDNA encoding pea cytosolic ascorbate peroxidase. *FEBS Letters* **289**, 257-259.
- Mori, S. (1999)** Iron acquisition by plants. *Current Opinion in Plant Biology* **2**, 250-253.
- Mukherjee, I., Campbell, N.H., Ash, J.S. y Connolly, E.L. (2006)** Expression profiling of the Arabidopsis ferric chelate reductase (FRO) gene family reveals differential regulation by iron and copper. *Planta* **223**, 1178-90.
- Mumberg, D., Müller, R. y Funk, M. (1995)** Yeast vectors for the controlled expression of heterologous proteins in different genetic backgrounds. *Gene* **156**, 119-122.
- Murashige, T. y Skoog, F. (1962)** A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum* **15**, 437-497.
- Murphy, A. y Taiz, L. (1995)** Comparison of metallothionein gene expression and non-protein thiols in ten *Arabidopsis* ecotypes. Correlation with copper tolerance. *Plant Physiology* **109**, 945-954.

- Murphy, A., Zhou, J., Goldsbroug, P.B. y Taiz, L. (1997)** Purification and immunological identification of metallothionein 1 and 2 from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology* **113**, 1293-1301.
- Nakamura, K. y Go, N. (2005)** Function and molecular evolution of multicopper blue proteins. *Cellular and Molecular Life Sciences* **62**, 2050-66.
- Nakamura, M., Tsunoda, T. y Obokata, J. (2002)** Photosynthesis nuclear genes generally lack TATA-boxes: a tobacco photosystem I gene responds to light through an initiator. *The Plant Journal* **29**, 1-10.
- Nose, Y., Rees, E.M. y Thiele, D.J. (2006)** Structure of the Ctr1 copper trans'PORE'ter reveals novel architecture. *Trends in Biochemical Sciences* **31**, 604-607.
- Ochiai, E-I. (1995)** Toxicity of heavy metals and biological defense. Principles and applications in bioinorganic chemistry-VII. *Journal of Chemical Education* **72**, 479-484.
- Ogawa, M., Hanada, A., Yamauchi, Y., Kuwahara, A., Kamiya, Y. y Yamaguchi, S. (2003)** Gibberellin biosynthesis and response during *Arabidopsis* seed germination. *The Plant Cell* **15**, 1591-1604.
- O'Halloran, T.V. y Culotta, V.C. (2000)** Metallochaperones, an intracellular shuttle service for metal ions. *The Journal of Biological Chemistry* **275**, 25057-60.
- Oparka, K.J. y Roberts, A.G. (2001)** Plasmodesmata. A not so open-and-shut case. *Plant Physiology* **125**, 123-6.
- Palmgren, M.G. (2001)** Plant Plasma Membrane H<sup>+</sup>-ATPases: Powerhouses for nutrient uptake. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **52**, 817-45.
- Parker, D.R., Pedler, J.F., Ahnstrom Z.A. y Resketo, M. (2001)** Reevaluating the free-ion activity of trace metal toxicity toward higher plants: experimental evidence with copper and zinc. *Environmental Toxicology and Chemistry* **20**, 899-906.
- Pase, L., Voskoboinik, I., Greenough, M. y Camarakis, J. (2004)** Copper stimulates trafficking of a distinct pool of the Menkes copper ATPase (ATP7A) to the plasma membrane and diverts it into a rapid recycling pool. *The Biochemical Journal* **378**, 1031-1037.
- Pasternak, T., Rudas, V., Potters, G. y Jansen, M.A.K. (2005)** Morphogenic effects of abiotic stress: reorientation of growth in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Environmental and Experimental Botany* **53**, 299-314.
- Peña, M.M., Lee, J. y Thiele, D.J. (1999)**. A delicate balance: homeostatic control of copper uptake and distribution. *The Journal of Nutrition* **129**, 1251-1260.
- Peña, M.M., Puig, S. y Thiele, D.J. (2000)**. Characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* high affinity copper transporter Ctr3. *The Journal of Biological Chemistry* **275**, 244-251.
- Pence, N.S., Larsen, P.B., Ebbs, S.D., Letham, D.L., Lasat, M.M., Garvin, D.F., Eide, D. y**

