

Diana Sancho Lozano

El tráfico de cobre en el cloroplasto de plantas superiores: los transportadores de membrana

Departamento
Bioquímica y Biología Molecular y Celular

Director/es
Bernal Ibáñez, María
Picorel Castaño, Rafael

<http://zaguan.unizar.es/collection/Tesis>

© Universidad de Zaragoza
Servicio de Publicaciones

ISSN 2254-7606



Universidad
Zaragoza

Tesis Doctoral

EL TRÁFICO DE COBRE EN EL CLOROPLASTO DE PLANTAS SUPERIORES: LOS TRANSPORTADORES DE MEMBRANA

Autor

Diana Sancho Lozano

Director/es

Bernal Ibáñez, María
Picorel Castaño, Rafael

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA

Bioquímica y Biología Molecular y Celular

2016



Estación Experimental de Aula Dei
Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)
Zaragoza

Tesis Doctoral

El tráfico de cobre en el cloroplasto de plantas superiores. Los transportadores de membrana.

Memoria presentada por Dña. Diana Sancho Lozano, licenciada en Biología, para optar al grado de Doctor por la Universidad de Zaragoza.

Zaragoza, 2016

D. RAFAEL PICOREL CASTAÑO, Profesor de Investigación del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), adscrito a la Estación Experimental de Aula Dei de Zaragoza y Dña. MARÍA BERNAL IBÁÑEZ, Investigadora Senior del Departamento de Fisiología Vegetal, adscrita a la Ruhr-Universität Bochum

CERTIFICAN:

Que la Tesis Doctoral titulada “*El tráfico de cobre en el cloroplasto de plantas superiores. Los transportadores de membrana*”, ha sido realizada por la licenciada DIANA SANCHO LOZANO en el Departamento de Nutrición Vegetal de la Estación Experimental de Aula Dei (CSIC) bajo su dirección y que reúne, a su juicio, las condiciones requeridas para optar al grado de Doctora en Ciencias.

Zaragoza, Noviembre de 2015

Fdo.: Dr. RAFAEL PICOREL CASTAÑO

Fdo.: Dra. MARÍA BERNAL IBÁÑEZ

A mi familia

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría dar las gracias en primer lugar a mis directores de Tesis, el Dr. Rafael Picorel y la Dra. María Bernal, por darme la oportunidad de aprender y formarme en su laboratorio, y en especial por su dedicación y esfuerzo durante estos años.

Al programa JAE (CSIC) por la beca predoctoral que me ha permitido realizar esta Tesis Doctoral.

Al Dr. Miguel Alfonso, por sus consejos y ayuda siempre que la he necesitado.

A las compañeras que sentaron las bases de mi trabajo antes que yo: Miren B. del Castillo y Sara Sagasti.

Me gustaría dar las gracias especialmente a mis compañeros del laboratorio de la Estación Experimental de Aula Dei: Ainhoa Erce, Ana Claver, Ángel Soria, Ángela Román, Beatriz Lagunas, Esther Íñiguez, Laura Pauner, Marcos Herrera, Marian Luján, Marina de la Vega, Patricia Lorente, Pedro Pastor y Sara López, gracias por todas las cosas que hemos compartido dentro y fuera del laboratorio, y por las que seguiremos compartiendo. Gracias por absolutamente todo. También me gustaría dar las gracias a todos los miembros de Aula Dei (aunque no puedo nombraros a todos), especialmente a Mariví López y a los compañeros del comedor.

Al Dr. Marinus Pilon y la Dra. Elizabeth Pilon-Smits, así como a los miembros del laboratorio de la Universidad de Colorado: Ali F. El Mehdawi, Emma Jobson, Eric Patterson, Guadalupe Aguirre, Jason Reynolds, Jenna C. Fussell, Jennifer J. Cappa, Klara Richterova, Laura Hantzis, Martina Novakova, Michela Schiavon, Muhammad Shahbaz, Muhammad Yasin, Rachel De Tar, Roksolana Fajda, Salah Abdel-Ghany y Solaris Wang. Gracias por enseñarme tantas cosas, por vuestra ayuda siempre.

A la Dra. Ute Krämer, y los miembros del laboratorio de Fisiología Vegetal de la Universidad de Bochum, especialmente a Ahmed Sorour, Camille Larue, Heike Holländer-Czytko, Ines Kubigsteltig, Jamshaid Ali, Joachim Schab, Justyna Cebula, Klaus Hagemann, Markus Piotrowski, Max Podszun, Petra Düchting, Ricardo J. Stein, Romário Melo, Scott Sinclair, Serena-Lavinia Boeker, y Vasantika Singh. Mi más sincero agradecimiento por toda vuestra ayuda.

Al Dr. Adrián Velázquez por compartir conmigo su tiempo y conocimientos de calorimetría.

Al Dr. Manuel González por su ayuda con los experimentos durante el máster y su buena disposición.

A Guillermo Alejandro Llamazares, por ayudarme a caminar y levantarme cuando me caía.

En especial a mis padres Fernando Sancho y María Jesús Lozano, y a mis hermanas Leticia Sancho y Ruth Sancho. Por transmitirme el amor a la ciencia y al trabajo, y sobre todo por su ayuda incondicional y apoyo.

Muchas gracias.

ABREVIATURAS

5' UTR	Región 5' no traducida
5' RACE	<i>5' Rapid amplification of cDNA ends</i>
6xHis	Polihistidina
A	Absorbancia
aa	Aminoácido
ABA	Ácido abscísico
ABI	<i>ABA insensitive</i>
ABS	Albúmina bovina sérica
ACT	<i>Actin</i>
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN complementario
ADNg	ADN genómico
AGO	<i>Argonaute</i>
APS	Persulfato amónico
ARN	Ácido ribonucleico
ATX1	<i>Antioxidant 1</i>
BCA	Ácido bicinconínico
BCIP	5-bromo-4-cloro-indolilfosfato
BCS	Batocuproína disulfonato
Bicina	N,N-bis(2-hidroxietil)glicina
BPS	Batofenantrolina disulfonato

CaMV	<i>Cauliflower mosaic virus</i>
CCC2	<i>Ca²⁺-sensitive cross-complementer 2</i>
CcdB	<i>Control of cell death</i>
CCS	<i>Copper chaperone for the Cu/Zn superoxide dismutase</i>
CCH	<i>Copper chaperone</i>
CDS	<i>Coding DNA sequence</i>
Clp	<i>Chloroplast caseinolytic protease</i>
CLSM	<i>Confocal laser scanning microscopy</i>
Col0	Columbia 0
COPT	<i>Copper transporter</i>
COX	<i>Cytocrome c oxidase</i>
CSD	<i>Cu/Zn superoxide dismutase</i>
CSM	<i>Complete supplement mixture</i>
Ct	<i>Cycle threshold</i>
CT1	<i>Copper transporter 1</i>
CTR	<i>Copper transporter</i>
Cu/ZnSOD	<i>Cu/Zn superoxide dismutase</i>
dATP	Desoxiadenosina trifosfato
DMA	Ácido desoximugineico
dNTP	Desoxinucleósidos trifosfato
DSC	<i>Differential scanning calorimetry</i>
DTT	Threo-1,4-dimercapto-2,3-butanediol o DL-dithiothreitol

EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EF1 α	<i>Elongation factor 1 α</i>
ETR1	<i>Ethylene receptor 1</i>
F' ₀	Fluorescencia mínima tras el apagado de la luz
F'm	Fluorescencia máxima en luz
FeSOD	<i>Fe superoxide dismutase</i>
FET3	<i>Ferrous transport 3</i>
FMS	<i>Fluorescence monitoring system</i>
FPLC	<i>Fast protein liquid chromatography</i>
FRO	<i>Ferric reduction oxidase</i>
FSD	<i>Fe superoxide dismutase</i>
Ft	Fluorescencia en estado estacionario
GUS	<i>β-Glucuronidase</i>
HA	<i>Hemagglutinin</i>
HBED	Ácido N,N-bis(2-hidroxibencil)etilenediamina-N,N-diacético
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperacinaetanosulfónico
HMA	<i>Heavy metal ATPase</i>
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
HXK1	<i>Hexokinase 1</i>
ICP-AES	<i>Inductively coupled plasma-atomic emission spectroscopy</i>
IMAC	<i>Immobilized metal ion affinity chromatography</i>
ITC	<i>Isothermal titration calorimetry</i>

kb	Kilo bases
kDa	Kilo Daltons
KIN17	<i>Immunological Kinship to RecA protein clone 17</i>
LAC	<i>Laccase</i>
LB	<i>Lysogenic broth</i> , también llamado Luria Bertani
Ler	Landsberg <i>erecta</i>
MES	Ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico
MFS	<i>Major facilitator superfamily</i>
miR	Micro ARN
MnSOD	<i>Mn superoxide dismutase</i>
MS	Medio Murashige y Skoog
MWCO	<i>Molecular weight cut off</i>
NA	Nicotinamina
NBT	Nitroazul de tetrazolio
NiSOD	<i>Ni superoxide dismutase</i>
NOD	<i>Nodulin</i>
OPT	<i>Oligopeptide transporter</i>
PAA	<i>P-type ATPase in Arabidopsis</i>
pb	Pares de bases
PC	<i>Plastocyanin</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PCH1	<i>Plastid chaperone 1</i>

PEG	Polietilenglicol
PMSF	Fenilmetanosulfonil fluoruro
PPO	<i>Polyphenol oxidase</i>
PS	Péptido señal
PSI	Fotosistema I
PSII	Fotosistema II
PVDF	Polifluoruro de vinilideno
qP	<i>Photochemical quenching</i>
qRT-PCR	PCR cuantitativa
RAN1	<i>Responsive to antagonist 1</i>
RSEP1	<i>Regulator for sigma-e protease 1</i>
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
SD	<i>Synthetic defined</i>
SDS	Dodecil sulfato sódico
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes
SPL7	<i>Squamosa promoter binding protein-like 7</i>
TCA	Ácido tricloroacético
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletlenodiamina
Tm	Temperatura de fusión
TM	Transmembrana
Tricina	N-tris(hidroximetil)metil glicina
Tris	(Tris)-hidroximetil-amino metano

UKN1	<i>Unknown 1</i>
WT	<i>Wild type</i>
YFP	<i>Yellow fluorescent protein</i>
YNB	<i>Yeast nitrogen base</i>
YPD	<i>Yeast extract peptone dextrose</i>
YS1	<i>Yellow stripe 1</i>
YSL	<i>Yellow stripe 1-like</i>
ZIP	<i>ZRT, IRT-like proteins</i>

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	3
1. EL COBRE COMO MICRONUTRIENTE EN LAS PLANTAS	3
2. DEFICIENCIA Y TOXICIDAD DEL COBRE	3
2.1. DEFICIENCIA DE COBRE	4
2.2. EXCESO DE COBRE	4
3. PRINCIPALES CUPROPROTEÍNAS	5
3.1. PLASTOCIANINA	5
3.2. CITOCROMO C OXIDASA	6
3.3. SUPERÓXIDO DISMUTASA	6
3.4. RECEPTOR DE ETILENO	6
3.5. POLIFENOL OXIDASAS	7
3.6. AMINO OXIDASAS	7
3.7. LACASAS	7
3.8. PLANTACIANINA	7
4. HOMEOSTASIS DEL COBRE EN LAS PLANTAS	8
4.1. BIODISPONIBILIDAD Y MOVILIZACIÓN DEL COBRE EN EL SUELO	8
4.2. DISTRIBUCIÓN DEL COBRE A LOS ÓRGANOS DE DESTINO	9
4.2.1. Transporte apoplástico y simplástico en la raíz	9
4.2.2. Transporte a través del xilema	10
4.2.3. Transporte a través del floema	11
4.3. TRÁFICO INTRACELULAR DEL COBRE EN PLANTAS	12
4.3.1. Chaperonas de cobre	12
4.3.1.1. La chaperona de cobre CCS	15
4.3.2. Los transportadores de membrana	18
4.3.2.1. La familia COPT	18
4.3.2.2. La familia HMA	20
4.3.2.3. Otros transportadores de cobre	26
4.4. REGULACIÓN DE LA HOMEOSTASIS DEL COBRE	26
4.4.1. SPL7	27
4.4.2. Micro ARNs de cobre	28
4.4.3. Otros aspectos de la regulación por Cu	30
4.4.4. Implicaciones de la homeostasis del cobre	31
5. SITUACIÓN ACTUAL Y PERSPECTIVAS	31
OBJETIVOS	35
MATERIALES Y MÉTODOS	39

1. MATERIAL BIOLÓGICO	39
1.1. MANIPULACIÓN DE BACTERIAS	39
1.1.1. Cepas de <i>Escherichia (E.) coli</i> utilizadas y condiciones de cultivo	39
1.1.2. Preparación de <i>E. coli</i> quimiocompetentes	39
1.1.3. Transformación de <i>E. coli</i> quimiocompetentes	40
1.1.4. Cepas de <i>Agrobacterium (A.) tumefaciens</i> utilizadas y condiciones de cultivo	40
1.1.5. Preparación de <i>A. tumefaciens</i> electrocompetentes	41
1.1.6. Transformación de <i>A. tumefaciens</i> electrocompetentes	41
1.1.7. Conservación de cepas bacterianas a largo plazo	41
1.2. MANIPULACIÓN DE LEVADURAS	42
1.2.1. Cepas de <i>Saccharomyces (S.) cerevisiae</i> utilizadas y condiciones de cultivo	42
1.2.2. Preparación de <i>S. cerevisiae</i> competentes	42
1.2.3. Transformación de <i>S. cerevisiae</i> competentes	43
1.2.4. Análisis fenotípicos en <i>S. cerevisiae</i>	43
1.3. MANIPULACIÓN DE PLANTAS	44
1.3.1. Cultivo de <i>Arabidopsis (A.) thaliana</i>	44
1.3.2. Tratamientos de <i>A. thaliana</i>	45
1.3.3. Transformación estable de <i>A. thaliana</i> y selección de plantas homocigotas	46
1.3.4. Aislamiento y transformación transitoria de protoplastos de <i>A. thaliana</i>	47
1.3.5. Análisis por microscopía láser confocal de <i>A. thaliana</i>	48
1.3.6. Cultivo de plantas de <i>Glycine (G.) max</i>	49
1.3.7. Tratamientos de <i>G. max</i>	49
2. AISLAMIENTO Y ANÁLISIS DE ÁCIDOS NUCLEICOS	49
2.1. AISLAMIENTO DE ÁCIDOS NUCLEICOS	49
2.1.1. Extracción de ADN genómico	49
2.1.2. Extracción de ADN plasmídico	50
2.1.3. Extracción de ARN total	50
2.2. ELECTROFORESIS DE ÁCIDOS NUCLEICOS	51
2.3. SÍNTESIS DE ADN COMPLEMENTARIO	52
2.4. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)	52
2.5. EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE PRODUCTOS DE PCR DE GELES DE AGAROSA	54
2.6. PROCEDIMIENTOS DE CLONACIÓN	54
2.6.1. Clonación en el vector pBAD TOPO TA	55
2.6.2. Tecnología Gateway: consideraciones generales	58
2.6.3. Tecnología Gateway: generación de vectores de entrada y de destino	59

2.7. PCR EN COLONIA	67
2.8. DIGESTIÓN CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN	67
2.9. SECUENCIACIÓN Y ANÁLISIS	68
2.10. AMPLIFICACIÓN DEL ADNc MEDIANTE PCR SEMICUANTITATIVA	68
2.11. AMPLIFICACIÓN DEL ADNg MEDIANTE PCR Y CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE LOS MUTANTES <i>paa1-1</i> Y <i>paa2-1</i>	69
2.12. PCR CUANTITATIVA	70
2.13. AMPLIFICACIÓN DEL EXTREMO 5' DEL ADNc (5' RACE)	71
3. AISLAMIENTO Y ANÁLISIS DE PROTEÍNAS	72
3.1. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS	72
3.2. ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA E INMUNODETECCIÓN	72
3.2.1. Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes	72
3.2.2. Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones no desnaturalizantes	73
3.2.3. Detección de proteínas en geles de poliacrilamida con azul Coomassie	74
3.2.4. Transferencia a membrana de nitrocelulosa o PVDF	74
3.2.5. Detección de proteínas en membranas con rojo Ponceau	75
3.2.6. Detección inmunológica de proteínas (western blot)	75
3.3. ESTUDIO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES	77
3.3.1. Sobreexpresión piloto de proteínas en <i>E. coli</i>	77
3.3.2. Sobreexpresión de <i>GmCCS</i> recombinante en <i>E. coli</i>	78
3.3.3. Purificación de <i>GmCCS</i> recombinante	78
3.3.4. Determinación del contenido de Cu en <i>GmCCS</i> recombinante purificada	79
3.3.5. Carga de Cu ⁺ de <i>GmCCS</i> recombinante	80
3.3.6. Calorimetría isotérmica de titulación (ITC)	80
3.3.7. Calorimetría diferencial de barrido (DSC)	80
3.3.8. Cromatografía de exclusión molecular	81
3.4. EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS DE LEVADURAS	81
3.5. EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS DE PLANTAS	82
3.5.1. Extracción de proteínas de plantas para electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones no desnaturalizantes	82
3.5.2. Fraccionamiento subcelular de <i>G. max</i>	82
3.6. ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD SUPERÓXIDO DISMUTASA	83
3.7. REPRESENTACIÓN GRÁFICA DE PROTEÍNAS	84
4. TÉCNICAS PARA EL ESTUDIO DE LAS PLANTAS	84
4.1. DETERMINACIÓN DEL PESO FRESCO	84
4.2. ANÁLISIS DE LA FLUORESCENCIA DE LA CLOROFILA	84

4.3. ESPECTROMETRÍA DE EMISIÓN ATÓMICA DE PLASMA ACOPLADO INDUCTIVAMENTE (ICP-AES)	84
4.4. TINCIÓN HISTOQUÍMICA DE PLANTAS TRANSGÉNICAS QUE EXPRESAN β - GLUCURONIDASA	85
4.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	85
RESULTADOS	89
1. CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL, LOCALIZACIÓN Y REGULACIÓN DE PAA2	89
1.1. CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE <i>GmPAA2</i>	89
1.1.1. Expresión heteróloga de <i>GmPAA2-1</i> en <i>E. coli</i>	93
1.1.2. Expresión heteróloga de <i>GmPAA2-2</i> en <i>E. coli</i>	95
1.1.3. Expresión de <i>GmPAA2-1</i> , <i>GmPAA2-1T</i> y <i>GmPAA2-2</i> en <i>S. cerevisiae</i>	96
1.1.4. Análisis funcional de las proteínas <i>GmPAA2-1</i> , <i>GmPAA2-1T</i> y <i>GmPAA2-2</i> en levaduras	98
1.1.4.1. Complementación funcional de los mutantes <i>ccc2</i> de <i>S. cerevisiae</i> con <i>GmPAA2-1</i> , <i>GmPAA2-1T</i> y <i>GmPAA2-2</i>	98
1.1.4.2. Estudio de las proteínas <i>GmPAA2-1</i> , <i>GmPAA2-1T</i> y <i>GmPAA2-2</i> en levaduras silvestres	99
1.1.5. Complementación funcional de los mutantes de <i>A. thaliana paa1-1</i> y <i>paa2-1</i> con <i>GmPAA2-1</i> y <i>GmPAA2-2</i>	100
1.1.5.1. Complementación funcional del mutante <i>paa1-1</i> con <i>GmPAA2-1</i> y <i>GmPAA2-2</i>	101
1.1.5.2. Complementación funcional del mutante <i>paa2-1</i> con <i>GmPAA2-1</i> y <i>GmPAA2-2</i>	110
1.2. LOCALIZACIÓN DE <i>GmPAA2-1</i> y <i>GmPAA2-2</i>	120
1.2.1. Expresión transitoria de <i>GmPAA2-1</i> y <i>GmPAA2-2</i> en protoplastos de <i>A. thaliana</i>	120
1.2.2. Expresión estable de <i>GmPAA2-1</i> y <i>GmPAA2-2</i> en plantas transgénicas de <i>A.</i> <i>thaliana</i>	121
1.3. ANÁLISIS Y REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL DE PAA2	122
1.3.1. Análisis de la actividad del promotor de <i>AtPAA2</i>	122
1.3.2. Estudio de la región 5' del gen <i>GmPAA2-2</i>	126
1.3.3. Regulación transcripcional de <i>GmPAA2-1</i> y <i>GmPAA2-2</i>	133
1.3.4. Identificación de proteínas <i>GmPAA2</i> en fracciones subcelulares de <i>G. max</i>	139
2. ESTUDIO DEL ESTADO OLIGOMÉRICO DE LA CHAPERONA <i>GmCCS E</i> INTERACCIÓN CON SU LIGANDO METÁLICO	141
2.1. SOBREEXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE <i>GmCCS</i> RECOMBINANTE	141
2.2. ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN DE <i>GmCCS</i> CON COBRE POR CALORIMETRÍA ISOTÉRMICA DE TITULACIÓN	144
2.3. ESTUDIO DE LA ESTABILIDAD TÉRMICA DE <i>GmCCS</i>	145

2.4. ESTUDIO DEL ESTADO OLIGOMÉRICO DE <i>GmCCS</i>	146
DISCUSIÓN	151
1. CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL, LOCALIZACIÓN Y REGULACIÓN DE PAA2	151
1.1. EXPRESIÓN HETERÓLOGA DE <i>GmPAA2-1</i> Y <i>GmPAA2-2</i> EN <i>E. COLI</i>	152
1.2. EXPRESIÓN DE <i>GmPAA2</i> EN <i>S. CEREVISIAE</i>	153
1.3. COMPLEMENTACIÓN FUNCIONAL DE LOS MUTANTES DE <i>A. THALIANA paa1-1</i> Y <i>paa2-1</i> CON <i>GmPAA2-1</i> Y <i>GmPAA2-2</i>	155
1.4. LOCALIZACIÓN DE <i>GmPAA2-1</i> Y <i>GmPAA2-2</i>	161
1.5. ANÁLISIS Y REGULACIÓN DE PAA2	162
1.5.1. Análisis del patrón de expresión del promotor de <i>AtPAA2</i> .	162
1.5.2. Estudio de la región 5' del gen <i>GmPAA2-2</i>	164
1.5.3. Regulación transcripcional de <i>GmPAA2-1</i> y <i>GmPAA2-2</i>	165
1.5.4. Identificación de proteínas <i>GmPAA2</i> en <i>G. max</i>	167
2. ESTUDIO DEL ESTADO OLIGOMÉRICO DE LA CHAPERONA DE COBRE CCS E INTERACCIÓN CON SU LIGANDO	168
2.1. SOBREEXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE <i>GmCCS</i> RECOMBINANTE	168
2.2. ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN DE <i>GmCCS</i> CON COBRE POR CALORIMETRÍA ISOTÉRMICA DE TITULACIÓN (ITC)	168
2.3. ESTUDIO DE LA ESTABILIDAD TÉRMICA DE <i>GmCCS</i>	169
2.4. ESTADO OLIGOMÉRICO DE <i>GmCCS</i>	169
CONCLUSIONES	173
BIBLIOGRAFÍA	177

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

1. EL COBRE COMO MICRONUTRIENTE EN LAS PLANTAS

El Cobre (Cu) es un metal de transición esencial para la mayoría de organismos vivos (Festa y Thiele, 2011; Ladomersky y Petris, 2015). En las células, el Cu puede estar presente en dos estados de oxidación, Cu^+ y Cu^{2+} , lo que lo convierte en un cofactor idóneo de proteínas involucradas en reacciones de oxidación-reducción. El Cu es utilizado por una gran variedad de enzimas con funciones en respiración y fotosíntesis (Hänsch y Mendel, 2009; Nouet y col., 2011; Finazzi y col., 2015), y se le atribuye un papel central en el control de oxidación-reducción y transporte electrónico de las células (Ravet y Pilon, 2013).

Sin embargo, las mismas propiedades que hacen del Cu un metal esencial, pueden ser dañinas para la célula, ya que se trata de un elemento altamente reactivo que puede generar especies reactivas de oxígeno (ROS), que, a su vez, pueden provocar daños en los componentes celulares, afectar al transporte celular e interferir en la concentración de metabolitos (Wintz y Vulpe, 2002; Banci y col., 2010; López-Maury y col., 2012). Por lo tanto, los organismos vivos han desarrollado sofisticados mecanismos para mantener la homeostasis celular y sistémica, que permiten un eficiente uso de dicho metal, a pesar del potencial daño que puede constituir para las células (Grotz y Guerinot, 2006; Ellingsen y col., 2007; Hänsch y Mendel, 2009).

2. DEFICIENCIA Y TOXICIDAD DEL COBRE

La concentración de Cu en el suelo presenta una amplia variación, encontrándose concentraciones menores de $5 \mu\text{g g}^{-1}$ en países como Bélgica, Croacia o Grecia, mientras que valores superiores a $100 \mu\text{g g}^{-1}$ también se han encontrado en países como Italia, Noruega o España (Heijerick y col., 2006). El Cu se encuentra principalmente de manera insoluble en los suelos, adsorbido a arcilla, CaCO_3 o materia orgánica, lo que se ve incrementado en suelos alcalinos, que representan aproximadamente el 30% de los suelos del mundo (Bradl, 2004; Palmer y Guerinot, 2009). De esta forma, en el medio ambiente, la deficiencia de Cu es más común que la toxicidad (Ravet y Pilon, 2013), aunque cabe destacar que en condiciones de campo es poco frecuente la deficiencia de un solo elemento, siendo más común que la deficiencia sea múltiple (Barceló y col., 2001).

Por otra parte, la cantidad de Cu en las cosechas tiene un enorme impacto económico debido a que el contenido de Cu es importante para la productividad animal y afecta a funciones esenciales de los animales incluyendo el metabolismo de lípidos (Ward y Spears,

1997; Adrees y col., 2015) . La cantidad de Cu presente en los tejidos fotosintéticos de las plantas se encuentra en el rango de 5–20 $\mu\text{g g}^{-1}$ de peso seco, dependiendo de la especie. Este amplio rango de Cu en las plantas sugiere una necesidad variable de Cu por parte de éstas (Fernandes y Henriques, 1991; Marschner, 1995).

En condiciones experimentales, en la especie *Arabidopsis (A.) thaliana*, la concentración de Cu en el medio por debajo de 0,5 μM corresponde con una disponibilidad subóptima de Cu, mientras que la concentración por encima de 5 μM constituye un exceso para el crecimiento de las plantas (Lequeux y col., 2010; Andrés-Colás y col., 2013).

2.1. DEFICIENCIA DE COBRE

Tanto la deficiencia de Cu como la toxicidad pueden ocasionar daños en las plantas apreciables por la aparición de síntomas característicos. Una cantidad insuficiente de Cu en las plantas puede producir fenómenos que afectan, en primer lugar, a los tejidos jóvenes y reproductivos (Marschner, 1995; Puig y col., 2007a; Hänsch y Mendel, 2009). Las plantas sometidas a deficiencia de Cu sufren una reducción en el crecimiento, clorosis de las hojas jóvenes, curvatura de los márgenes de las hojas, daño en los meristemos apicales, disminución de la formación de frutos, defectos en la pared celular, disminución del desarrollo y viabilidad del polen y desarrollo embrionario incorrecto (Dell, 1981; Barceló y col., 2001; Burkhead y col., 2009).

La deficiencia de Cu produce también una reducción de la actividad fotosintética y aumento de la movilización y adquisición de Cu (Henriques, 1989; Yruela, 2013; Billard y col., 2014; Shahbaz y col., 2015). Otro de los problemas derivados del desequilibrio nutricional es el hecho de que la deficiencia de Cu puede causar el exceso relativo de otros metales en la célula y, consecuentemente, las proteínas que carecen de su cofactor nativo son susceptibles de incorporar un metal incorrecto (López-Maury y col., 2012; Blaby-Haas y Merchant, 2014).

2.2. EXCESO DE COBRE

Por el contrario, el Cu también puede aparecer en exceso en el suelo de determinadas áreas. Los metales pesados se encuentran de manera natural en el suelo y éstos pueden aparecer en niveles tóxicos de manera inherente o debido a actividades antrópicas como la minería o el uso excesivo de fertilizantes y fungicidas (Fernandes y Henriques, 1991; White y Brown, 2010; Wuana y Okieimen, 2011).

El exceso de Cu puede producir una reducción en la biomasa de la parte aérea y radicular de las plantas (Wojcik y Tukiendorf, 2003; Lequeux y col., 2010), clorosis y necrosis

de las hojas (Drazkiewicz y col., 2004; Bouazizi y col., 2010), disminución de la viabilidad de las células de la raíz (Rodrigo-Moreno y col., 2013), remodelación del sistema radicular, alteración del patrón de auxinas, cambios en la deposición de lignina (Lequeux y col., 2010) e inhibición de la germinación (Sethy y Ghosh, 2013).

El exceso de Cu también afecta a la actividad fotosintética (Yruela, 2013), causa peroxidación de lípidos, daños en el ADN y proteínas (Festa y Thiele, 2011; Adrees y col., 2015), afecta a la adquisición de otros nutrientes esenciales (Adrees y col., 2015) y favorece la producción de ROS y estrés oxidativo (Yruela, 2009; Chaffai y Koyama, 2011; Sethy y Ghosh, 2013). Las especies de oxígeno parcialmente reducidas se producen cuando el oxígeno molecular acepta electrones de otras moléculas (Mittler, 2002; Apel y Hirt, 2004; Ravet y Pilon, 2013). Las zonas de mayor generación de ROS son los centros de reacción del Fotosistema I (PSI) y el Fotosistema II (PSII) en los tilacoides (Asada, 2006). Algunos procesos dependientes de Cu reducen el oxígeno a superóxido (O_2^-) o peróxido de hidrógeno (H_2O_2), moléculas que tienen, por sí mismas, una citotoxicidad limitada, pero que pueden ser sustratos para la producción de radicales hidroxilo ($OH\cdot$), que no pueden ser eliminados enzimáticamente y son los mayores responsables del daño oxidativo en los sistemas biológicos (Robinson y Winge, 2010; Ravet y Pilon, 2013).

3. PRINCIPALES CUPROPROTEÍNAS

Las funciones más destacadas del Cu en plantas superiores están relacionadas con la fotosíntesis, respiración mitocondrial, percepción del etileno, metabolismo de la pared celular, protección frente al estrés oxidativo, síntesis del cofactor de molibdeno y regulación del ciclo circadiano (Puig y col., 2007a; Hänsch y Mendel, 2009; Perea-García y col., 2010; Mendel, 2013). Las proteínas principales de Cu son la plastocianina (PC), la citocromo *c* oxidasa (COX) y la cuprozinc superóxido dismutasa (Cu/ZnSOD). El Cu también se encuentra formando parte como cofactor del receptor de etileno ETR1 (*Ethylene Receptor 1*), polifenol oxidasas (PPO), amino oxidasas, lacasas y plantacianina (Palmer y Guerinot, 2009; Yruela, 2009; García y col., 2014).

3.1. PLASTOCIANINA

La PC es la cuproproteína más abundante en plantas superiores, con aproximadamente el 50% del Cu plastidial (Fernandes y Henriques, 1991; Marschner, 1995; Nouet y col., 2011). Se trata de una proteína esencial, involucrada en el transporte electrónico fotosintético desde el citocromo *f* en el complejo citocromo *b₆f* al P_{700}^+ en el PSI, y está localizada en el lumen de los cloroplastos (Kato, 1960; Gorman y Levine, 1965; Redinbo y

col., 1994). En *A. thaliana*, esta proteína está codificada por dos genes, *AtPC1* y *AtPC2* (Gupta y col., 2002). Ambas isoformas tienen una función redundante y se acumulan en los tilacoides a un nivel aparentemente superior al necesario para mantener el transporte electrónico fotosintético, lo que indica que podría actuar como tampón del exceso de Cu y/o reserva (Abdel-Ghany, 2009; Pesaresi y col., 2009). La PC se encuentra en los tejidos fotosintéticos, especialmente en las hojas y está ausente en raíces. Se ha visto que esta proteína está regulada por Cu (apartado 4.4.3) (Ravet y col., 2011).

3.2. CITOCROMO C OXIDASA

La citocromo c oxidasa (COX o complejo IV) se trata de un complejo proteico de localización mitocondrial que se encuentra formando parte de la cadena de transporte electrónico respiratorio. Constituye el último complejo enzimático y es capaz de aceptar electrones del citocromo c para convertir el O₂ y H⁺ en agua. El complejo IV utiliza el Cu como cofactor para su correcto funcionamiento, así como grupos hemo, Mg, Zn y Na. Está constituido por 11-13 subunidades y su ensamblaje requiere la coordinación de la expresión génica y proteica, así como distintos factores de ensamblaje (Nouet y col., 2011; García y col., 2014).

3.3. SUPERÓXIDO DISMUTASA

Otra proteína de Cu mayoritaria es la Cu/ZnSOD. Las SOD catalizan la rápida reacción de dismutación del superóxido a peróxido de hidrógeno y son ubicuas en todos los organismos que viven en presencia de oxígeno (Pilon y col., 2011). Además del metabolismo de las ROS, también se ha atribuido a estas enzimas la participación en la señalización celular (Leitch y col., 2009b). Las SOD funcionan como un dímero con un ión metálico catalítico en cada monómero. En *A. thaliana* se conocen tres isoformas de Cu/ZnSOD: CSD1, CSD2 y CSD3 localizadas en el citoplasma, plastidios y peroxisomas, respectivamente; tres isoformas de FeSOD: FSD1, FSD2 y FSD3 localizadas en los plastidios y probablemente en el citosol (FSD1); y una isoforma de MnSOD localizada en la matriz mitocondrial (Kliebenstein y col., 1998; Pilon y col., 2011).

3.4. RECEPTOR DE ETILENO

El receptor de etileno ETR1 es otra de las proteínas cuyo cofactor es el Cu (Rodríguez y col., 1999). El receptor de etileno está estructurado de forma modular y se localiza en el retículo endoplásmico, independientemente de la unión al etileno (Chen y col., 2002). El etileno constituye una hormona vegetal de gran importancia, involucrada en el desarrollo de

la planta, maduración de frutos, expansión de las hojas, germinación de semillas, floración y senescencia (Chang y Shockey, 1999).

3.5. POLIFENOL OXIDASAS

Las PPO son proteínas localizadas en el lumen de los tilacoides, que presentan dos átomos de Cu. Se les ha atribuido funciones en la defensa contra herbívoros y patógenos, y en procesos biosintéticos (Wang y Constabel, 2004; Marusek y col., 2006; Mayer, 2006).

3.6. AMINO OXIDASAS

Las amino oxidasas son metaloproteínas que contienen Cu y se organizan como homodímeros con un átomo de Cu en cada monómero. Estas proteínas podrían estar implicadas en las respuestas de defensa de las plantas (Cona y col., 2006), crecimiento celular y desarrollo (Delis y col., 2006).

3.7. LACASAS

Las lacasas pertenecen a una clase de multicobre oxidasas (MCO), ampliamente distribuidas en plantas, hongos, bacterias y animales. Realizan la oxidación de un amplio rango de sustratos dependiente de O₂. En plantas, se considera que pueden estar implicadas en la síntesis de lignina. En *A. thaliana* se han identificado 17 miembros de esta familia (Gavnholt y Larsen, 2002; Weng y Chapple, 2010). Las lacasas están reguladas a nivel postranscripcional por micro ARNs de Cu (Jones-Rhoades y Bartel, 2004; Sunkar y Zhu, 2004; Abdel-Ghany y Pilon, 2008) (apartado 4.4.2). En soja, se ha visto una regulación de las lacasas por Cu, mostrándose un aumento de la actividad lacasa en las raíces de las plantas tratadas con Cu (Lin y col., 2005).

3.8. PLANTACIANINA

La plantacianina es una proteína de Cu de la matriz extracelular que podría estar implicada en el desarrollo de las anteras y en la polinización. En *A. thaliana*, se ha encontrado un solo gen de plantacianina con expresión en los tejidos vegetativos y reproductivos del esporofito, así como en el gametofito femenino (Dong y col., 2005). La regulación postranscripcional de la plantacianina se produce mediante micro ARNs de Cu (Sunkar y Zhu, 2004; Abdel-Ghany y Pilon, 2008; Maunoury y Vaucheret, 2011) (apartado 4.4.2).

4. HOMEOSTASIS DEL COBRE EN LAS PLANTAS

4.1. BIODISPONIBILIDAD Y MOVILIZACIÓN DEL COBRE EN EL SUELO

La absorción principal de los metales es a través de la raíz, tomándolos del suelo. La cantidad de Cu que las plantas pueden absorber por las raíces depende de diferentes factores como la concentración, la adsorción del metal a los componentes del suelo, el contenido de agua del suelo, el tamaño y la capacidad de absorción del sistema radicular. Una vez absorbido, el Cu se distribuye por los diferentes órganos y se localiza para su almacenamiento y uso (Kehr, 2013).