- Kochian, L.V. (2000)** The molecular physiology of heavy metal transport in the Zn/Cd hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **97**, 4956-4960.
- Petris, M.J., Mercer, J.F.B., Culvenor, J.U.G., Lockhart, P., Gleeson, P.A. y Camarakis, J. (1996)**. Ligand-regulated transport of the Menkes copper P-type ATPase efflux pump from the Golgi apparatus to the plasma membrane. A novel mechanism of regulated trafficking. *The EMBO Journal* **15**, 6084-6095.
- Petris, M.J., Voskoboinik, I., Cater, M., Smith, K., Kim, B.E., Llanos, R.M., Strausak, D., Camakaris, J. y Mercer, J.F. (2002)**. Copper-regulated trafficking of the Menkes disease copper ATPase is associated with formation of a phosphorylated catalytic intermediate. *The Journal of Biological Chemistry* **277**, 46736-46742.
- Phung, L.T., Ajlani, G. y HaselKorn, R. (1994)** P-type ATPase from the cyanobacterium *Synechococcus* 7942 related to the human Menkes and Wilson disease gene products. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **91**, 9651-9654.
- Piechulla, B., Merforth, N. y Rudolph, B. (1998)** Identification of tomato Lhc promoter regions necessary for circadian expression. *Plant Molecular Biology* **38**, 655-662.
- Pilon, M., Abdel-Ghany, S.E., CoHu, C.M., Gogolin, K.A. y Ye, H. (2006)**. Copper cofactor delivery in plant cells. *Current Opinion in Plant Biology* **9**, 256-63.
- Pilon-Smits, E.A., Garifullina, G.F., Abdel-Ghany, S., Kato, S., Mihara, H., Hale, K.L., Burkhead, J.L., Esaki, N., Kurihara, T. y Pilon, M. (2002)** Characterization of a NifS-like chloroplast protein from *Arabidopsis*. Implications for its role in sulfur and selenium metabolism. *Plant Physiology* **130**, 1309-18.
- Pufahl, R.A., Singer, C.P., Peariso, K.L., Lin, S.J., Schmidt, P.J., Fahrni, C.J., Culotta, V.C., Penner-Hahn, J.E. y O'Halloran, T.V. (1997)** Metal ion chaperone function of the soluble Cu(I) receptor Atx1. *Science* **278**, 853-856.
- Puig, S. y Thiele, D.J. (2002)** Molecular mechanisms of copper uptake and distribution. *Current Opinion in Chemical Biology* **6**, 171-180.
- Puig, S., Andrés-Colás, N., García-Molina, A. y Peñarrubia, L. (2007a)** Copper and iron homeostasis in *Arabidopsis*: responses to metal deficiencies, interactions and biotechnological applications. *Plant, Cell & Environment* **3**, 271-290.
- Puig, S., Lee, J., Lau, M. y Thiele, D.J. (2002)** Biochemical and genetic analysis of yeast and human high affinity copper transporters suggest a conserved mechanism for copper uptake. *The Journal of Biological Chemistry* **277**, 26021-26030.
- Puig, S., Mira, H., Dorcey, E., Sancenón, V., Andrés-Colás, N., García-Molina, A., Burkhead, J.L., Gogolin, K.A., Abdel-Ghany, S.E., Thiele, D.J., Ecker, J.R., Pilon, M. y**

- Peñarrubia, L. (2007b)** Higher plants possess two different types of ATX1-like copper chaperones. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **354**, 385-390.
- Quinn, J.M. y Merchant, S. (1995)** Two copper-responsive elements associated with the *Chlamydomonas Cyc6* gene function as targets for transcriptional activators. *The Plant Cell* **7**, 623-628.
- Quinn, J.M., Barraco, P., Eriksson, M. y Merchant, S. (2000)** Coordinate copper- and oxygen-responsive *Cyc6* and *Cpx1* expression in *Chlamydomonas* is mediated by the same element. *The Journal of Biological Chemistry* **275**, 6080-6089.
- Quinn, J.M., Eriksson, M., Moseley, J.L. y Merchant, S. (2002)** Oxygen deficiency responsive gene expression in *Chlamydomonas reinhardtii* through a copper-sensing signal transduction pathway. *Plant Physiology* **128** (2), 463-71.
- Rae, T.D., Schmidt, P.J., Pufahl, R.A., Culotta, V.C. y O'Halloran, T.V. (1999)** Undetectable intracellular free copper: the requirement of a copper chaperone for superoxide dismutase. *Science* **284**, 805-808.
- Rausch, T. y Wachter, A. (2005)** Sulfur metabolism: a versatile platform for launching defence operations. *Trends in Plant Science* **10**, 503-509.
- Rausser, W.E. (1999)** Structure and function of metal chelators produced by plants. *Cell Biochemistry and Biophysics* **31**, 19-48.
- Rawat, R., Xu, Z.F., Yao, K.M. y Chye, M.L. (2005)** Identification of cis-elements for ethylene and circadian regulation of the *Solanum melongena* gene encoding cysteine proteinase. *Plant Molecular Biology* **57**, 629-43.
- Rea, P.A., Li, Z.S., Lu, Y.P., Drozdowicz, Y.M. y Martinoia, E. (1998)** From vacuolar GS-X pumps to multispecific ABC transporters. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **49**, 727-760.
- Rees, E.M. y Thiele, D.J. (2004)** From aging to virulence: forging connections through the study of copper homeostasis in eukaryotic microorganisms. *Current Opinion in Microbiology* **7**, 175-184.
- Rees, E.M., Lee, J. y Thiele, D.J. (2004)** Mobilization of intracellular copper stores by the *ctr2* vacuolar copper transporter. *The Journal of Biological Chemistry* **279**, 54221-54229.
- Reeve, W.G., Tiwari, R.P., Kale, N.B., Dilworth, M.J. y Glenn, A.R. (2002)** ActP controls copper homeostasis in *Rhizobium leguminosar* and *Sinorhizobium meliloti* preventing low pH-induced copper toxicity. *Molecular Microbiology* **43**, 981-991.
- Rensing, C., Ghosh, M. y Rosen, B.P. (2000)** CopA: an *Escherichia coli* Cu(I)-translocating P-type ATPase. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **97**, 652-656.
- Robinson, N.J., Procter, C.M., Connolly, E.L. y Guerinot, M.L. (1999)** A ferric-chelate

- reductase for iron uptake from soils. *Nature* **397**, 694-697.
- Rodríguez, F.I., Esch, J.J., Hall, A.E., Binder, B.M., Schaller, G.E. y Bleecker, A.B. (1999).** A copper cofactor for the ethylene receptor ETR1 from *Arabidopsis*. *Science* **283**, 996-998.
- Rogers, H.J., Bate, N., Combe, J., Sullivan, J., Sweetman, J., Swan, C., Lonsdale, D.M. y Twell, D. (2001)** Functional analysis of cis-regulatory elements within the promoter of the tobacco late pollen gene g10. *Plant Molecular Biology* **45**, 577-585.
- Roosens, N.H., Bernard, C., Lepiae, R. y Verbruggen, N. (2004)** Evidence for copper homeostasis function of metallothionein (MT3) in the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *FEBS Letters* **577**, 9-16.
- Rose, A., Meier, I. y Wienand, U. (1999)** The tomato I-box binding factor LeMYBI is a member of a novel class of myb-like proteins. *The Plant Journal* **20**, 641-52.
- Rutherford, J.C., Cavet, J.S. y Robinson, N.J. (1999)** Cobalt-dependent transcriptional switching by a dual-effector MerR-like protein regulates a cobalt-exporting variant CPx-type ATPase. *The Journal of Biological Chemistry* **274**, 25827-25832.
- Salt, D.E., Price, R.C., Pickering, I.J. y Raskin, I. (1995)** Mechanisms of cadmium mobility and accumulation in Indian mustard. *Plant Physiology* **109**, 1427-1433.
- Salt, D.E., Smith, R.D. y Raskin, I. (1998)** Phytoremediation. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **49**, 643-668.
- Sancenón, V., Puig, S., Mateu-Andrés, I., Dorcey, E., Thiele, D.J. y Peñarrubia, L. (2004)** The Arabidopsis copper transporter COPT1 functions in root elongation and pollen development. *The Journal of Biological Chemistry* **279**, 15348-15355.
- Sancenón, V., Puig, S., Mira, H., Thiele, D.J. y Peñarrubia, L. (2003)** Identification of a copper transporter family in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology* **51**, 577-587.
- Schaaf, G., Schikora, A., Häberle, J., Vert, G., Ludewig, U., Briat, J-F., Curie, C. y Von Wirén, N. (2005)** A putative function for the arabidopsis Fe-phytosiderophore transporter homolog AtYSL2 in Fe and Zn homeostasis. *The Plant Cell Physiology* **46**, 762-774.
- Schaeffer, H.J. y Weber, M.J. (1999)** Mitogen-activated protein kinases: specific messages from ubiquitous messengers. *Molecular and Cellular Biology* **19**, 2435-44.
- Schlieff, M.L., West, T., Craig, A.M., Holtzman, D.M. y Gitlin, J.D. (2006)** Role of the Menkes copper-transporting ATPase in NMDA receptor-mediated neuronal toxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **103**, 14919-24.
- Schützendübel, A. y Polle, A. (2002)** Plant responses to abiotic stresses: heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization. *Journal of Experimental Botany* **53**, 1351-1365.
- Sedbrook, J.C., Carroll, K.L., Hung, K.F., Masson, P.H. y Somerville, C.R. (2002)** The