Entre las estrategias de las plantas para la adquisición de Cu por las raíces se encuentran la acidificación del suelo y la reducción del Cu^{2+} a Cu^+ para su posterior incorporación por transportadores de alta afinidad (Palmer y Guerinot, 2009; Bernal y col., 2012). Debido a que el Cu puede encontrarse en forma insoluble, especialmente en los suelos alcalinos, uno de los posibles mecanismos utilizados por las plantas es la extrusión de protones. De esta forma, consiguen disminuir el pH del suelo utilizando la actividad ATPasa en condiciones limitantes de Cu (Palmer y Guerinot, 2009). La acidificación del suelo también puede producirse mediante la extrusión de ácidos orgánicos (Aguado-Santacruz y col., 2012).

La incorporación del Cu en las células se produce mediante transportadores de alta afinidad. Estos transportadores tienen afinidad específica por un estado de oxidación particular, que puede no ser el predominante en el suelo. Las plantas pueden superar esta dificultad gracias a una estrategia de reducción del Cu para su posterior absorción (Puig y col., 2007a). De esta forma, la adquisición de Cu de alta afinidad en *A. thaliana* requiere de la reducción de Cu^{2+} a Cu^+ dependiente de las proteínas FRO4 y FRO5 (*Ferric Reduction Oxidase*) (Bernal y col., 2012). El genoma de *A. thaliana* codifica para un total de ocho miembros de la familia FRO con diferentes funciones en la homeostasis del Cu y Fe (Robinson y col., 1997; Robinson y col., 1999; Waters y col., 2002; Mukherjee y col., 2006; Bernal y col., 2012; Jain y col., 2014). *AtFRO4* y *AtFRO5* son dos genes localizados en tándem en el cromosoma 5 de *A. thaliana* que codifican para una reductasa de Cu^{2+} de la superficie de la raíz. La expresión de estos genes y la actividad reductasa de Cu^{2+} se ven fuertemente inducidas en condiciones limitantes de Cu (Bernal y col., 2012).

La estrategia de reducción del Cu para la toma por la planta parece ser el mecanismo predominante para la adquisición de Cu en dicotiledóneas (Jouvin y col., 2012; Ryan y col., 2013). Una vez reducido el Cu^{2+} a Cu^+ por las proteínas FRO4 y FRO5 (Bernal y col., 2012), la mayoría del Cu en plantas entra en las células vegetales por transportadores COPT (*Copper*

continuo que se comunica célula a célula por plasmodesmos (Barceló y col., 2001). El Cu es capaz de difundir por el apoplasto de algunas células de la raíz hasta que se ve bloqueado debido a la impermeabilidad de la banda de Caspary en la endodermis. En este punto, el Cu debe ser transportado activamente a través de la membrana plasmática al espacio simplástico, donde puede moverse a través de plasmodesmos a las capas interiores de la raíz y ser, subsecuentemente, cargado en los haces vasculares (Barceló y col., 2001; Adrees y col., 2015).

4.2.2. Transporte a través del xilema

Una vez incorporado el Cu en la raíz, éste puede ser activamente cargado en el xilema y transportado a través de la corriente de transpiración (Adrees y col., 2015). El sistema vascular, incluyendo el xilema y el floema, es un segmento esencial para la translocación de micronutrientes a larga distancia (Álvarez-Fernández y col., 2014). Para ello, el Cu es cargado desde el simplasto de la raíz hacia el xilema, y en este proceso parece que están implicados los transportadores de Cu HMA5 (*Heavy Metal APTase 5*) (Deng y col., 2013).

La concentración de Cu en el fluido del xilema se encuentra en el rango de 0,3-7 μM en diferentes especies (Hocking, 1980; White, 1981; Hocking, 1983; Pich y Scholz, 1996; Alam y col., 2001; Nakamura y col., 2008; Irtelli y col., 2009; Ando y col., 2013; Deng y col., 2013). Esta concentración se puede ver aumentada cuando las plantas son tratadas con exceso de Cu en el medio de cultivo o con concentraciones control tras un periodo de deficiencia (Álvarez-Fernández y col., 2014).

Se ha propuesto que los metales presentes en los fluidos vegetales no se encuentren como iones libres, sino en formas menos reactivas unidos no covalentemente a compuestos orgánicos. La formación de complejos metálicos provee solubilidad y protección durante el transporte a larga distancia (Clemens, 2001; Haydon y Cobbett, 2007; Álvarez-Fernández y col., 2014). El transporte a larga distancia de Cu puede estar mediado por complejos con ácido desoximugineico (DMA) formando Cu^{2+} -DMA (von Wiren y col., 1999), nicotinamina (NA) formando Cu^{2+} -NA (Pich y Scholz, 1996; Curie y col., 2009) o con histidina formando Cu^{2+} -His (Liao y col., 2000; Koster y col., 2011). En el xilema de arroz (*Oryza (O.) sativa*), se ha descrito al DMA como la molécula dominante acomplejada con Cu (Ando y col., 2013), mientras que en el de tomate (*Solanum (S.) lycopersicum*), se le ha atribuido un papel directo a la NA en el transporte de Cu desde la raíz hacia la parte aérea de la planta vía xilema. Estudios con el mutante de tomate *chloronerva*, que no posee NA (Pich y Scholz, 1996), muestran que las plantas mutantes se comportan como deficientes de Cu (Herbik y col., 1996) y tienen un

desorden en la distribución del Cu. Así, acumulan Cu en las raíces mientras que las hojas sufren severa deficiencia de Cu, que puede ser restablecida por un aporte exógeno de NA, lo que sugiere que la NA está implicada en la translocación del Cu en el xilema (Pich y Scholz, 1996).

Posteriormente, el Cu acomplejado con NA u otras moléculas orgánicas debe ser transportado fuera del xilema y transferido al floema (Zheng y col., 2012). Se ha visto que entre el xilema y los tejidos colindantes hay un intenso intercambio de nutrientes (Metzner y col., 2010).

4.2.3. Transporte a través del floema

La distribución de los micronutrientes a los órganos en desarrollo de las plantas depende en gran medida del transporte a través del floema. A diferencia del xilema, el floema está formado por una columna de células vivas (Álvarez-Fernández y col., 2014). Los metales pesados se movilizan desde los órganos maduros a los órganos jóvenes en crecimiento vía el floema, y esta redistribución mineral parece intensificarse en condiciones de deficiencia (Stephan y Scholz, 1993). El floema también está implicado en la comunicación entre los diferentes órganos para la coordinación del aporte de nutrientes según el estado nutricional, mediante el transporte de moléculas de señalización. Así, se han identificado ARNs de pequeño tamaño en el floema que podrían actuar en la homeostasis de Cu sistémica (Kehr, 2013).

La concentración de Cu en el floema varía entre 8-31 μM (Hocking, 1980; Hocking, 1983; Stephan y Scholz, 1993; Schmidke y Stephan, 1995; Ando y col., 2013). Las diferencias en la concentración de Cu en el floema muestran una dependencia de la concentración de micronutrientes con la especie, el órgano y el estado ontogénico de la planta (Stephan y Scholz, 1993). El Cu se ha detectado en el floema formando complejos de Cu^{2+} -NA, Cu^{2+} -His y con compuestos de alto peso molecular en arroz (Ando y col., 2013). En tabaco (*Nicotiana (N.) tabacum*), la NA parece estar implicada en el transporte de metales a hojas jóvenes, órganos reproductivos y semillas (Takahashi y col., 2003).

También se han encontrado en el floema proteínas que contienen Cu como la Cu/ZnSOD, la chaperona de Cu CCH y diversas metalotioneínas (Mira y col., 2001a; Aki y col., 2008; Lattanzio y col., 2013). Las metalotioneínas son proteínas de bajo peso molecular (4-8 kDa) que unen metales como el Cu, Zn o Cd (Leszczyszyn y col., 2013) y aumentan en condiciones de alto Cu (Guo y col., 2003; Zlobin y col., 2014). Se les atribuye un importante

papel en la tolerancia al Cu y movilización del Cu desde hojas en senescencia (Benatti y col., 2014; Liu y col., 2015a).

La descarga de Cu desde el xilema y la carga del floema podrían estar mediadas por transportadores de las familias YS (*Yellow Stripe 1*) y YSL (*Yellow Stripe 1-Like Transporter*). YSL2 en *A. thaliana* y YS1 y YSL16 en arroz podrían estar implicados en el transporte de Cu-NA entre los haces vasculares (DiDonato y col., 2004; Roberts y col., 2004; Zheng y col., 2012).

4.3. TRÁFICO INTRACELULAR DEL COBRE EN PLANTAS

4.3.1. Chaperonas de cobre

Debido a que los iones de Cu libre no están presentes en el citoplasma de las células eucariotas, la interacción con las metalochaperonas es necesaria para la entrega del Cu⁺ a las cuproproteínas intracelulares y transportadores (Puig y Peñarrubia, 2009). Las chaperonas de Cu tienen un papel crítico al transportar el Cu hasta las proteínas diana dependientes de este metal, impidiendo, así, las reacciones indeseadas del Cu libre con otros componentes celulares (Figura 2) (Harrison y col., 2000). Estas proteínas se han identificado desde procariotas hasta humanos (Harrison y col., 2000). Las chaperonas de Cu fueron caracterizadas por primera vez en *Sacharomices (S.) cerevisiae*, la primera chaperona de Cu identificada en levaduras fue ATX1 (*Antioxidant 1*), seguida de COX17 (*Cytochrome c Oxydase Copper Chaperone 17*) y CCS (*Copper Chaperone for Cu/ZnSOD*) (Leitch y col., 2009b; Banci y col., 2010).

AtATX1 es homóloga de *ScATX1* de levaduras (Puig y col., 2007b). Se trata de una proteína localizada en el citosol cuya expresión se induce durante la senescencia y estrés oxidativo (Puig y col., 2007b). Se ha visto que esta chaperona es necesaria para la tolerancia al exceso o deficiencia de Cu (Shin y col., 2012) y su expresión en plantas de *A. thaliana* está estrictamente regulada para evitar un desequilibrio que podría producir un exceso de secuestro del Cu (Shin y Yeh, 2012).

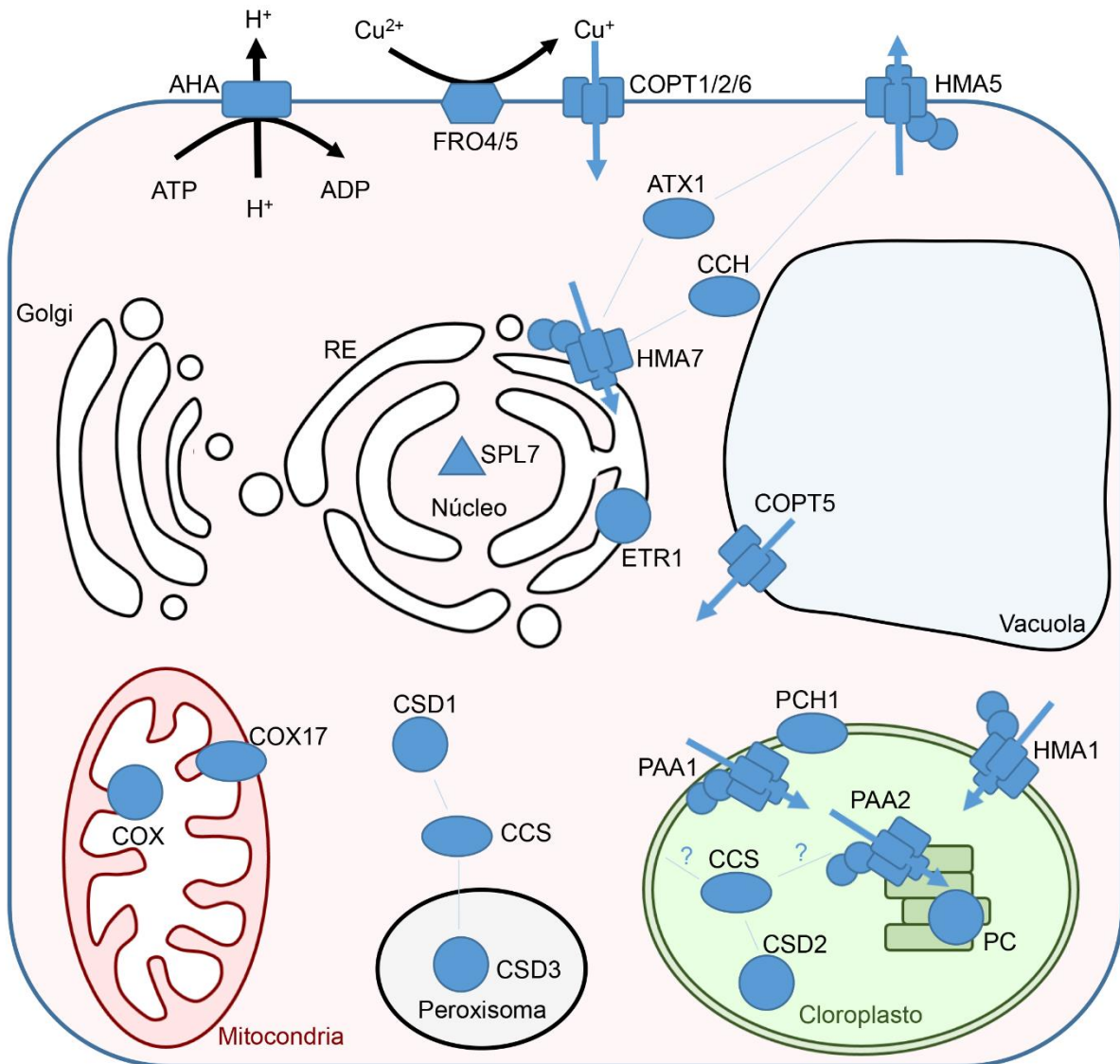


Figura 2. Modelo de la homeostasis del Cu en *A. thaliana*. Representación de la localización celular de transportadores y proteínas de Cu. La toma de Cu⁺ a través de la membrana plasmática por los transportadores COPT1/COPT2/COPT6 (*Copper Transporter*) depende de la actividad de la proteína AHA (*Arabidopsis H⁺-ATPase*) y FRO4/FRO5 (*Ferric Reductase Oxidase*). El transporte de Cu⁺ mediado por las proteínas COPT está acoplado a la transferencia a las metalochaperonas y su entrega a las proteínas diana. La cuprochaperona CCS (*Copper Chaperone for Superoxide Dismutase*) entrega el Cu⁺ a la CSD1 (*Cu/Zn Superoxide Dismutase 1*) citosólica, CSD2 cloroplástica y CSD3 peroxisomal. ATX1 (*Antioxidant 1*) y CCH (*Copper Chaperone*) interactúan con las ATPasas HMA7 (*Heavy Metal ATPase 7*) y HMA5. HMA7 se localiza en el RE (retículo endoplásmico), donde el Cu⁺ es adquirido por el receptor de etileno ETR1 (*Ethylene Receptor*). En la vacuola, el Cu se exporta a través del transportador COPT5. En la mitocondria, la chaperona COX17 (*Cytochrome c Oxydase Copper Chaperone 17*) lo entrega a la COX (*Cytochrome c Oxydase*). El aporte de Cu⁺ al cloroplasto se realiza a través de PAA1 (*P-Type ATPase in Arabidopsis 1*) gracias a la interacción con la chaperona PCH1 (*Plastid Chaperone 1*) y a través de PAA2 hasta el lumen de los tilacoides, donde se encuentra la PC (*Plastocianina*). En el núcleo, el

Figura 2 (continuación). factor de transcripción SPL7 (*Squamosa Promoter Binding Protein-Like 7*) coordina la respuesta a la deficiencia de Cu. Las flechas azules representan el tráfico de Cu⁺, las líneas azules representan interacción.

AtCCH (*Copper Chaperone*) es también homóloga de *ScATX1* de levaduras, con la cual comparte un 36% de identidad (Himelblau y col., 1998), y cuenta con un dominio C-terminal exclusivo de plantas (Mira y col., 2001b). La expresión de *AtCCH* se induce en senescencia (Himelblau y col., 1998) y se ha visto que la cantidad de proteína también aumenta, por lo que se piensa que puede estar involucrada en el transporte de Cu a larga distancia (Mira y col., 2001a). Se le ha atribuido un papel en el transporte simplástico a través de los plasmodesmos durante la senescencia asociado a la movilización de nutrientes (Puig y col., 2007a). Este gen se encuentra regulado específicamente por Cu, viéndose una disminución del mismo en plantas de *A. thaliana* tratadas con exceso de Cu (Mira y col., 2001a).

AtCOX17 es una chaperona de Cu cuya función es la de transportar Cu hasta la proteína citocromo c oxidasa en las mitocondrias (Balandin y Castresana, 2002). Se encuentra principalmente en la raíz (Wintz y Vulpe, 2002). La expresión de *AtCOX17* está regulada por Cu, viéndose un aumento en condiciones de exceso de Cu, además de otros estímulos como la inoculación con bacterias y el ácido salicílico (Balandin y Castresana, 2002).

Recientemente se ha identificado en *Chlamydomonas* (*C.*) *reinhardtii* la chaperona PCH1 (*Plastid Chaperone 1*). Esta chaperona se origina por procesamiento alternativo de *CTP2* (ortólogo de *PAA1/HMA6*, *P-type ATPase in Arabidopsis 1/Heavy Metal ATPase 6*), que da lugar a un ARNm de pequeño tamaño que comparte los dos primeros exones con *PAA1/HMA6*. Este ARNm codifica para una proteína soluble de 172-256 aminoácidos (aa) que mantiene la porción N-terminal correspondiente a la ATPasa, incluyendo el motivo de unión a Cu⁺ MXCXXC. Se ha visto que *AtPCH1* está localizada en el espacio entre las envueltas del cloroplasto y tiene actividad como chaperona de Cu⁺ capaz de transferir el metal específicamente a *AtPAA1/HMA6*. Similares eventos de procesamiento alternativo se han encontrado en *A. thaliana*, *Boechera* (*B.*) *stricta*, *Capsella* (*C.*) *rubella*, *Mimulus* (*M.*) *gluttatus*, *Citrus* (*C.*) *sinensis*, *Eucaliptus* (*E.*) *grandis* y *Aquilegia* (*A.*) *coerulea*. En otras especies, *PAA1/HMA6* y *PCH1* están codificadas por diferentes loci, como ocurre en *Brassica* (*B.*) *rapa*, *Cucumis* (*C.*) *sativus*, *Gospium* (*G.*) *raimondii*, *Brachypodium* (*B.*) *distachyon*, *O. sativa*, *Panicum* (*P.*) *virgatum*, *Sorgum* (*S.*) *bicolor* y *Zea* (*Z.*) *mays*. En las especies *Glycine* (*G.*) *max* y *Populus* (*P.*) *trichocarpa* se han encontrado dos genes codificantes para *PAA1*, así como procesamiento alternativo en uno de los loci (Blaby-Haas y col., 2014).

AtCUTA es una proteína de localización cloroplástica capaz de unir Cu^{2+} , candidata a ser una chaperona de Cu^{2+} de este compartimento. Esta proteína está codificada por un gen sujeto a procesamiento alternativo (Burkhead y col., 2003).