- Arabidopsis *SKU5* gene encodes an extracellular glycosyl phosphatidylinositol-anchored glycoprotein involved in directional root growth. *The Plant Cell* **14**, 1635-1648.
- Seigneurin-Berny, D., Gravot, A., Auroy, P., Mazard, C., Kraut, A., Finazzi, G., Grunwald, D., Rappaport, F., Vavasseur, A., Joyard, J., Richaud, P. y Rolland, N. (2006)** HMA1, a new Cu-ATPase of the chloroplast envelope, is essential for growth under adverse light conditions. *The Journal of Biological Chemistry* **281**, 2882-2892.
- Senden, M.H.M.N., Van Paassen F.J.M., Van Der Meer A.J.G.M. y Wolterbeek, H. (1990)** Cadmium-citric acid-xylem cell wall interactions in tomato plants. *Plant, Cell & Environment* **15**, 71-79.
- Sharma, S.S. y Dietz, K.J. (2006)** The significance of amino acids and amino acid-derived molecules in plant responses and adaptation to heavy metal stress. *Journal of Experimental Botany* **57**, 711-26.
- Shikanai, T., Müller-Moulé, P., Munekage, Y., Niyogi, K.K. y Pilon, M. (2003)** PAA1, a P-type ATPase of Arabidopsis, functions in copper transport in chloroplasts. *The Plant Cell* **15**, 1333-1346.
- Shinozaki, K. y Yamaguchi-Shinozaki, K. (2007)** Gene networks involved in drought stress response and tolerance. *Journal of Experimental Botany* **58**, 221-7.
- Shirsat, A., Wilford, N., Croy, R. y Boulter, D. (1989)** Sequences responsible for the tissue specific promoter activity of a pea legumin gene in tobacco. *Molecular & General Genetics* **215**, 326-331.
- Smirnoff, N. (2000)** Ascorbic acid: metabolism and functions of a multi-faceted molecule. *Current Opinion in Plant Biology* **3**, 229-235.
- Solioz, M. y Vulpe, C. (1996)** Cpx-type ATPases: a class of P-type ATPases that pump heavy metals. *Trends in Biochemical Sciences* **21**, 237-241.
- Stadler, N., Váchová, L., Krasowska, A., Höfer, M. y Sigler, K. (2003)** Role of strategic cysteine residues in oxidative damage to the yeast plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase caused by Fe- and Cu-containing Fenton reagents. *Folia Microbiologica* **48**, 589-96.
- Strange, J. y Macnair, M. (1991)** Evidence for a role of the cell membrane in copper tolerance of *Mimulus guttatus*. *Fischer ex DC. The New Phytologist* **119**, 383-388.
- Sunkar, R., Bartels, D. y Kirch, H.H. (2003)** Overexpression of a stress-inducible aldehyde dehydrogenase gene from *Arabidopsis thaliana* in transgenic plants improves stress tolerance. *The Plant Journal* **35**, 452-64.
- Sunkar, R., Chinnusamy, V., Zhu, J. y Zhu, J.K. (2007)** Small RNAs as big players in plant abiotic stress responses and nutrient deprivation. *Trends in Plant Science* **12**, 301-309.
- Sunkar, R., Kapoor, A. y Zhu, J-K, (2006)** Posttranscriptional induction of two Cu/Zn