4.3.1.1. La chaperona de cobre CCS

AtCCS es una proteína que funciona como chaperona de Cu homóloga a CCS de levaduras (Abdel-Ghany y col., 2005a). Su función es la transferencia de Cu a su diana, la Cu/ZnSOD, una enzima que usa las propiedades de oxidación-reducción del Cu para reducir la presencia de superóxido, protegiendo, así, a las células contra el daño oxidativo (Puig y Thiele, 2002). Esta chaperona podría estar también implicada en la transferencia de Cu^+ al transportador *AtPAA2/HMA8* (Blaby-Haas y col., 2014). Sin embargo, la ausencia de defectos fotosintéticos en el mutante *ccs* de *A. thaliana* sugiere que *AtCCS* no es imprescindible para la transferencia de Cu^+ a *AtPAA2/HMA8* (Blaby-Haas y col., 2014).

La primera descripción de CCS se realizó en levaduras y desde entonces CCS ha sido encontrada en una gran variedad de eucariotas (Culotta y col., 1997). En plantas, se ha identificado y descrito en algunas especies como tomate (Zhu y col., 2000), patata (Trindade y col., 2003), maíz (Ruzsa y Scandalios, 2003), *A. thaliana* (Abdel-Ghany y col., 2005a) y soja (Sagasti, 2009).

En *A. thaliana*, se ha identificado un solo gen de *AtCCS* compuesto por 6 exones y 5 intrones. Este gen posee un ATG adicional localizado 66 aa aguas arriba, lo que corresponde con un péptido señal de tránsito al cloroplasto (Chu y col., 2005). Debido a esta particularidad, la localización de la proteína es a la vez citosólica y cloroplástica (Abdel-Ghany y col., 2005a), y se ha visto que *AtCCS* es capaz de activar las tres formas de Cu/ZnSOD de diferentes compartimentos subcelulares (Chu y col., 2005).

El análisis de mutantes *ccs* de *A. thaliana* no mostró un fenotipo apreciable (Cohu y col., 2009). Tan sólo se ha descrito una menor eliminación de ROS en condiciones de deficiencia de Fe (Waters y col., 2012). Las plantas sin CCS y sin actividad Cu/ZnSOD en condiciones de exceso de Cu no tienen un fenotipo visible y se desarrollan normalmente a pesar de ser expuestas a elevada luz, lo que sugiere que la Cu/ZnSOD es un componente prescindible en el sistema fotosintético antioxidante (Cohu y col., 2009).

La estructura de la proteína ScCCS en levaduras (Figura 3) está formada por tres dominios. El dominio I, similar a ATX1, se encuentra en el extremo N-terminal y está constituido por 2 hélices α y 4 hojas β formando un plegamiento $\beta\alpha\beta\beta\alpha\beta$. El dominio II, de alta

homología con su diana Cu/ZnSOD, se localiza en la porción central y está constituido por 8 hojas β antiparalelas formando un barril, 2 hélices α pequeñas y 4 bucles conectores. El dominio III o C-terminal corresponde con una zona fundamentalmente desordenada. Los dominios I y II tienen una interacción mínima entre ellos, y están conectados por una zona de aminoácidos flexible. La interacción entre monómeros de ScCCS se produce por el dominio II (Lamb y col., 1999). La chaperona CCS posee dos posibles sitios de unión a Cu que corresponden con la secuencia MXCXXC en el dominio I y CXC en el dominio III (Sagasti y col., 2011). Las proteínas CCS de otras especies como humanos (Rae y col., 2001), *A. thaliana* (Abdel-Ghany y col., 2005a) o soja (Sagasti y col., 2011), presentan una estructura similar con tres dominios tal y como se ha descrito anteriormente para ScCCS.

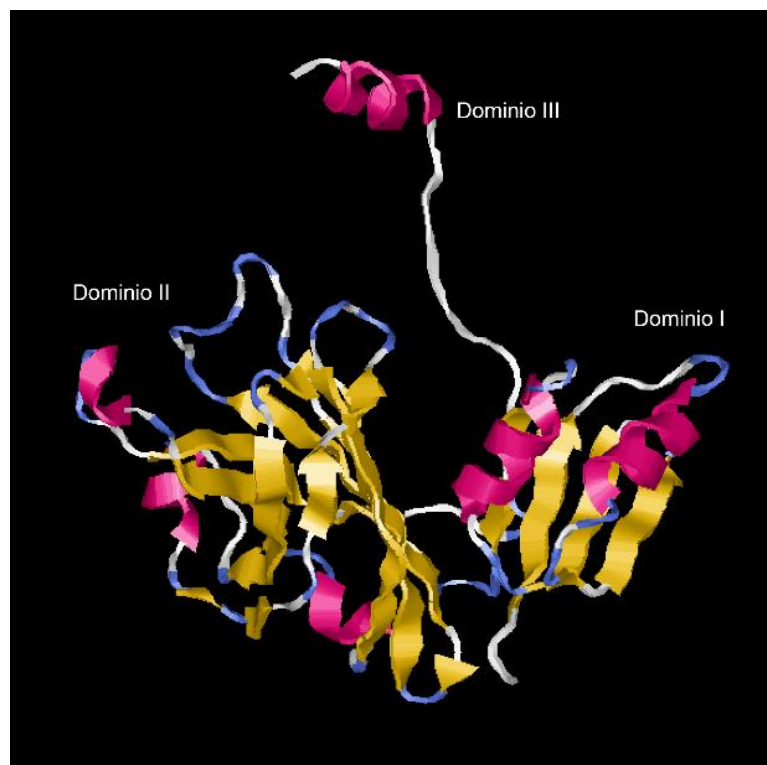


Figura 3. Estructura de la proteína CCS de *S. cerevisiae*. Los tres dominios de la proteína están señalados. Las hojas β se muestran en amarillo, las hélices α en rosa y los giros en azul. Código PDB: 1JK9 (Lamb y col., 2001).

Sin embargo, no todas las proteínas CCS contienen el sitio de unión a metal en el dominio I, por ejemplo éste no se encuentra en organismos como *Schizosaccharomyces* (*S.*) *pombe* o *Drosophila* (*D.*) *melanogaster* (Leitch y col., 2009b). Se ha visto en levaduras y *A. thaliana* que este dominio no es imprescindible, aunque sí es necesario para la máxima actividad cuando la disponibilidad de Cu es limitada (Schmidt y col., 1999a; Chu y col., 2005), por lo que podría tener un importante papel en el reclutamiento del Cu en condiciones

limitantes (Schmidt y col., 1999a). Por otro lado, en humanos, parece que tanto el dominio I como los dominios II y III son necesarios para la maduración de la HsSOD (Banci y col., 2012a).

El dominio II de CCS comparte una alta homología con su diana, la Cu/ZnSOD. En humanos, comparten alrededor del 50% de identidad (Schmidt y col., 1999b). Se ha visto que este dominio es necesario para la interacción entre CCS y Cu/ZnSOD en ratas y en levaduras (Hiromura y col., 2000; Lamb y col., 2001), y parece tener un papel en el reconocimiento de su diana (Schmidt y col., 1999a).

El dominio III es esencial para la actividad de ScCCS y parece estar implicado en la transferencia directa de Cu a la Cu/ZnSOD. El motivo CXC del dominio III es crítico para la actividad de ScCCS y tiene la capacidad de unir Cu^+ (Schmidt y col., 1999a).

Parece que la apo-ScCCS se encuentra predominantemente como un monómero, mientras que la CCS cargada con Cu^+ podría existir como una mezcla de monómero y dímero (Schmidt y col., 1999a). Por otra parte, se ha propuesto que la interacción entre ScCCS y ScSOD en levaduras se produce mediante la formación de un intermediario transitorio en forma de heterodímero compuesto por un monómero de ScCCS y un monómero de ScSOD (Lamb y col., 2000). La transferencia del Cu desde la CCS hasta la SOD en levaduras y humanos se produce por transferencia directa, por lo que el Cu nunca se libera a la solución (Rae y col., 1999; Rae y col., 2001). La activación de la Cu/ZnSOD por parte de su chaperona en humanos y levaduras podría producirse en diferentes etapas incluyendo la formación de un puente disulfuro y la adquisición de Cu (Furukawa y col., 2004; Banci y col., 2013). También parece que el glutatión (GSH) podría estar implicado en la activación de la Cu/ZnSOD en *A. thaliana* (Huang y col., 2012a).

En algunos organismos, la activación de la Cu/ZnSOD parece ser absolutamente dependiente de CCS, mientras que en otros parece ser facultativa o incluso independiente. En el nemátodo *Caenorhabditis (C.) elegans* no se ha encontrado ningún gen que codifique para un homólogo de CCS en su genoma. En este organismo, la Cu/ZnSOD no necesita a la chaperona para su activación, sino que utiliza un mecanismo independiente de CCS en el que el glutatión está implicado (Leitch y col., 2009a). En moluscos tampoco se han identificado ninguna potencial chaperona de la Cu/ZnSOD (Leitch y col., 2009b). La dependencia de la Cu/ZnSOD para su activación por CCS reside en residuos de prolina identificados en el hongo *Beauveria (B.) bassiana* (Xie y col., 2010) y levaduras (Leitch y col., 2009b). En organismos como las levaduras, se ha visto que la activación *in vitro* de ScSOD puede ser independiente

de ScCCS en condiciones de alta concentración de Cu. Sin embargo, *in vivo*, debido a que la concentración de Cu es mucho menor, ScSOD es dependiente de ScCCS (Rae y col., 1999), por lo que en estos organismos, ScCCS es necesaria para la activación de ScSOD (Torres y col., 2001). En *D. melanogaster*, ratón (*Mus (M.) musculus*) y humanos, la SOD puede ser activada de manera dependiente e independiente de CCS, aunque la máxima actividad SOD se obtiene con CCS (Leitch y col., 2009b). En la vía de activación de HsSOD independiente de HsCCS, se piensa que podría estar implicado el glutatión (Carroll y col., 2004). En plantas superiores, la activación de Cu/ZnSOD independiente de AtCCS parece ser insignificante *in vivo* (Cohu y col., 2009). En los mutantes *ccs* no se observa activación de Cu/ZnSOD, incluso en presencia de transcritos de Cu/ZnSOD y proteína, lo que parece indicar que AtCCS es necesaria para la activación de todos los tipos de Cu/ZnSOD. A pesar de esto, se ha detectado una pequeña activación de Cu/ZnSOD independiente de CCS (Chu y col., 2005; Cohu y col., 2009). Esto podría deberse a que AtCSD1 y AtCSD3 pueden ser activadas independientemente de AtCCS; sin embargo, AtCSD2 no puede ser activada independientemente de AtCCS cuando se encuentra en el cloroplasto. Por lo que parece que la activación de las Cu/ZnSOD independiente de CCS podría ocurrir solo en el citoplasma y no en el cloroplasto. También se ha descrito un posible papel del glutatión (GSH) en la activación de AtCSD2 (Huang y col., 2012b)

La chaperona AtCCS está regulada específicamente por Cu de manera similar a sus dianas AtCSD1 y AtCSD2, aumentando conforme a la concentración de Cu añadido al medio (Abdel-Ghany y col., 2005a; Cohu y col., 2009). También se ha visto un aumento durante la senescencia de la planta (Abdel-Ghany y col., 2005a) y una posible regulación mediante procesamiento alternativo en soja (Sagasti y col., 2014). Por otra parte, se ha visto que la actividad del promotor de AtCCS está presente en la mayoría de los tejidos y no está regulada por Cu (Cohu y col., 2009).

4.3.2. Los transportadores de membrana

4.3.2.1. La familia COPT

Los transportadores de la familia CTR en *A. thaliana* (COPT) transportan específicamente Cu⁺ con alta afinidad al citoplasma celular. Son pequeñas proteínas integrales de membrana con 3 regiones transmembrana (Sancenón y col., 2003), un extremo N-terminal en el espacio extracelular con motivos ricos en metionina (Met), un extremo C-terminal y bucles entre los dominios transmembrana 2 y 3 orientados hacia el citosol (Eisses y Kaplan, 2002; Puig y Thiele, 2002; Klomp y col., 2003), que funcionan como trímeros (Pope

y col., 2012). Se conocen 6 transportadores COPT en *A. thaliana* (Sancenón y col., 2003; Jung y col., 2012), 7 en arroz (Yuan y col., 2011) y 8 en vid (*Vitis (V.) vinifera*) (Martins y col., 2012).

AtCOPT1 está implicado en la toma y acumulación de Cu (Sancenón y col., 2004). Se expresa en hojas, flores (Sancenón y col., 2003), puntas de las raíces y granos de polen (Sancenón y col., 2004). Se ha descrito que las plantas con pérdida de función de *AtCOPT1* son más sensibles a la limitación de Cu y tienen defectos en el desarrollo del polen (Sancenón y col., 2004). La expresión del gen *AtCOPT1* está regulada por Cu, se observa un aumento de la expresión de *AtCOPT1* en las raíces en condiciones limitantes de Cu (Pilon y col., 2009), mientras que la adición de Cu disminuye su expresión (Sancenón y col., 2003).

AtCOPT2 es una proteína localizada en la membrana plasmática (Gayomba y col., 2013; Perea-García y col., 2013) cuya posible función es el transporte de Cu de alta afinidad a través de la membrana (Sancenón y col., 2003). Muestra un patrón de expresión similar a *AtCOPT1*, observándose también una regulación por Cu (Sancenón y col., 2003; del Pozo y col., 2010). Se ha observado que *AtCOPT2* se expresa en condiciones de deficiencia de Cu en la mayoría de los tejidos (Yamasaki y col., 2009; Perea-García y col., 2013; Billard y col., 2014) y también parece que la expresión es inducida por deficiencia de Fe (Yuan y col., 2011; Perea-García y col., 2013).

AtCOPT6 parece contribuir a la toma de Cu en raíces en condiciones de deficiencia de Cu, y a la distribución de Cu en tejidos fotosintéticos bajo condiciones de crecimiento normales (Jung y col., 2012). Se trata de una proteína localizada en la membrana plasmática que se expresa principalmente en los conductos vasculares de la parte aérea de la planta y órganos reproductivos. La regulación de *AtCOPT6* según disminuye la cantidad de Cu es más gradual y menos severa que en el caso de *AtCOPT1* (García-Molina y col., 2013). Se ha observado que la proteína COPT6 es capaz de interactuar con COPT1 y consigo misma (Jung y col., 2012).

Los transportadores *AtCOPT1*, *AtCOPT2* y *AtCOPT6* también parecen estar regulados por cadmio (Cd). En plantas crecidas en presencia de Cd, la expresión de estos transportadores es mayor que en las plantas crecidas bajo condiciones control (Gayomba y col., 2013).

Se piensa que *AtCOPT3* y *AtCOPT5* podrían estar implicados en la movilización del Cu desde los compartimentos celulares hacia el citosol (Burkhead y col., 2009; Billard y col., 2014). *AtCOPT5* ha sido localizado en el tonoplasto (García-Molina y col., 2011) y podría estar implicado en la movilización de Cu desde el lumen de las vesículas prevacuolares hacia el

citósol (García-Molina y col., 2011) y actuar en la distribución de Cu desde las raíces hasta los tejidos reproductivos (Klaumann y col., 2011). También se ha destacado el papel de *AtCOPT5* como un componente de la resistencia basal a Cd de *A. thaliana* (Carrió-Seguí y col., 2014). *AtCOPT5* se expresa en la endodermis de la raíz y tejidos vasculares y, a diferencia de otros miembros de la familia COPT, no parece estar regulado por Cu (García-Molina y col., 2011). En *V. vinifera* se ha identificado el transportador *VvCTR1* (*Copper Transporter 1*) de la familia CTR, capaz de rescatar el fenotipo del mutante de *A. thaliana* *copt5*. Este transportador está localizado en la membrana vacuolar y está implicado en la movilización del Cu (Martins y col., 2014).

AtCOPT4 es el único miembro de la familia COPT que carece de los motivos con His y Met esenciales, lo que sugiere que *AtCOPT4* podría no tener un papel directo en el transporte de Cu (Sancenón y col., 2003).

4.3.2.2. La familia HMA

La familia HMA (*Heavy Metal ATPase*) está constituida por ATPasas de tipo P_{1B} que transportan metales cargados positivamente desde el citoplasma (Puig y col., 2007a). Se conocen 8 ATPasas de tipo P_{1B} transportadoras de metales (HMA) en *A. thaliana* (Colangelo y Guerinot, 2006), 9 en arroz y 10 en cebada, con diferente distribución, localización subcelular, especificidad por metales y regulación, lo que es indicativo de que realizan diferentes funciones (Williams y Mills, 2005).

Las ATPasas de tipo P_{1B} (Figura 4) poseen 8 hélices α transmembrana, un pequeño bucle citoplasmático entre las hélices 4 y 5 y un bucle grande citoplasmático entre las hélices 6 y 7. Poseen regiones conservadas en todas las ATPasas de tipo P, como son el dominio P de fosforilación, el dominio A actuador, el dominio N de unión a nucleótidos y regiones características de las ATPasas tipo P_{1B}, como son el motivo CPX en el sexto dominio transmembrana implicado en la translocación de metales, el locus HP y motivos de unión a metal en el extremo N- o C-terminal (Kuhlbrandt, 2004; Williams y Mills, 2005).

Esta familia se divide en dos grupos en función del metal transportado: las ATPasas de tipo P_{1B} HMA1-4 transportan cationes divalentes (Zn^{2+} , Cd^{2+} , Cu^{2+}), mientras que las P_{1B}-ATPasas HMA5-8 están involucradas en el transporte de Cu^+ (Axelsen y Palmgren, 2001; Puig y col., 2007a).

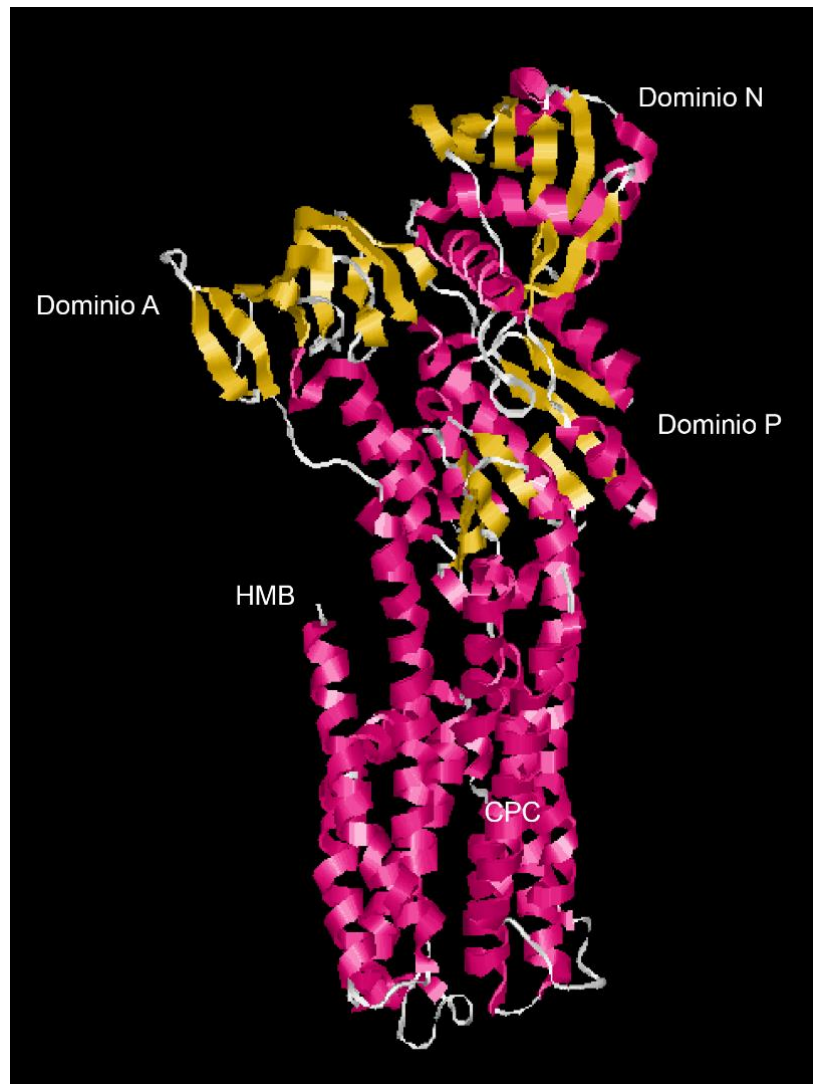


Figura 4. Estructura de la ATPasa P_{1B} transportadora de Cu CopA de *Legionella* (*L.*) *pneumophila*. Las hojas β se muestran en amarillo y las hélices α en rosa. Está indicado el dominio de unión a metal (HMB), los dominios A, N, P y motivo CPC. Código PDB: 4BBJ (Andersson y col., 2014).

- HMA1

AtHMA1 se localiza en la envuelta del cloroplasto (Kim y col., 2009) y podría estar implicado en la entrega de Cu al estroma (Seigneurin-Berny y col., 2006) o en la exportación de Zn²⁺ hacia el citoplasma (Kim y col., 2009). Parece que se trata de una proteína capaz de transportar un amplio rango de iones, incluyendo el Ca²⁺ (Moreno y col., 2008). *AtHMA1* se expresa en la parte aérea de las plantas (Seigneurin-Berny y col., 2006; Kim y col., 2009). El mutante *hma1* de *A. thaliana* presenta un crecimiento reducido en condiciones de exceso de Zn (Kim y col., 2009), fotosensibilidad en intensa iluminación, menor contenido de Cu en el cloroplasto y menor actividad SOD (Seigneurin-Berny y col., 2006).

En cebada (*Hordeum (H.) vulgare*), se ha caracterizado la proteína HvHMA1, homóloga a AtHMA1, tanto a nivel estructural como funcional. Se considera una ATPasa cloroplástica de amplia especificidad, capaz de transportar Zn y Cu fuera de los plastidios, que podría estar implicada en la redistribución de los metales en condiciones de deficiencia o durante el proceso de llenado de las semillas (Mikkelsen y col., 2012).

- HMA5

AtHMA5 es una proteína de 995 aa con las características principales de las ATPasas de tipo P transportadoras de metales (Andrés-Colés y col., 2006). Se considera que puede participar en la exportación de Cu de la célula y contribuir a la reducción del posible efecto tóxico de un exceso de Cu (Burkhead y col., 2009). Se ha visto que AtHMA5 es capaz de interactuar con las chaperonas AtATX1 y AtCCH (Andrés-Colés y col., 2006). AtHMA5 se expresa principalmente en raíces y flores, y se ha visto que la expresión se induce específicamente por exceso de Cu (Andrés-Colés y col., 2006).

En arroz, se ha visto que OsHMA5 se localiza en la membrana plasmática de las células del periciclo de las raíces en el estado vegetativo principalmente, mientras que en el estado reproductivo, se observa en la región del xilema. Parece que está implicado en la carga de Cu en el xilema (Deng y col., 2013). En *A. thaliana* se ha visto que las plantas con diferentes alelos del gen AtHMA5 tienen diferente tolerancia al Cu, debido a una diferente capacidad de translocación específica del Cu desde las raíces a los tallos (Kobayashi y col., 2008).

En *Cucumis (C.) sativa* se han encontrado dos genes diferentes para este transportador, CsHMA5.1 y CsHMA5.2, localizados en diferentes cromosomas (Migocka y col., 2015a). Ambas proteínas parecen transportar Cu⁺ y Ag⁺, y podrían estar localizadas en el tonoplasto. CsHMA5.1 y CsHMA5.2 tienen una diferente regulación, lo que podría indicar que desempeñan diferentes funciones biológicas. Mientras la expresión de CsHMA5.1 no se ve afectada por la concentración de Cu, la expresión CsHMA5.2 se reduce en deficiencia de Cu y aumenta en exceso de Cu, lo que indica que CsHMA5.1 podría comportarse como un transportador constitutivo, y CsHMA5.2 podría funcionar en la detoxificación de Cu en condiciones de estrés por exceso de Cu (Migocka y col., 2015b).

- RAN1/HMA7

AtRAN1/HMA7 (*Responsive to Antagonist 1*) codifica para una ATPasa de tipo P_{1B} con función en el transporte de Cu (Hirayama y col., 1999). AtRAN1/HMA7 está implicado en la liberación del Cu a los receptores de etileno en el retículo endoplásmico (Pilon y col., 2006).

Se ha visto que RAN1/HMA7 es necesario para la respuesta del etileno en plantas (Binder y col., 2010), siendo esencial muy al principio de la vía de señalización hormonal (Hirayama y col., 1999) en la biogénesis del receptor de etileno (Binder y col., 2010). Además, parece que *AtRAN1/HMA7* podría entregar el Cu a otras proteínas de la vía secretora (Puig y col., 2007a).

Los mutantes *ran1/hma7* muestran una triple respuesta constitutiva (inhibición de la elongación de la raíz e hipocotilo, expansión radial del hipocotilo y curvatura exagerada del epicotilo), tienen un crecimiento reducido, retraso en la floración y son estériles (Woeste y Kieber, 2000).

Al igual que *AtHMA5*, se ha visto que *AtRAN1/HMA7* es capaz de interactuar con las metalochaperonas *AtATX1* y *AtCCH* (Puig y col., 2007b).

- PAA1/HMA6

AtPAA1/HMA6 (*P-type ATPase in Arabidopsis*) posee un 42,6% de identidad con la P-ATPasa PacS de *Synechococcus* y un 37,9% de identidad con la P-ATPasa de Wilson humana (Tabata y col., 1997). *AtPAA1/HMA6* está localizado en la envuelta del cloroplasto (Abdel-Ghany y col., 2005b) y provisto de un péptido señal de tránsito al cloroplasto en el extremo N-terminal (Shikanai y col., 2003). Este transportador es capaz de transportar específicamente Cu (Catty y col., 2011).

AtPAA1/HMA6 se expresa principalmente en la parte aérea de la planta y, en menor medida, en raíz (Abdel-Ghany y col., 2005b). La expresión de *AtPAA1/HMA6* aumenta con alta concentración de glucosa en el medio y adición de ácido abscísico (ABA) (Lee y col., 2012). El análisis del promotor de *AtPAA1/HMA6* mediante la tinción histoquímica β -glucuronidasa (GUS) muestra una mayor expresión en los cotiledones, las hojas, los tejidos vasculares de las hojas y las raíces (Lee y col., 2012). En las especies *G. max* y *P. trichocarpa*, se ha encontrado una duplicación del gen *PAA1/HMA6* con eventos de procesamiento alternativo conservados al menos en un locus (Blaby-Haas y col., 2014).

La identificación de mutantes *paa1* fue posible gracias a su fenotipo de alta fluorescencia de la clorofila. Estos mutantes presentan un crecimiento reducido, acentuado en medios con deficiencia de Cu, menor contenido de holo-PC (indicativo de un aporte insuficiente de Cu en el lumen tilacoidal) y diferente patrón de actividad de las enzimas SOD. Este fenotipo se restablece al añadir Cu (Shikanai y col., 2003). También se ha visto que el mutante *paa1* tiene alterados los genes de respuesta a glucosa *ABI3* (*ABA Insensitive 3*), *ABI4*, *ABI5* y *HXK1* (*Hexokinase 1*). El promotor de *AtPAA1/HMA6* tiene secuencias de unión

a ABI4 y parece que este factor de transcripción podría regular la transcripción de *AtPAA1/HMA6* (Lee y col., 2012).

Se ha observado que los fenotipos de los mutantes *paa1* y *hma1* de *A. thaliana* son acumulativos, y se piensa que puede haber otro transportador alternativo de baja eficiencia capaz de transportar Cu en la envuelta del cloroplasto. *AtHMA1* y *AtPAA1/HMA6* podrían estar implicados en diferentes rutas de suministro de Cu al cloroplasto o interactuar con diferentes chaperonas (Boutigny y col., 2014).

- PAA2/HMA8

AtPAA2/HMA8 codifica para una ATPasa de tipo P_{1B} similar a PAA1/HMA6. Está compuesto por 16 exones y 15 intrones y posee todos los dominios conservados de las ATPasas de tipo P_{1B} de transporte de Cu (Abdel-Ghany y col., 2005b). *AtPAA2* transporta específicamente Cu⁺ con una afinidad aparente posiblemente mayor que PAA1, en el rango sub-micromolar y podría entregar el Cu⁺ directamente a la PC (Sautron y col., 2015). En soja, *GmPAA2/HMA8* comparte un 83% de similitud en su secuencia de aa con *AtPAA2/HMA8* (Bernal y col., 2007).

PAA2/HMA8 está localizado en el tilacoide (Abdel-Ghany y col., 2005b; Bernal y col., 2007; Tomizioli y col., 2014) y se ha visto que la proteína precursora contiene una secuencia de tránsito a cloroplasto escindible en el N-terminal (Abdel-Ghany y col., 2005b). A diferencia de PAA1/HMA6, PAA2/HMA8 carece de una región rica en glicinas (Gly) presente en la región localizada entre el péptido señal y el HMB en la región N-terminal de la proteína PAA1/HMA6 (Abdel-Ghany y col., 2005b), que podría servir como señal para la retención de la proteína en la envuelta del cloroplasto (Inoue y Keegstra, 2003; Abdel-Ghany y col., 2005b). Esta diferencia parece que es capaz de determinar parcialmente la diferente localización de *AtPAA1/HMA6* y *AtPAA2/HMA8* en la envuelta y en el tilacoide, respectivamente (Pilon, 2014).

La expresión de *AtPAA2/HMA8* se detecta en la parte aérea de las plantas y no está presente en raíces (Abdel-Ghany y col., 2005b). La proteína *AtPAA2* está regulada específicamente por Cu, se ha visto que en deficiencia de Cu se acumula en el tilacoide (Tapken y col., 2012). La regulación de *AtPAA2/HMA8* es postranscripcional, por el sistema de proteasas Clp (*Chloroplast Caseinolytic Protease*) (Tapken y col., 2015). El sistema Clp está localizado en el estroma, cuenta con la chaperona ClpC1 y la subunidad ClpR2 del núcleo Clp. ClpC1 y ClpR2 son proteínas de codificación nuclear. El sistema Clp es de origen procariota y tiene un núcleo proteolítico en forma de barril con chaperonas asociadas (Olinares y col., 2011). En los mutantes *clpc1-1* y *clpr2-1* aumenta *AtPAA2* en condiciones de alto Cu

en comparación con las plantas silvestres. Parece que la regulación de *AtPAA2* por *Clp* es específica, y no está presente en *AtPAA1*. A su vez, el sistema *Clp* no se ve afectado por *Cu* (Tapken y col., 2015).

El mutante *paa2* fue identificado gracias al fenotipo de mayor fluorescencia de la clorofila, pero no presenta fenotipo visible en condiciones de cultivo estándar. En estos mutantes la actividad de las SOD se ve afectada y la PC se acumula en su forma apo (Abdel-Ghany y col., 2005b). Por otra parte, el doble mutante *paa1paa2* tiene un fenotipo letal, sugiriendo la importancia de estos transportadores para las plantas (Abdel-Ghany y col., 2005b). *AtPAA1* y *AtPAA2* están implicados en el transporte de *Cu* al cloroplasto (Shikanai y col., 2003; Abdel-Ghany y col., 2005b), lo que es de vital importancia ya que al menos la mitad del *Cu* se encuentra en el cloroplasto de las células fotosintéticas de *A. thaliana* (Ravet y Pilon, 2013), aunque también se han descrito acumulaciones de *Cu* en acidocalcisomas junto con *Ca* y *P* en otros organismos como *C. reinhardtii* (Hong-Hermesdorf y col., 2014).

- Otros miembros de la familia HMA

Las ATPasas *AtHMA2* y *AtHMA4* están implicadas en la homeostasis de *Zn* (Hussain y col., 2004). *AtHMA2* es capaz de transportar Zn^{2+} , Cd^{2+} y otros cationes divalentes (Eren y Argüello, 2004). *HMA2* podría estar implicada en la exportación de Zn^{2+} desde el citoplasma (Eren y Argüello, 2004). Esta proteína se localiza en la membrana plasmática (Hussain y col., 2004; Verret y col., 2004) y su dominio de unión a metal en el extremo C-terminal parece estar implicado en la localización subcelular de la proteína (Wong y col., 2009). Por otra parte, se ha visto que *AtHMA4* también es capaz de transportar *Zn* y *Cd* y parece estar implicada en la detoxificación de metales (Mills y col., 2005). Se considera que *AtHMA2* y *AtHMA4* podrían tener funciones parcialmente redundantes, y estar implicadas en la translocación de metales pesados fuera de las células (Verret y col., 2004; Colangelo y Guerinot, 2006) y el transporte del *Cd* desde las raíces hacia los tallos (Wong y Cobbett, 2009).

Otro de los transportadores de la familia HMA implicado en la homeostasis de metales es *HMA3*. Se ha visto que *HMA3*, de localización vacuolar, podría ser responsable del secuestro intracelular de *Cd*, *Pb* (Gravot y col., 2004; Morel y col., 2009), *Co* y *Zn* (Morel y col., 2009), y los polimorfismos en este gen constituyen el mayor determinante de la cantidad de *Cd* en las hojas (Chao y col., 2012).

4.3.2.3. Otros transportadores de cobre

En arroz, se ha identificado el transportador de Cu de la familia MFS (*Major Facilitator Superfamily*) *TaCT1* (*Copper Transporter1*). Se han encontrado tres genes (*TaCT1-5A*, *TaCT1-5B* y *TaCT1-5D*) que codifican para este transportador. Se trata de una proteína localizada en el aparato de Golgi, con 12 dominios transmembrana, un bucle citoplasmático grande entre los dominios transmembrana 6 y 7 y ambos extremos N- y C-terminal localizados hacia el citoplasma. Estos genes se expresan predominantemente en las hojas mostrando un ritmo circadiano. Están regulados por Cu, mostrándose una mayor expresión en condiciones de deficiencia e inhibiéndose en exceso de Cu (Li y col., 2014).

Las proteínas de la familia YSL (*Yellow Stripe 1-Like Transporter*) pertenecen a los transportadores de oligopéptidos OPT. Representan un candidato para el transporte de complejos NA-metal a través de las membranas celulares. Son proteínas localizadas en la membrana plasmática, y su expresión está limitada al sistema vascular. Podrían estar implicadas en la descarga de metales desde el xilema a través de la toma por las células del parénquima xilemático y en la carga del floema a través de la toma por las células asociadas al floema (Curie y col., 2009).

AtYSL2, localizado en la membrana plasmática, es capaz de transportar Cu-NA y podría estar implicado en el movimiento lateral entre los haces vasculares. El gen que codifica para esta proteína se expresa principalmente en las células del parénquima xilemático y está regulado por Cu y Fe (DiDonato y col., 2004). En arroz, los transportadores *OsYS1* (*Yellow Stripe 1*) (Roberts y col., 2004) y *OsYSL16* (Zheng y col., 2012) son capaces de transportar Cu en forma Cu-NA. *OsYSL16* se expresa en la región del floema, exodermis y estela, y parece estar implicado en la distribución y redistribución del Cu a los tejidos en desarrollo y semillas a través del transporte por floema (Zheng y col., 2012).

4.4. REGULACIÓN DE LA HOMEOSTASIS DEL COBRE

En la homeostasis de metales están implicados la regulación en la toma y translocación, secuestro en compartimentos intracelulares, unión a proteínas u otras moléculas (Chaffai y Koyama, 2011) y uso alternativo de enzimas que contienen Cu o Fe para catalizar la misma reacción (Puig y col., 2007a).

Numerosos estudios parecen indicar que las homeostasis del Cu y del Fe se encuentran relacionadas mediante un mecanismo aun poco conocido. Se ha visto que en condiciones de bajo Fe, las plantas de *A. thaliana* acumulan Cu debido probablemente a un

requerimiento adicional de Cu para proveer de su cofactor a enzimas como podrían ser la Cu/ZnSOD (Waters y Armbrust, 2013). También se ha visto que la deficiencia de Cu promueve la acumulación de Fe mediante el incremento de la toma de Fe. Esto podría producirse ya que la deficiencia de Cu o Fe afecta a la homeostasis total de metales. La deficiencia de Cu estimula la expresión de *FRO2*, y promueve la adquisición de Fe por una ruta que probablemente no sea la ruta primaria (Waters y col., 2014). Se ha visto que la deficiencia de Cu produce una disminución del transporte de Fe desde las raíces hacia las partes aéreas de la planta, lo que puede deberse a la existencia de transportadores implicados en la homeostasis de Fe dependientes de la actividad de proteínas MCO (multicobre oxidasas) (Bernal y col., 2012).

4.4.1. SPL7

En la homeostasis del Cu en plantas está implicado el factor de transcripción SPL7 (*Squamosa Promoter Binding Protein-Like 7*), que forma parte de una familia SPL, con 17 miembros en *A. thaliana* y 11 en arroz, implicados en diversos procesos biológicos (Chen y col., 2010). SPL7 constituye el regulador central de la respuesta a la deficiencia de Cu. En condiciones de bajo Cu, el factor de transcripción SPL7 se encuentra activo y está implicado en la regulación de la respuesta de homeostasis del Cu (Yamasaki y col., 2009). SPL7 se localiza en el núcleo (García-Molina y col., 2014) y muestra una alta expresión en las raíces, aunque la expresión puede detectarse en toda la planta (Pilon y col., 2009).