- superoxide dismutase genes in Arabidopsis is mediated by downregulation of miR398 and important for oxidative stress tolerance. *The Plant Cell* **18**, 2051-2065.
- Suzuki, M. y Gitlin, J.D. (1999)** Intracellular localization of the Menkes and Wilson's disease proteins and their role in intracellular copper transport. *Pediatrics International* **41**, 436-442.
- Takahashi, M., Terada, Y., Nakai, I., Nakanishi, H., Yoshimura, E., Mori, S. y Nishizawa, N.K. (2003)** Role of nicotianamine in the intracellular delivery of metals and plant reproductive development. *The Plant Cell* **15**, 1263-1280.
- Terzaghi, W.B. y Cashmore, A.R. (1995a)** Photomorphogenesis. Seeing the light in plant development. *Current Biology* **5**, 466-8.
- Terzaghi, W.B. y Cashmore, A.R. (1995b)** Light-regulated transcription. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **46**, 445-474.
- Thomas, M.S., y Flavell, R.B. (1990)** Identification of an enhancer element for the endosperm-specific expression of high molecular weight glutenin. *The Plant Cell* **2**, 1171-1180.
- Thomine, S., Lelièvre, F., Debarbieux, E., Schroeder, J.I. y Barbier-Brygoo, H. (2003)** AtNRAMP3, a multispecific vacuolar metal transporter involved in plant responses to iron deficiency. *The Plant Journal* **34**, 685-95.
- Thomine, S., Wang, R., Ward, J.M., Crawford, N.M. y Schroeder, J.I. (2000)** Cadmium and iron transport by members of a plant metal transporter family in *Arabidopsis* with homology to Nramp genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **97**, 4991-4996.
- Tottey, S., Rich, P.R., Rondet, S.A.M. y Robinson, N.J. (2001)** Two Menkes-like ATPases supply copper for photosynthesis in *Synechocystis* PCC6803. *The Journal of Biological Chemistry* **276**, 999-1004.
- Tsang, E.W.T., Bowler, C., Hérouart, D., Van Camp, W., Villarroel, R., Genetello, C., Van Montagu, M. e Inzé, D. (1991)** Differential regulation of superoxide dismutases in plants exposed to environmental stress. *The Plant Cell* **3**, 787-792.
- Uno, Y., Furihata, T., Abe, H., Yoshida, R., Shinozaki, K. y Yamaguchi-Shinozaki, K. (2000)** Arabidopsis basic leucine zipper transcription factors involved in an abscisic acid-dependent signal transduction pathway under drought and high-salinity conditions. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **97**, 11632-11637.
- Urao, T., Yamaguchi-Shinozaki, K., Urao, S. y Shinozaki, K. (1993)** An Arabidopsis myb homolog is induced by dehydration stress and its gene product binds to the conserved MYB recognition sequence. *The Plant Cell* **5**, 1529-1539.
- Van Camp, W., Bowler, C., Villarroel, R., Tsang, E.W.T., Van Montagu, M. e Inzé, D. (1990)** Characterization of iron superoxide dismutase cDNAs from plants obtained by genetic complementation in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*