El factor de transcripción SPL7 activa la transcripción de sus genes diana a través de la interacción con los motivos GTAC en sus promotores en condiciones de deficiencia de Cu (Kropat y col., 2005; Nagae y col., 2008; Yamasaki y col., 2009). Algunas de las dianas de SPL7 son genes cuyos productos están implicados en la reducción del Cu^{2+} para su posterior asimilación (*FRO4* y *FRO5*), en el transporte del Cu (*COPT1*, *COPT2*, *COPT5* y parcialmente *COPT6*) y la eliminación de ROS dependiente del cofactor Fe en lugar de Cu (FeSOD) (Yamasaki y col., 2009; Bernal y col., 2012; Jung y col., 2012; Perea-García y col., 2013; Hanikenne y col., 2014).

SPL7 también es capaz de interactuar físicamente con KIN17 (*Immunological Kinship to RecA protein clone 17*), con localización y expresión que se solapa parcialmente con SPL7. KIN17 interactúa con SPL7 para afinar la respuesta en deficiencia de Cu. El doble mutante *kin17-1spl7-2* tienen un fenotipo más exacerbado que los mutantes simples, y parece que una acción sincronizada de KIN17 y SPL7 puede ser necesaria para alcanzar el adecuado crecimiento y desarrollo bajo condiciones de deficiencia de Cu (García-Molina y

col., 2014). Otros factores de transcripción como HY5 (*Long Hypocotil 5*) también podrían actuar en combinación con SPL7 para regular los genes diana produciendo una respuesta integrada (Zhang y col., 2014).

4.4.2. Micro ARNs de cobre

Otras dianas de SPL7 son los micro ARNs de Cu (Yamasaki y col., 2007). Los micro ARNs son ARNs endógenos no codificantes de 21-24 nt que contribuyen a la regulación postranscripcional de sus dianas complementarias. Se han encontrado micro ARNs con un papel clave en la homeostasis de Cu (micro ARNs de Cu), así como de otros elementos como el P, el S o el Cd (Ding y Zhu, 2009; Zhu y col., 2011; Mendoza-Soto y col., 2012; Kehr, 2013).

Los micro ARNs de Cu también tienen motivos GATC en sus promotores (Lu y col., 2011). Estos micro ARNs regulan la expresión de proteínas de Cu que se consideran no esenciales que se acumulan solamente si el aporte de Cu es suficiente para cubrir las demandas de las cuproproteínas imprescindibles (Yamasaki y col., 2007; Abdel-Ghany y Pilon, 2008). Los micro ARNs de Cu aumentan en condiciones limitantes de Cu y desaparecen en suficiencia de Cu, mostrando una correlación inversa entre sus niveles y los niveles de ARNm de sus dianas (Abdel-Ghany y Pilon, 2008) (Tabla 1).

Se conocen varias familias de micro ARNs que regulan las proteínas de Cu no esenciales (Ravet y Pilon, 2013). La familia *miR398* está formada por tres genes: *miR398a*, *miR398b* y *miR398c*. La secuencia madura de *miR398b* es igual a la de *miR398c*, mientras que el extremo 3' de *miR398a* es diferente (Jones-Rhoades y Bartel, 2004; Sunkar y Zhu, 2004). Entre las dianas conocidas de *miR398* se encuentran los transcritos de *CSD1* y *CSD2* (Bonnet y col., 2004; Jones-Rhoades y Bartel, 2004; Sunkar y col., 2006; Yamasaki y col., 2007). De esta forma se reemplaza la actividad SOD dependiente de Cu por Fe, mediante la disminución de la Cu/ZnSOD y el aumento de FeSOD (Abdel-Ghany y Pilon, 2008). Otras dianas de *miR398* son los ARNm de una de las dos isoformas de *COX5b* (subunidad 5b de la COX mitocondrial) (Sunkar y Zhu, 2004; Yamasaki y col., 2007) y la chaperona *AtCCS* (Cohu y col., 2009; Beauclair y col., 2010). *CCS* tiene diferentes formas de procesamiento alternativo, pero todas contienen la diana de *miR398*, por lo que *miR398* puede actuar en todas ellas. El sitio diana de *miR398* está muy conservado en plantas. También se ha visto que AGO10 (*Argonaute 10*) está implicada en la regulación postranscripcional dirigida por *miR398* (Beauclair y col., 2010).

Tabla 1. Micro ARNs de Cu con sus genes diana y referencias bibliográficas.

Micro ARN	Diana	Referencias
<i>miR397</i>	<i>LAC2, LAC4, LAC17</i>	(Jones-Rhoades y Bartel, 2004; Sunkar y Zhu, 2004; Abdel-Ghany y Pilon, 2008)
<i>miR398</i>	<i>CSD1, CSD2, CCS, COX5b-1, NOD19</i>	(Bonnet y col., 2004; Jones-Rhoades y Bartel, 2004; Sunkar y Zhu, 2004; Yamasaki y col., 2007; Cohu y col., 2009; Beauclair y col., 2010; Naya y col., 2014)
<i>miR408</i>	<i>LAC3, LAC12, LAC13, Plantacianina</i>	(Sunkar y Zhu, 2004; Abdel-Ghany y Pilon, 2008; Maunoury y Vaucheret, 2011)
<i>miR857</i>	<i>LAC7</i>	(Abdel-Ghany y Pilon, 2008)
<i>miR1444</i>	<i>PPO</i>	(Lu y col., 2011)

En *Phaseolus (P.) vulgaris*, también se ha encontrado el *miR398*, cuyas dianas incluyen a *NOD19 (Nodulin 19)*. *NOD19* podría estar implicada en la respuesta a estrés oxidativo (Naya y col., 2014). Los genomas de arroz, chopo, lotus y medicago también codifican para micro ARNs homólogos de *miR398*, lo que sugiere un mecanismo conservado de adaptación a la deficiencia de Cu en plantas superiores (Sunkar y Zhu, 2004; Yamasaki y col., 2008).

La familia *miR397* está constituida por dos genes (*miR397a* y *miR397b*) cuyas dianas son las lacasas *LAC2, LAC4* y *LAC17* (Jones-Rhoades y Bartel, 2004; Sunkar y Zhu, 2004; Abdel-Ghany y Pilon, 2008). La expresión de *miR397* se detecta en el meristemo apical, tallo, semillas y plántulas. En comparación, la expresión de *miR397b* es mucho mayor que la de *miR397a* (Wang y col., 2014).

El micro ARN *miR408* está codificado por un solo gen (Sunkar y Zhu, 2004) y tiene como dianas las lacasas *LAC3, LAC12* y *LAC13* (Abdel-Ghany y Pilon, 2008) y la plantacianina (Sunkar y Zhu, 2004; Abdel-Ghany y Pilon, 2008; Maunoury y Vaucheret, 2011). A su vez, las proteínas AGO1 y AGO2 tienen un papel redundante en la regulación del nivel de mRNA de la plantacianina a través de su asociación con el *miR408* (Maunoury y Vaucheret, 2011).

El *miR857* procede de un solo gen y su diana es el ARNm de *LAC7* (Abdel-Ghany y Pilon, 2008).

El *miR444* tiene como diana la *PPO* cloroplástica. También existen otras lacasas (*LAC8*, *LAC11* y *LAC15*) que no se conoce si están reguladas por micro ARNs, pero que también muestran una regulación por Cu (Abdel-Ghany y Pilon, 2008).

En *P. trichocarpa* se encuentra el *miR1444* específico, además de los *miR397*, *miR398* y *miR408* (conservados) (Lu y col., 2011). *miR1444* tiene como dianas todas las *PPO* plastidiales (Ravet y col., 2011).

4.4.3. Otros aspectos de la regulación por Cu

Los glúcidos, como la sacarosa, también están implicados en la homeostasis del Cu. La sacarosa es capaz de regular la acumulación de Cu a través de vías dependientes e independientes de *SPL7*. En condiciones de alta sacarosa, aumentan los *miR398* y *miR408* de una forma dependiente de la dosis. En alta sacarosa disminuye la expresión de *CSD1*, *CSD2*, *CCS* y *PC*, y aumenta *PAA1*, *CCH*, *COX17* y *ZIP2*, posiblemente para aumentar la redistribución del Cu. En alta sacarosa la acumulación de Cu se ve inhibida, esto puede deberse a la reducción de la expresión de proteínas que contienen Cu (Ren y Tang, 2012).

Existen otros genes que también son regulados por Cu, pero de manera independiente de *SPL7*, como son *HMA5* y *FRO6* (Pilon y col., 2009). La proteína *AtPAA2* está regulada por Cu, independientemente de *SPL7* (Tapken y col., 2012) a través del sistema de proteasas Clp (Tapken y col., 2015). También se ha visto que múltiples isoformas de *PPO* son reguladas por Cu (Ravet y col., 2011). Se ha descrito que una de las dos isoformas de la *PC* (*AtPC1*) no está regulada por Cu, mientras que *AtPC2*, la isoforma más abundante, se acumula en respuesta a la adición de Cu al medio de cultivo (Abdel-Ghany, 2009). Sin embargo, se ha visto que la *PC* no está regulada transcripcionalmente por Cu (Abdel-Ghany y Pilon, 2008). En cambio, otras proteínas involucradas en la homeostasis del Cu no están reguladas por Cu, como *AtPAA1* (Tapken y col., 2012), *AtATX1* (Pilon y col., 2009) o *AtCOPT5* (García-Molina y col., 2011).

Por otra parte, el Cu podría estar implicado en la regulación del ciclo circadiano. Las plantas con un incremento del Cu endógeno debido a la sobreexpresión de los transportadores *COPT1* y *COPT3*, muestran fenotipo de plantas con ciclo circadiano alterado, disminución en la expresión de los genes *LHY* (*Late Elongated Hypocotil*) y *CCA1* (*Circadian Clock-Associated1*), componentes centrales del reloj interno, por lo que podrían tener alteraciones en el ciclo circadiano celular (Andrés-Colás y col., 2010; Perea-García y col., 2010).

4.4.4. Implicaciones de la homeostasis del cobre

Las plantas necesitan mecanismos de regulación de la toma de Cu y su distribución, ya que la disponibilidad del Cu en el medio varía, y las necesidades de la planta dependen de su estado de desarrollo y condiciones. Por una parte, la regulación de los transportadores de Cu sugiere un mecanismo de regulación de la carga y exportación del Cu en la raíz (Burkhead y col., 2009).

Por otra parte, la mayoría de las proteínas de Cu son abundantes bajo condiciones no limitantes de Cu, pero sus actividades parecen ser dispensables. Estas proteínas de Cu podrían servir para tamponar el exceso de Cu (Ravet y Pilon, 2013). Algunas algas rojas, muchas cianobacterias y algas verdes como *C. reinhardtii* cuentan con el citocromo c_6 (Ho y Krogmann, 1984) que se expresa bajo deficiencia de Cu y funcionalmente reemplaza a la PC, mientras que ésta es activamente degradada (Wood, 1978; Merchant y Bogorad, 1986; Li y Merchant, 1995) probablemente por la proteína RSEP1 (*Regulator for Sigma-E Protease 1*) (Kropat y col., 2015). El citocromo c_6 tiene similitudes estructurales con la PC a nivel superficial, con áreas de interacción equivalentes, lo que podría explicar su intercambio funcional (Diaz-Quintana y col., 2003). Sin embargo, no hay evidencia de esta compensación por un citocromo c_6 homólogo en plantas superiores (Molina-Heredia y col., 2003). En lugar de eso, las plantas priorizan la distribución de Cu hacia la PC sobre el resto de proteínas dispensables y reemplazan las proteínas de Cu por sus equivalentes proteínas dependientes de Fe (Cohu y Pilon, 2007; Abdel-Ghany y Pilon, 2008; Ravet y col., 2011), como es el caso de la Cu/ZnSOD y FeSOD (Abdel-Ghany y Pilon, 2008).

5. SITUACIÓN ACTUAL Y PERSPECTIVAS

La homeostasis de metales en las plantas se ha convertido en un punto clave de estudio debido a las necesidades mundiales de producción de energía y alimento de forma sostenible y acorde con el medio ambiente (Palmer y Guerinot, 2009). Las plantas son la principal entrada de micronutrientes en la cadena trófica, por lo que el estudio de los mecanismos de regulación de la toma y distribución del Cu son relevantes para evitar niveles inadecuados de Cu en las plantas de interés agroalimentario (Peñarrubia y col., 2010). A pesar de los recientes avances en el conocimiento de la homeostasis en plantas, todavía quedan muchas cuestiones por resolver. Las plantas han superado muchos de los desafíos de la homeostasis de metales, desde la toma al transporte y localización. Sin embargo, el transporte entre los tejidos y localización subcelular todavía cuentan con muchos puntos desconocidos hasta el momento. Dada la importancia de los metales para la supervivencia y óptimo

desarrollo de las plantas, y dada la importancia de las plantas en la nutrición y energía, es esencial continuar la investigación de estas cuestiones de la homeostasis de metales.

Quedan muchos aspectos pendientes sobre componentes principales de la homeostasis del Cu como son las chaperonas y las ATPasas de tipo P_{1B}, en relación con el amplio rango de funciones que llevan a cabo en plantas, su regulación y potencial para la explotación biotecnológica. Por otra parte, las leguminosas (*Fabaceae*) constituyen una importante familia utilizada en la agricultura sostenible, ya que son capaces de formar simbiosis para la fijación de nitrógeno (Barceló y col., 2001), en la que está implicada el Cu (González-Guerrero y col., 2014) y, en especial, la soja es uno de los cultivos agrícolas principales en el mundo con multitud de usos (Hartman y col., 2011). Además, esta especie tiene un alto potencial en la extracción de metales del suelo (Murakami y Ae, 2009).

OBJETIVOS

OBJETIVOS

- Estudio de los genes y proteínas PAA2.
 - Caracterización funcional de las proteínas de soja *GmPAA2-1/HMA8-1* y *GmPAA2-2/HMA8-2*.
 - Localización de las proteínas *GmPAA2-1/HMA8-1* y *GmPAA2-2/HMA8-2*.
 - Análisis y regulación transcripcional y postranscripcional de *GmPAA2-1/HMA8-1* y *GmPAA2-2/HMA8-2* de soja.
- Estudio de la chaperona *GmCCS*
 - Clonación, sobreexpresión y purificación de la proteína *GmCCS* de soja.
 - Identificación del número de sitios de unión a Cu de la proteína *GmCCS* y características de la interacción ligando-proteína.
 - Estudio del estado oligomérico de la proteína *GmCCS*.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES Y MÉTODOS

1. MATERIAL BIOLÓGICO

1.1. MANIPULACIÓN DE BACTERIAS

1.1.1. Cepas de *Escherichia (E.) coli* utilizadas y condiciones de cultivo

Se han utilizado diferentes cepas de *E. coli* dependiendo de la finalidad del estudio. Las células DH5 α (F⁻ ϕ 80*lacZ* Δ M15 Δ (*lacZYA-argF*) U169 *recA1 endA1 hsdR17* (*r_k*⁻, *m_k*⁺) *phoA kE44 λ - thi-1 gyrA96 relA1*) y One Shot TOP10 (F⁻ *mcrA* Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) ϕ 80*lacZ* Δ M15 Δ *lacX74 recA1 araD139 Δ (ara-leu)7697 galU galK rpsL* (Str^R) *endA1 nupG*) (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, EEUU) se utilizaron para la clonación de productos amplificados por PCR. Las células DB3.1 (F⁻ *gyrA462 endA1 glnV44 Δ (sr1-recA) mcrB mrr hsdS20*(*r_B*⁻, *m_B*⁻) *ara14 galK2 lacY1 proA2 rpsL20*(*Smr*) *xyf5 Δ leu mtl1*) se utilizaron para la propagación de vectores con el gen letal *CcdB* (*Control of Cell Death*). Las células LMG194 (F⁻ Δ *lacX74 galE thi rpsL Δ phoA* (Pvu II) Δ *ara714 leu::Tn10*) (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, EEUU) se utilizaron para la sobreexpresión de proteínas.

Las bacterias se cultivaron en medio LB (*Lysogenic Broth*) (Bertani, 1951) líquido o sólido. Los cultivos se mantuvieron a 37 °C durante toda la noche (con agitación a 200 rpm en un agitador Rotabit -J. P Selecta, Barcelona, España- en el caso de los cultivos líquidos). Los medios para la selección de bacterias transformantes se suplementaron con 50 μ g ml⁻¹ ampicilina (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EEUU) o 50 μ g ml⁻¹ kanamicina (Duchefa, Haarlem, Holanda).

Medios de cultivo:

Medio LB líquido: 1% (p/v) triptona; 0,5% (p/v) extracto de levadura; 1% (p/v) NaCl; pH 7,2.

Medio LB sólido: 1% (p/v) triptona; 0,5% (p/v) extracto de levadura; 1% (p/v) NaCl; 1,5% (p/v) agar bacteriológico (Conda, Madrid, España); pH 7,2.

1.1.2. Preparación de *E. coli* quimiocompetentes

Se sembró una placa de LB sólido con la cepa de *E. coli* requerida y se cultivó a 37 °C durante toda la noche. Se inoculó un cultivo previo de 2 ml de medio LB con una colonia individual y se cultivó durante toda la noche a 37 °C con agitación. Se utilizaron 500 μ l de este cultivo previo para inocular 50 ml de LB y se cultivó a 37 °C con agitación hasta que la

absorbancia a 600 nm alcanzó un valor de 0,6 en cubetas de 1 cm de paso de luz. A continuación, las células se recogieron por centrifugación en tubos falcon fríos a 3000 x g durante 10 min a 4 °C y se resuspendieron cuidadosamente en 15 ml de tampón de transformación I frío. Se centrifugaron a 3000 x g durante 10 min a 4 °C y el sedimento se resuspendió cuidadosamente en 2 ml de tampón de transformación II frío. Se dividió en alícuotas de 100 µl, que se congelaron con nitrógeno líquido y se mantuvieron a -80 °C hasta su utilización.

Tampones:

Tampón de transformación I: 30 mM acetato potásico, pH 5,8; 50 mM MnCl₂; 100 mM RbCl₂; 15% (p/v) glicerol.

Tampón de transformación II: 10 mM MOPS, pH 7,0; 75 mM CaCl₂; 10 mM RbCl₂; 15% (p/v) glicerol.

1.1.3. Transformación de *E. coli* quimiocompetentes

Se descongelaron las células competentes en hielo, se añadieron 1-2 µl de ADN plasmídico 0,1-0,5 µg µl⁻¹ (ver apartado 2.1.2) y se mantuvieron 5 min a 4 °C. A continuación, se incubaron a 42 °C durante 30 s en un baño húmedo y unos 5 min en hielo. Se añadieron 600 µl de LB líquido a las células y se cultivaron a 37 °C durante 1 h. Se centrifugaron a 2800 x g durante 5 min, el sedimento se resuspendió en unos 200 µl de medio LB y se sembró en una placa de LB sólido con el antibiótico correspondiente (ampicilina o kanamicina 50 µg ml⁻¹) para la selección de las bacterias transformantes.

1.1.4. Cepas de *Agrobacterium (A.) tumefaciens* utilizadas y condiciones de cultivo

La cepa de *A. tumefaciens* utilizada fue GV3101 (resistente a rifampicina) con el plásmido de ayuda pMP90 (resistente a gentamicina). Las células se cultivaron en medio LB líquido o sólido con 25 µg ml⁻¹ gentamicina (Duchefa, Haarlem, Holanda) y 100 µg ml⁻¹ rifampicina (Duchefa, Haarlem, Holanda) o con 25 µg ml⁻¹ gentamicina y 50 µg ml⁻¹ kanamicina para la selección de transformantes. Se cultivaron a 28 °C con agitación (en el caso de cultivos en medio líquido) durante dos días.

1.1.5. Preparación de *A. tumefaciens* electrocompetentes

Se sembró una placa de LB sólido suplementado con 25 $\mu\text{g ml}^{-1}$ gentamicina y 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ rifampicina con *A. tumefaciens* y se cultivó a 28 °C durante dos días. Se utilizó una colonia individual para inocular un cultivo de 5 ml de LB/gentamicina/rifampicina y se cultivó durante dos días. Se utilizó el cultivo previo para inocular 100 ml de LB y se cultivó hasta que la absorbancia a 600 nm alcanzó 0,5 en cubetas de 1 cm de paso de luz. Las bacterias se recogieron por centrifugación a 3500 x g durante 15 min a 4 °C en tubos falcon fríos, y se resuspendieron en tampón de lavado I. Se centrifugaron a 3500 x g durante 15 min a 4 °C y el sedimento se resuspendió en tampón de lavado II. Se centrifugaron a 3500 x g durante 15 min a 4 °C y se resuspendieron en 400 μl de tampón de lavado II. Se dividió el volumen en alícuotas de 50 μl , que se congelaron en nitrógeno líquido y se guardaron a -80 °C hasta su uso.

Tampones:

Tampón de lavado I: 1 mM HEPES, pH 7,5.

Tampón de lavado II: 1 mM HEPES, pH 7,5; 10% (p/v) glicerol.

1.1.6. Transformación de *A. tumefaciens* electrocompetentes

Se descongelaron las células electrocompetentes de *A. tumefaciens* en hielo y se les añadió 1 μl de ADN plasmídico diluido 1/10-1/20, a una concentración de aproximadamente 50 $\text{ng } \mu\text{l}^{-1}$. Se transfirieron a una cubeta de electroporación esterilizada previamente con 70% (v/v) etanol. La electroporación se realizó durante 5-10 ms con los siguientes ajustes: voltaje 1,8 kV, resistencia 400 Ω y capacitancia 25 μF . Se añadió 1 ml de medio LB frío a las bacterias y se cultivaron a 28 °C durante 1 h con agitación suave. Las células se recogieron por centrifugación a 2800 x g durante 5 min, se sembraron en placas con LB sólido con 25 $\mu\text{g ml}^{-1}$ gentamicina y 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$ kanamicina para la selección de transformantes, y se cultivaron a 28 °C durante dos días.

1.1.7. Conservación de cepas bacterianas a largo plazo

Se cultivaron las cepas bacterianas en 5 ml de LB (con antibióticos si éstos eran necesarios) durante toda la noche. Se mezclaron por inversión 800 μl del cultivo previo con 200 μl de glicerol estéril, se congelaron en nitrógeno líquido y se guardaron a -80 °C para su almacenamiento a largo plazo.

1.2. MANIPULACIÓN DE LEVADURAS

1.2.1. Cepas de *Saccharomyces (S.) cerevisiae* utilizadas y condiciones de cultivo

Las cepas de *S. cerevisiae* utilizadas fueron *ccc2* (BY4749; *MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 YDR270w::kanMX4*) y su correspondiente cepa silvestre, BY4741 (*MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0*) (EUROSCARF, Frankfurt, Alemania).

Las levaduras fueron cultivadas en medio completo YPD (*Yeast Extract Peptone Dextrose*) o medio mínimo completo SD (*Synthetic Defined*) sin histidina o sin uracilo, líquido o sólido. Las levaduras se cultivaron a 30 °C durante 1-2 días con agitación a aproximadamente 200 rpm en el caso de los cultivos líquidos.

Medios de cultivo:

YPD líquido: 1% (p/v) extracto de levadura; 2% (p/v) peptona bacteriológica; 2% (p/v) glucosa.

YPD sólido: 1% (p/v) extracto de levadura; 2% (p/v) peptona bacteriológica; 2% (p/v) glucosa; 2% (p/v) agar bacteriológico.

SD-His/SD-Ura líquido: 0,67% (p/v) YNB (*Yeast Nitrogen Base*); 0,077% (p/v) CSM-His/CSM-Ura (*Complete Supplement Mixture -Histidin/-Uracil*).

SD-His/SD-Ura sólido: 0,67% (p/v) YNB; 0,077% (p/v) CSM-His/CSM-Ura; 2% (p/v) agar bacteriológico.

1.2.2. Preparación de *S. cerevisiae* competentes

Se sembró una placa de YPD sólido con *S. cerevisiae* y se cultivó durante 2 días a 30 °C. Se inoculó un cultivo previo de 5 ml de YPD líquido con una colonia individual y se cultivó durante toda la noche a 30 °C con agitación. Se utilizó este cultivo previo para inocular 100 ml de medio YPD y se cultivó hasta que la absorbancia a 600 nm alcanzó 0,6 en cubetas de 1 cm de paso de luz. Se centrifugó a 2000 x g durante 10 min a 4 °C y las células se resuspendieron cuidadosamente en 20 ml de tampón de transformación I frío. Las células se centrifugaron a 2000 x g durante 10 min a 4 °C y se resuspendieron en 2 ml de tampón de transformación I. Se dividió en alícuotas de 200 µl y se guardaron a -80 °C.

Tampones:

Tampón de transformación I: 10 mM bicina-KOH, pH 8,35; 1 M sorbitol; 3% (v/v) etilenglicol.

1.2.3. Transformación de *S. cerevisiae* competentes

Se añadieron a las células de *S. cerevisiae* competentes 1-2 µg de plásmido y 50 µg de ADN de esperma de salmón desnaturalizado y se incubaron a 37 °C durante 5 min en un baño húmedo. Se añadió 1 ml de tampón de transformación II y se cultivaron durante 1 h a 30 °C con agitación suave. Se centrifugaron a 2000 x g durante 2 min y el sedimento se lavó dos veces con 800 µl de tampón de transformación III. Se centrifugaron a 2000 x g durante 2 min y las levaduras se sembraron en placas de medio SD-His o SD-Ura para la selección de levaduras transformantes.

Tampones:

Tampón de transformación II: 200 mM bicina-KOH, pH 8,35; 40% (p/v) polietilenglicol 1000.

Tampón de transformación III: 10 mM bicina-KOH, pH 8,35; 150 mM NaCl.

1.2.4. Análisis fenotípicos en *S. cerevisiae*

Este método se utilizó con dos objetivos diferentes: 1) Complementación funcional de levaduras *ccc2*. La cepa *ccc2* se transformó con el vector vacío pFL61 Gateway (Minet y col., 1992) y las construcciones derivadas del mismo que contienen las regiones codificantes (CDS, *Coding DNA Sequence*) de los genes *GmPAA2-1*, *GmPAA2-1T* y *GmPAA2-2* (apartado 2.6.3). La correspondiente cepa silvestre se transformó con el vector vacío pFL61. Se cultivaron tres colonias independientes de cada transformación en medio SD-Ura líquido hasta una absorbancia a 600 nm de 0,3 en cubetas de 1 cm de paso de luz. Se realizaron 5 diluciones seriadas, correspondientes con aproximadamente 10^7 - 10^3 células ml⁻¹, se cultivaron en placas SD-Ura sin suplementar o suplementado con 20 µM BCS (batocuproína disulfonato) (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EEUU) y 20 µM BPS (batofenantrolina disulfonato, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EEUU) durante 2 días a 30 °C y se fotografiaron.

El segundo objetivo fue: 2) el estudio funcional de *GmPAA2-1*, *GmPAA2-1T* y *GmPAA2-2* en levaduras silvestres. Para ello, las levaduras silvestres BY4741 se transformaron con el vector vacío pFL61 y las construcciones con *GmPAA2-1*, *GmPAA2-1T* y

GmPAA2-2. Se realizaron diluciones como se detalla anteriormente y las levaduras se cultivaron en placas con medio SD-Ura y SD-Ura con diferentes concentraciones de CuSO_4 (0,6 mM, 0,8 mM, 1 mM, 1,2 mM y 2 mM) durante dos días.

1.3. MANIPULACIÓN DE PLANTAS

1.3.1. Cultivo de *Arabidopsis (A.) thaliana*

Se han utilizado plantas de *A. thaliana* (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.) (Holl y Heynhold, 1842) silvestres ecotipo Columbia (Col-0 y Col-3) y Landsberg *erecta* (Ler), así como los mutantes *paa1-1* (Shikanai y col., 2003) y *paa2-1* (Abdel-Ghany y col., 2005b), que fueron amablemente proporcionados por la Dra. Wiebke Tapken (Laboratorio del Dr. Marinus Pilon, Biology Department, Colorado State University, Fort Collins, CO, EEUU), y el mutante *sp17-2* (Bernal y col., 2012).

Las semillas de *A. thaliana* fueron esterilizadas con una solución de 70% (v/v) etanol durante 1 min, seguido de un lavado con agua destilada estéril, una incubación de 10 min con solución de esterilización y 4 lavados con agua destilada estéril.

A continuación, las semillas se sembraron con ayuda de una micropipeta en placas de Petri con medio sólido $\frac{1}{2}$ MS (Murashige y Skoog, 1962) suplementado con 1% (p/v) sacarosa. Las placas fueron estratificadas durante 3 días a 4 °C en oscuridad. Seguidamente, éstas fueron transferidas a cámaras de cultivo de plantas con condiciones controladas de temperatura (22/18 °C día/noche), humedad relativa (70%), intensidad de luz (100-120 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) y con un fotoperiodo de 16/8 h (luz/oscuridad, día largo) o 13/11 h (día corto) durante 14 días. Posteriormente las plantas fueron transferidas a macetas con 3:1 (v/v) turba:vermiculita hasta su cosecha.

En algunos casos, las semillas se sembraron directamente en turba:vermiculita y se cultivaron en las mismas condiciones descritas anteriormente. Las plantas fueron regadas 2-3 veces por semana.

Las semillas se recogieron en bolsas de papel y se almacenaron en tubos de 1,5 ml a temperatura ambiente hasta su utilización.

Medios y soluciones utilizadas:

Solución de esterilización: 10% (p/v) NaClO ; 0,05% (p/v) Tween-20.

Medio sólido ½ MS con 1% (p/v) sacarosa: 0,22% (p/v) medio basal Murashige y Skoog (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EEUU); 3 mM MES, pH 5,8; 1% (p/v) sacarosa.

1.3.2. Tratamientos de *A. thaliana*

Las plantas de *A. thaliana* ecotipo Ler y *paa1-1*, para el ensayo de complementación de *paa1-1* con *GmPAA2-1* y *GmPAA2-2*, se cultivaron en placas de plástico con medio ½ MS con 1% (p/v) sacarosa, 0,8% (p/v) agar tipo M con o sin 10 µM CuSO₄ añadido al medio durante 14 días en posición horizontal. Este experimento se realizó paralelamente con plantas sembradas directamente en tierra y cultivadas durante 5 semanas, que fueron regadas con agua corriente sin suplementar o suplementada con 1 mM CuSO₄.

Las plantas de *A. thaliana* ecotipo Col-0, Col-3, *paa2-1* y *sp17-2*, utilizadas para el ensayo de complementación de *paa2-1* con *GmPAA2-1* y *GmPAA2-2*, se cultivaron en diferentes medios en placas de Petri de cristal y de plástico. Las placas de cristal se lavaron durante toda la noche con 0,2 N HCl para eliminar los metales adsorbidos a la superficie, posteriormente se lavaron 3 veces con agua ultrapura y se esterilizaron en autoclave. Se utilizó 1% (p/v) agar tipo M (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EEUU) para este experimento, el cual se lavó 3 veces con 10 mM EDTA, pH 5,7 durante toda la noche, una vez con agua ultrapura durante toda la noche y 5 veces con agua ultrapura durante una hora. Posteriormente se filtró, pesó y dividió en dos. El medio utilizado fue solución Hoagland (Hoagland y Arnon, 1950) modificada I, con 0,5 µM CuSO₄ añadido al medio o sin Cu añadido. Las plantas se cultivaron durante 14 días en posición vertical. En el caso de las placas de plástico, se utilizó medio ½ MS suplementado con 0,1% (p/v) sacarosa y con 0,8% (p/v) agar tipo M. Las plantas se cultivaron durante 14 días en posición vertical.

Las plantas de ecotipo Col-0 utilizadas para el ensayo de actividad del promotor de *AtPAA2* se cultivaron en dos condiciones nutricionales de Cu diferentes: 1) medio ½ MS con 1% (p/v) sacarosa y 0,8% (p/v) agar tipo M; 2) medio ½ MS con 1% (p/v) sacarosa con 10 µM CuSO₄ y 0,8% (p/v) agar tipo M, en posición vertical durante 13 días. Estas plantas también fueron cultivadas en medio ½ MS con 1% (p/v) sacarosa y 0,8% (p/v) agar tipo M en dos condiciones de iluminación diferentes: 1) alta luz (320 µE m⁻² s⁻¹); 2) baja luz (60 µE m⁻² s⁻¹) durante 13 días.

Medios de cultivo:

Solución Hoagland modificada I (Hoagland I): 1,5 mM Ca(NO₃)₂; 0,28 mM KH₂PO₄; 0,75 mM MgSO₄; 1,25 mM KNO₃; 1 μM ZnSO₄; 5 μM MnSO₄; 25 μM H₃BO₃; 0,1 μM Na₂MoO₄; 50 μM KCl; 3 mM MES-KOH, pH 5,7; 5 μM Fe-HBED.

1.3.3. Transformación estable de *A. thaliana* y selección de plantas homocigotas

Las plantas de *A. thaliana* Col-0, Col-3, Ler, *paa1-1* y *paa2-1* se transformaron con las construcciones siguiendo el protocolo descrito (Clough y Bent, 1998) con modificaciones. Se cultivaron las plantas en tierra (apartado 1.3.1), cuando el tallo floral alcanzó una altura de aproximadamente 1 cm, éste se cortó a ras de la roseta. Se sembraron las células de *A. tumefaciens* transformadas (apartado 1.1.6) en placas de LB sólido con 25 μg ml⁻¹ gentamicina y 50 μg ml⁻¹ kanamicina y se cultivaron a 28 °C durante dos días. A continuación se utilizaron estas placas para inocular 5 ml de medio líquido LB/gentamicina/kanamicina y se cultivaron a 28 °C con agitación durante toda la noche. Este cultivo previo se utilizó para inocular cultivos de 50 ml de LB, que se incubaron durante toda la noche a 28 °C con agitación. Se midió la absorbancia a 600 nm de los cultivos, se centrifugaron a 4300 x g durante 10 min y se diluyeron en 50 ml de solución de transformación a una absorbancia a 600 nm de 0,8 en cubetas de 1 cm de paso de luz. A continuación se procedió a la transformación de las plantas de *A. thaliana* cuyos tallos florales habían sido cortados hacía 4 días. Para ello, la solución de *A. tumefaciens* se extendió con un pincel, previamente esterilizado con 70% (v/v) etanol, por toda la planta, especialmente por las flores, capullos, tallos y meristemas. Las plantas se cubrieron con plástico transparente durante 3 días y se recogieron las semillas cuando éstas maduraron (semillas T1).

Para la selección de las plantas transgénicas, alrededor de 1000 semillas T1 (0,02 g) de cada transformación fueron sembradas en placas con medio ½ MS con 1% (p/v) sacarosa y el marcador de selección correspondiente: 25 μg ml⁻¹ glufosinato de amonio (Duchefa, Haarlem, Holanda) para las construcciones del vector pEarleyGate101 (Earley y col., 2006), o 20 μg ml⁻¹ higromicina B (Duchefa, Haarlem, Holanda), para las construcciones en los vectores pMDC32 y pMDC163 (Curtis y Grossniklaus, 2003) (apartado 2.6.3). Las plántulas resistentes al herbicida se transfirieron a macetas y se recogieron las semillas (semillas T2). Se sembraron 100 semillas T2 de forma ordenada en medio ½ MS con 1% (p/v) sacarosa y herbicida. Se transfirieron a maceta 12 plantas de las líneas que mostraran un porcentaje de germinación del 75%, correspondiente con una segregación 3:1, y se cultivaron hasta la

recogida de las semillas (T3). Se sembraron 100 semillas T3 y se escogieron las líneas con un 100% de germinación, correspondientes con líneas homocigotas con una inserción del transgén.

Soluciones:

Solución de transformación: 5% (p/v) sacarosa; 0,05% (v/v) Silwett L-77 (Lehle Seeds, Round Rock, TX, EEUU).

1.3.4. Aislamiento y transformación transitoria de protoplastos de *A. thaliana*

Los protoplastos del mesófilo de *A. thaliana* se aislaron utilizando el protocolo descrito (Yoo y col., 2007) con modificaciones (Reuscher, 2012). Se seleccionaron hojas de *A. thaliana* Col-0 de 3-4 semanas, completamente expandidas y sin signos de senescencia para obtener una población de protoplastos homogénea. Las hojas fueron cortadas con un bisturí en tiras de 0,5-1 mm desde el nervio central, descartando la punta de la hoja y el peciolo. Las hojas se sumergieron en 30 ml de solución enzimática en una placa de Petri. Las hojas se infiltraron en vacío a 100 mbar durante 1 min y el vacío fue liberado de manera suave. Las hojas se incubaron en oscuridad a temperatura ambiente durante 3 h. Posteriormente, los protoplastos se liberaron mediante agitación suave. Se añadió CaNO_3 lentamente hasta una concentración final de 50 mM. La suspensión de protoplastos se filtró a través de una malla de nilón de 41 μm (Merck Millipore, Darmstadt, Alemania) para eliminar el material vegetal no digerido. Los protoplastos se mantuvieron en hielo y se manipularon con cuidado en todo momento.