- 87, 9903-9907.
- Van Camp, W., Capiou, K., Van Montagu, M., Inzé, D. y Slooten, L. (1996)** Enhancement of oxidative stress tolerance in transgenic tobacco plants overproducing Fe-superoxide dismutase in chloroplasts. *Plant Physiology* **112**, 1703-14.
- Van Den Berghe, P.V., Folmer, D.E., Malingré, H.E., Van Beurden, E., Klomp, A.E., Van De Sluis, B., Merx, M., Berger, R. y Klomp, L.W. (2007)** Human copper transporter 2 is localized in late endosomes and lysosomes and facilitates cellular copper uptake. The *Biochemical Journal* **407**, 49-59.
- Van Hoof, N.A.L.M., Koevoets, P.L.M., Hakvoort, H.W.J., Ten Bookum, W.M., Schat, H., Verleij, J.A.C. y Ernst, W.H.O. (2001)** Enhanced ATP-dependent copper efflux across the root cell plasma membrane in copper-tolerant *Silene vulgaris*. *Physiologia Plantarum* **113**, 225-232.
- Van Vliet, C., Anderson, C.R. y Cobbett, C.S. (1995)** Copper-sensitive mutant of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology* **109**, 871-878.
- Vanstraelen, M., Inzé, D. y Geelen, D. (2006)** Mitosis-specific kinesins in Arabidopsis. *Trends in Plant Science* **11**, 167-175.
- Vauclare, P., Kopriva, S., Fell, D., Suter, M., Sticher, L., von Ballmoos, P., Krähenbühl, U., den Camp, R.O. y Brunold, C. (2002)** Flux control of sulphate assimilation in Arabidopsis thaliana: adenosine 5'-phosphosulphate reductase is more susceptible than ATP sulphurylase to negative control by thiols. *The Plant Journal* **31**, 729-740.
- Von Wirén, N., Klair, S., Bansal, S., Briat, J.F., Khodr, H., Shioiri, T., Leigh, R.A. y Hider, R.C. (1999)** Nicotianamine chelates both FeIII and FeII. Implications for metal transport in plants. *Plant Physiology* **119**, 1107-1114.
- Wallace, I.S., Choi, W-G. y Roberts, D.M. (2006)** The structure, function and regulation of the nodulin 26-like intrinsic protein family of plant aquaglyceroporins. *Biochimica et Biophysica Acta* **1758**, 1165-1175.
- Waters, B.M., Chu, H-H., DiDonato, R.J., Roberts, L.A., Easley, R.B., Lahner, B., Salt, D.E. y Walker, E.L. (2006)** Mutations in *Arabidopsis* Yellow Stripe-Like1 and Yellow Stripe-Like3 reveal their roles in metal ion homeostasis and loading of metal ions in seeds. *Plant Physiology* **141**, 1446-1458.
- Weigel, M., Varotto, C., Pesaresi, P., Finazzi, G., Rappaport, F., Salamini, F. y Leister, D. (2003)** Plastocyanin is indispensable for photosynthetic electron flow in *Arabidopsis thaliana*. *The Journal of Biological Chemistry* **278**, 31286-31289.
- Weng, G., Wu, L., Wang, Z., Luo, Y. y Christie, P. (2005)** Copper uptake by four *Elsholtzia* ecotypes supplied with varying levels of copper in solution culture. *Environment*



- International* **31**, 880-4.
- Westergard, L., Christensen, H.M. y Harris, D.A. (2007)** The cellular prion protein (PrP(C)): its physiological function and role in disease. *Biochimica et Biophysica Acta* **1772**, 629-44.
- Widmann, C., Gibson, S., Jarpe, M.B. y Johnson, G.L. (1999)** Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. *Physiological Reviews* **79**, 143-80.
- Willekens, H., Can Camp, W., Van Montagu, M., Inzé, D., Sandermann, H. y Langebartens, C. (1994)** Ozone, sulfur dioxide, and ultraviolet B have similar effects on mRNA accumulation of antioxidant genes in *Nicotiana plumnaginifolia* (L.). *Plant Physiology* **106**, 1007-1014.
- Williams, L.E. y Mills, R.F. (2005)** P<sub>1B</sub>-ATPases – an ancient family of transition metal pumps with diverse functions in plants. *Trends in Plant Science*. **10**, 491-502.
- Williams, L.E., Pittman, J.K. y Hall, J.L. (2000)**. Emerging mechanisms for heavy metal transport in plants. *Biochimica et Biophysica Acta* **1465**, 104-126.
- Williams, R.P.J. y Da Silva, J.J.R.F. (1996)** The natural selection of the chemical elements. *Oxford University Press* (Eds.), New York.
- Wintz, H., Fox, T., Wu, Y-Y., Feng, V., Chen, W., Chang, H-S., Zhu, T. y Vulpe, C. (2003)** Expression profiles of *Arabidopsis thaliana* in mineral deficiencies reveal novel transporters involved in metal homeostasis. *The Journal of Biological Chemistry* **278**, 47644-47653.
- Winzt, H. y Vulpe, C. (2002)** Plant copper chaperones. *Biochemical Society Transactions* **30**, 732-735.
- Woeste, K.E. y Kieber, J.J. (2000)**. A strong loss-of function mutation in *RAN1* results in constitutive activation of the ethylene response pathway as well as a rosette-lethal phenotype. *The Plant Cell* **12**, 443-455.
- Wolterbeek, H.T. y Van Der Meer, A.J. (2002)** Transport rate of arsenic, cadmium, copper and zinc in *Potamogeton pectinatus* L.: radiotracer experiments with <sup>76</sup>As, <sup>109,115</sup>Cd, <sup>64</sup>Cu and <sup>65,69</sup>Zn. *The Science of the Total Environment* **287**, 13-30.
- Wu, H., Li, L., Du, J., Yuan, Y., Cheng, X. y Ling, H-Q. (2005)** Molecular and biochemical characterization of the Fe(III) chelate reductase gene family in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell Physiology* **46**, 1505-1514.
- Xiang, C. y Oliver, D.J. (1998)** Glutathione metabolic genes coordinately respond to heavy metals and jasmonic acid in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **10**, 1539-50.
- Xiong, L., Schumaker, K.S. y Zhu, J-K. (2002)** Cell signaling during cold, drought, and salt stress. *The Plant Cell, Supplement* **2002**, S165-S183.
- Yamaguchi, Y., Heiny, M.E., Suzuki, M., y Gitlin, J.D. (1996)**. Biochemical characterization

- and intracellular localization of the Menkes disease protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **93**, 14030-14035.
- Yamaguchi-Shinozaki, K. y Shinozaki, K. (1994)** A novel cis-acting element in an Arabidopsis gene is involved in responsiveness to drought, low-temperature, or high-salt stress. *The Plant Cell* **6**, 251-64.
- Yamaguchi-Shinozaki, K. y Shinozaki, K. (2005)** Organization of cis-acting regulatory elements in osmotic- and cold-stress-responsive promoters. *Trends in Plant Science* **10**, 88-94.
- Yamasaki, H., Abdel-Ghany, S.E., Cohu, C.M., Kobayashi, Y., Shikanai, T. y Pilon, M. (2007)** Regulation of copper homeostasis by micro-RNA in Arabidopsis. *The Journal of Biological Chemistry* **282**, 16369-78.
- Yang, H., Pritzker, M., Fung, S.Y., Sheng, Y., Wang, W. y Chen, P. (2006)** Anion effect on the nanostructure of a metal ion binding self-assembling peptide. *Langmuir* **22**, 8553-62.
- Yang, H., Wong, J.W., Yang, Z.M. y Zhou, L.X. (2001)** Ability of *Arogyron elongatum* to accumulate the single metal of cadmium, copper, nickel and lead and root exudation of organic acids. *Journal of Environmental Sciences* **13**, 368-375.
- Yi, Y. y Guerinot, M.L. (1996)** Genetic evidence that Fe(III)-chelate reductase activity is necessary for iron uptake under iron deficiency. *The Plant Journal* **10**, 835-844.
- Yoshida, R., Hobo, T., Ichimura, K., Mizoguchi, T., Takahashi, F., Alonso, J., Ecker, J.R. y Shinozaki, K. (2002)** ABA-activated SnRK2 protein kinase is required for dehydration stress signaling in Arabidopsis. *The Plant Cell Physiology* **43**, 1473-83.
- Yruela, I., Pueyo, J.J., Alonso, P.J y Picorell, R. (1996)** Photoinhibition of photosystem II from higher plants: effects of copper inhibition. *The Journal of Biological Chemistry* **271**, 27408-27415.
- Yuan, D.S., Dancis, A. y Klausner, R.D. (1997)** Restriction of copper export in *Saccharomyces cerevisiae* to a late Golgi or post-Golgi compartment in the secretory pathway. *The Journal of Biological Chemistry* **272**, 25787-25793.
- Yuan, D.S., Stearman, R., Dancis, A., Dunn, T., Beeler, T. y Klausner, R.D. (1995)** The Menkes/Wilson disease gene homologue in yeast provides copper to a ceruloplasmin-like oxidase required for iron uptake. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **92**, 2632-2636.
- Zhou, B. y Gitshier, J. (1997)** hCTR1: a human gene for copper uptake identified by complementation in yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **94**, 7481-7486.
- Zhou, D.X., Li, Y.F., Rocipon, M. y Mache, R. (1992)** Sequence-specific interaction between

S1F, a spinach nuclear factor, and a negative cis-element conserved in plastid-related genes. *The Journal of Biological Chemistry* **267**, 23515-23519.

**Zhou, H., Shipp, E., Sanchez, R.J., Liba, A., Stine, J.E., Hart, P.J., Gralla, E.B., Nersissian, A.M. y Valentine, J.S. (2000)** Cobalt ( $2^+$ ) to human and tomato copper chaperone for superoxide dismutase: implication for metal ion transfer mechanism. *Biochemistry* **39**, 5413-5421.

**Zhou, J. y Goldsbrough, P.B. (1994)** Functional homologues of fungal metallothionein genes from *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **6**, 875-884.

**Zhou, J. y Goldsbrough, P.B. (1995)** Structure, organization and expression of the metallothionein gene family in *Arabidopsis*. *Molecular & General Genetics* **248**, 318-328.