Se centrifugaron a 300 x g en un rotor basculante durante 5 min a temperatura ambiente, se eliminó el sobrenadante y los protoplastos se resuspendieron en 2 ml de solución WI. Se centrifugaron a 300 x g durante 5 min, se eliminó el sobrenadante y el sedimento fue colocado en un tubo de 15 ml sobre un colchón de 5 ml de 21% (p/v) sacarosa. Se centrifugó a 300 x g durante 10 min a temperatura ambiente, se recolectaron los protoplastos intactos que quedaron encima del colchón de sacarosa y se incubaron en hielo durante 30 min.

Para cada transformación, se tomaron 200 μl de suspensión de protoplastos y se transfirieron a un tubo nuevo de 2 ml. Se centrifugaron a 1000 x g durante 3 min a temperatura ambiente y se resuspendieron en 100 μl de solución Man/Mg. Se añadieron 50 μl del correspondiente plásmido a una concentración de 1 $\mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$ y 110 μl de solución de PEG y se mezclaron por inversión. La mezcla se incubó 15 min a temperatura ambiente, se añadieron 440 μl de solución W5 y se mezcló por inversión. Se centrifugó a 1000 x g durante 3 min a temperatura ambiente y los protoplastos fueron resuspendidos cuidadosamente en 100 μl de

solución WI. Se añadieron 400 µl de WI progresivamente, y los protoplastos transformados fueron incubados a temperatura ambiente y luz constante de unos 30 µE cm⁻² s⁻¹ en tubos de 2 ml durante 16 horas previas a la visualización mediante microscopía láser confocal (CLSM, *Confocal Laser Scanning Microscopy*).

Soluciones:

Solución enzimática: 0,4 M manitol; 20 mM KCl; 10 mM CaCl₂; 0,1% (p/v) albúmina bovina sérica (ABS); 20 mM MES-KOH, pH 5,7; 1% (p/v) celulasa onozuka R-10 (Duchefa, Haarlem, Holanda); 0,25% (p/v) macerozima R-10 (Duchefa, Haarlem, Holanda).

Solución WI: 0,5 M manitol; 4 mM MES-KOH, pH 5,7.

Solución Man/Mg: 0,5 M manitol; 15 mM MgCl₂.

Solución de PEG: 40% (p/v) polietilenglicol 4000; 200 mM manitol; 100 mM CaNO₃.

Solución W5: 0,5 M manitol; 154 mM NaCl; 125 mM CaCl₂; 5 mM KCl; 5 mM glucosa; pH 5,8 con KOH.

1.3.5. Análisis por microscopía láser confocal de *A. thaliana*

Para la localización de las proteínas *GmPAA2-1* y *GmPAA2-2* unidas a YFP (*Yellow Fluorescent Protein*), las plantas de *A. thaliana* transgénicas estables y los protoplastos transformados transitoriamente se analizaron mediante microscopía láser confocal.

Las plantas transgénicas de *A. thaliana* se cultivaron durante 14 días en medio ½ MS con 1% (p/v) sacarosa (apartado 1.3.1). Las hojas se cortaron con un bisturí evitando el daño innecesario, se montaron en un portaobjetos con una gota de glicerol y se colocó un cubreobjetos sobre la muestra. En el caso de los protoplastos de *A. thaliana* transformados (apartado 1.3.4), éstos se colocaron sobre un portaobjetos y se cubrieron las preparaciones microscópicas con un cubreobjetos.

Las imágenes de fluorescencia se obtuvieron utilizando un microscopio láser confocal Leica TCS SP5 (Leica, Wetzlar, Alemania). Las muestras de protoplastos o plantas transformadas con los vectores vacíos se utilizaron como controles negativos. Para la excitación de la proteína YFP se utilizó luz de 514 nm, y la emisión se recogió de 518 a 580 nm. La clorofila fue excitada con luz de 633 nm y la señal se recogió en el rango de 651 a 717 nm. Se comprobó que no se producía solapamiento en las señales. Las imágenes se

analizaron con los programas Leica LAS AF Lite (Leica, Wetzlar, Alemania) y Fiji (<http://fiji.sc/>, de código abierto).

1.3.6. Cultivo de plantas de *Glycine (G.) max*

Las plantas de soja (*Glycine max* (L.) Merr.) variedad Safrana se sembraron en vermiculita y se mantuvieron en oscuridad durante 3 días. Tras este periodo, las semillas se germinaron en vermiculita durante 4 días. Las plántulas fueron transferidas a cultivo hidropónico durante 2 semanas con aireación. La solución hidropónica fue renovada semanalmente. Las plantas crecieron en una cámara bioclimática con un fotoperiodo de 12/12 h o 16/8 h de luz/oscuridad, humedad relativa del 70% y temperatura de 24 °C. Tratamientos de *G. max*

Las semillas se germinaron en vermiculita durante 1 semana (apartado 1.3.6) y, posteriormente, se transfirieron a solución Hoagland (Hoagland y Arnon, 1950) modificada II con 0,5 µM CuSO₄ durante una semana. Posteriormente, las plantas fueron tratadas durante una semana con diferentes concentraciones de Cu en la solución Hoagland modificada II: 0 µM CuSO₄ añadido, 0,5 µM CuSO₄ y 10 µM CuSO₄.

Alternativamente, las plantas fueron germinadas en vermiculita durante 1 semana (apartado 1.3.6) y transferidas a cultivo hidropónico durante dos semanas con solución Hoagland (Hoagland y Arnon, 1950) modificada I (apartado 1.3.2) con diferentes concentraciones de Cu: 0 µM CuSO₄ añadido, 0,5 µM CuSO₄ y 10 µM CuSO₄.

Medios de cultivo:

Solución Hoagland modificada II (Hoagland II): 2,69 mM Ca(NO₃)₂; 1 mM KH₂PO₄; 1 mM MgSO₄; 2,5 mM KNO₃; 1 µM ZnSO₄; 4,75 µM MnCl₂; 23 µM H₃BO₃; 0,2 µM Na₂MoO₄; 50 mM NaCl; 75 µM Fe-NaEDTA.

2. AISLAMIENTO Y ANÁLISIS DE ÁCIDOS NUCLEICOS

2.1. AISLAMIENTO DE ÁCIDOS NUCLEICOS

2.1.1. Extracción de ADN genómico

Se utilizó un método descrito previamente (Edwards y col., 1991) para la extracción del ADN genómico (ADNg). Las muestras utilizadas fueron hojas o fracciones de hoja de 1 cm aproximadamente. Se homogeneizaron en un tubo de 1,5 ml con un microhomogeneizador de plástico durante 15 s. Se añadieron 400 µl de tampón de extracción y se centrifugaron a

12000 x g durante 1 min. Se transfirieron 300 µl de sobrenadante a un tubo nuevo y se añadieron 300 µl de 2-propanol. Se mezcló por inversión y se incubó a temperatura ambiente durante 2 min. Se centrifugó a 12000 x g durante 5 min, se decantó el sobrenadante y el sedimento se dejó secar al aire durante 10-15 min y se resuspendió en 25 µl de tampón T0,1E.

Tampones:

Tampón de extracción: 200 mM Tris-HCl, pH 7,5; 250 mM NaCl; 25 mM EDTA; 0,5% (p/v) SDS.

Tampón T0,1E: 10 mM Tris-HCl, pH 8,0; 0,1 mM EDTA.

2.1.2. Extracción de ADN plasmídico

Se cultivaron las bacterias transformadas (apartado 1.1.3) en 5 ml de LB líquido con antibióticos a 37 °C con agitación durante toda la noche. Las bacterias fueron recogidas por centrifugación a 12000 x g durante 3 min y el ADN plasmídico fue extraído utilizando el kit comercial GenJET Plasmid Miniprep Kit (Fermentas, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EEUU), de acuerdo con las instrucciones del fabricante o el protocolo descrito (Holmes y Quigley, 1981) con modificaciones. Las bacterias recogidas por centrifugación se resuspendieron en 300 µl de tampón STETL y se agitaron vigorosamente. Se incubaron durante 5-10 min a temperatura ambiente, se transfirieron a un baño de agua hirviendo durante 1 min y se centrifugaron a 12000 x g durante 20 min a temperatura ambiente. Se eliminó cuidadosamente el sedimento con un palillo, se añadieron 280 µl de 2-propanol, se mezcló y se centrifugó durante 20 min a 12000 x g a temperatura ambiente. Se eliminó el sobrenadante y se añadieron 150 µl de 70% (v/v) etanol. Se centrifugó a 12000 x g durante 5 min a temperatura ambiente, el sedimento se secó al aire y se suspendió en 30 µl de tampón T0,1E (apartado 2.1.1).

Tampones:

Tampón STETL: 8% (p/v) sacarosa; 5% (p/v) Triton X-100; 50 mM EDTA; 50 mM Tris-HCl, pH 8,0; 0,5 mg ml⁻¹ lisozima; 0,033 mg ml⁻¹ ARNasa A.

2.1.3. Extracción de ARN total

Los tejidos de las plantas fueron homogeneizados en frío (N₂ líquido) utilizando un mortero para los de mayor volumen o un molino de bolas (Retscher, Newtown, PA, EEUU) para las muestras menores. El ARN total se extrajo utilizando el kit RNeasy Plant mini

(Quiagen, Venlo, Holanda) a partir de 0,1 g de tejido, siguiendo las instrucciones del fabricante o bien utilizando el reactivo TRI (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EEUU). Para ello, se añadieron 1,6 ml del reactivo TRI a 0,2 g de tejido vegetal molido, se agitó vigorosamente durante 30 s, se incubó a temperatura ambiente durante 5 min y se centrifugó a 11200 x g durante 10 min a 4 °C. El sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo y se añadieron 400 µl de cloroformo. Se agitó vigorosamente 15 s y se incubó durante 5 min a temperatura ambiente. Se centrifugó a 11200 x g durante 15 min a 4 °C y la fase acuosa superior se transfirió a un tubo de 2 ml nuevo. Se añadieron 600 µl de 2-propanol y 100 µl de 3 M acetato sódico, pH 5,2. Las muestras se mantuvieron a 4 °C durante 15 min y se centrifugaron a 11200 x g durante 15 min a 4 °C. Se eliminó el sobrenadante y se lavó el sedimento 2 veces con 1 ml de 70% (v/v) etanol. El sedimento se dejó secar a temperatura ambiente durante 10-15 min y se disolvió en 30 µl de agua ultrapura libre de ARNasas.

La pureza y concentración del ARN se determinó en un espectrofotómetro NanoDrop (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). Se midió la absorbancia a 260 nm para calcular la concentración de ácidos nucleicos, y los coeficientes A_{260nm}/A_{280nm} y A_{260nm}/A_{230nm} para determinar la contaminación por proteínas y polisacáridos, respectivamente.

La integridad del ARN se determinó mediante electroforesis en gel de agarosa (apartado 2.2).

2.2. ELECTROFORESIS DE ÁCIDOS NUCLEICOS

Los ácidos nucleicos se analizaron mediante electroforesis en geles de 1% (p/v) agarosa en tampón TBE o TAE, teñidos con 1X SYBR Safe DNA Gel Stain (Life Technologies, Carlsbad, CA, EEUU) o 5 µg µl⁻¹ bromuro de etidio (Life Technologies, Carlsbad, CA, EEUU).

Las muestras de ADN se mezclaron con tampón de carga de ADN y se cargaron 5-20 µl de muestra en el gel de agarosa. En el caso de muestras de ARN, se mezclaron 1-3 µg con tampón de carga de ARN y se cargaron en un gel de agarosa 1%.

La electroforesis se llevó a cabo en una cubeta (BioRad, Hercules, CA, EEUU) con tampón TBE o TAE a 100 V (voltaje constante) durante 30 min. Las imágenes se tomaron con un transiluminador Gel Doc (BioRad, Hercules, CA, EEUU) utilizando el programa de análisis de imagen Quantity One (BioRad, Hercules, CA, EEUU).

La masa molecular de los fragmentos amplificados fue estimada por comparación con los marcadores de masa molecular 1 kb Plus DNA Ladder (Life Technologies, Carlsbad, CA,

EEUU) o GeneRuler DNA Ladder Mix (Fermentas, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EEUU).

Tampones:

TBE: 90 mM Tris-HCl, pH 8,0; 90 mM H₃BO₃; 2 mM EDTA.

TAE: 40 mM Tris-HCl, pH 7,6; 20 mM ácido acético; 1 mM EDTA.

Tampón de carga de ADN (2X): 0,08% (p/v) Orange G (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EEUU); 10% (p/v) glicerol.

Tampón de carga de ARN (2X): 0,025% (p/v) SDS; 0,025% azul de bromofenol (p/v); 0,025% (p/v) xilene cianol; 5 mM EDTA, pH 8,0; 95% (v/v) formamida.

2.3. SÍNTESIS DE ADN COMPLEMENTARIO

El ARN purificado se trató con ADNasaI (DNase I recombinant, RNase-free-Roche, Basel, Suiza- o TURBO DNase -Life Technologies, Carlsbad, CA, EEUU-) de acuerdo con las especificaciones de los fabricantes.

Se sintetizó el ADN complementario (ADNc) a partir de 1-2 µg de ARN total utilizando oligo (dT)₂₀ y la retrotranscriptasa Thermoscript, SuperScript III o el kit RevertAid RT de acuerdo con las especificaciones del fabricante (todos estos reactivos fueron de Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, EEUU).

2.4. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

La amplificación de los productos de PCR se realizó en un termociclador utilizando las enzimas BIOTAQ DNA Polimerasa (Bioline, Londres, Reino Unido) para la amplificación regular de fragmentos o las ADN polimerasas *proofreading* Phusion High Fidelity DNA Polymerase (Finnzymes, Thermo Scientific, Vantaa, Finlandia) o TaKaRa Ex Taq polymerase (TaKaRa Clontech, Mountain View, CA, EEUU) para la posterior clonación o secuenciación de los productos de PCR. La amplificación por PCR con las diferentes enzimas se llevó a cabo de acuerdo con las especificaciones del fabricante. Las mezclas de reacción estándar para las diferentes enzimas utilizadas fueron las mostradas en la Tabla 1.

La amplificación por PCR se llevó a cabo utilizando como molde ADNc, ADNg o una colonia bacteriana. El ADN se sometió a una desnaturalización inicial a alta temperatura, 30-

40 ciclos de desnaturalización, hibridación de los cebadores y elongación; seguidos de un periodo de elongación final. Las condiciones de PCR utilizadas se detallan en la Tabla 2.

Tabla 1. Concentraciones de los reactivos presentes en la mezcla de PCR utilizados con las diferentes enzimas.

Reactivo	Cantidad o concentración final (BIOTAQ)	Cantidad o concentración final (Phusion)	Cantidad o concentración final (TaKaRa Ex Taq)
Tampón	1X	1X	1X
dNTP mix	0,25 mM	0,2 mM	0,2 mM
Cebador 5'	0,5 μ M	0,5 μ M	0,5 μ M
Cebador 3'	0,5 μ M	0,5 μ M	0,5 μ M
ADN Polimerasa	2,5 U	1 U	0,5 U
Muestra (ADNc/ADNg/colonia)	\approx 50 ng/ \approx 70 ng/1 colonia	\approx 50 ng/ \approx 70ng/-	\approx 50 ng/-/-
H ₂ O	Hasta 20 μ l	Hasta 20 μ l	Hasta 20 μ l

Los cebadores se diseñaron con la ayuda de la herramienta Oligoanalyzer 3.1 (IDT, Leuven, Bélgica). La temperatura de fusión (T_m , *Melting Temperature*) se calculó utilizando la predicción del programa de estimación de la T_m (disponible en: <http://www.thermoscientificbio.com/webtools/tmc/>). Se tuvieron en cuenta las consideraciones especiales de la enzima Phusion High Fidelity DNA Polymerase para el cálculo de la T_m de los cebadores.

Tabla 2. Condiciones estándar de PCR utilizadas con las diferentes enzimas. T_m , temperatura de fusión.

Ciclo	Biotaq	Phusion	TaKaRa Ex Taq
Desnaturalización inicial	94 °C, 3 min	98 °C, 3 min	98 °C, 3 min
Desnaturalización	94 °C, 30 s	98 °C, 10 s	98 °C, 10 s
Hibridación	T_m , 30 s	T_m , 20 s	T_m , 30 s
Elongación	72 °C, 15 s kb ⁻¹	72 °C, 30 s kb ⁻¹	72 °C, 1 min kb ⁻¹
Elongación final	72 °C, 10 min	72 °C, 10 min	72 °C, 10 min

2.5. EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE PRODUCTOS DE PCR DE GELES DE AGAROSA

Los productos de PCR se separaron por electroforesis en gel de agarosa (apartado 2.2), y las bandas del tamaño esperado se cortaron utilizando un bisturí. A continuación, se purificaron utilizando el kit GeneJET™ Gel Extraction (Fermentas, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EEUU) o UltraClean Gel DNA Extraction (MO BIO, Carlsbad, CA, EEUU) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

2.6. PROCEDIMIENTOS DE CLONACIÓN

Las secuencias codificantes CDS de los genes *GmCCS*, *GmPAA2-1* y *GmPAA2-2*, y el promotor del gen *AtPAA2* se clonaron en diferentes vectores para su estudio. Los cebadores utilizados para la clonación de estos genes se detallan en la Tabla 3.

La identidad e integridad de todas las construcciones generadas se confirmó por PCR en colonia (apartado 2.7), digestión por enzimas de restricción (apartado 2.8) y secuenciación (apartado 2.9).

Tabla 3. Secuencias de los cebadores utilizados para la amplificación por PCR de las CDS de los genes *GmCCS*, *GmPAA2-1* y *GmPAA2-2*, y el promotor del gen *AtPAA2*. Se detallan los códigos de los genes de *G. max* y *A. thaliana* (plataforma Phytozome, Universidad de California, EEUU). PS, péptido señal de tránsito al cloroplasto.

Gen	Código	Nombre cebador	Secuencia
<i>GmCCS</i>	Glyma05g 04170	<i>GmCCS_5'sinPS</i>	5' ATGGACCACAACTCTCTTCTC 3'
		<i>GmCCS_3'sinSTOP</i>	5' ACCTTGCTAGTAACAAAATCTGTA 3'
<i>GmPAA2-1</i>	Glyma06g 05890	<i>GmPAA2-1_5'</i>	5' CACCATGGCTACTCATCTTTTCAGACTTC 3'
		<i>GmPAA2-1_5'sinPS</i>	5' CACCAGAGAGGCCAAAGACTCGCCG 3'
		<i>GmPAA2-1_3'</i>	5'TTATTTTAAATTAAGCATATCTGTGTTTGAAT 3'
		<i>GmPAA2-1_3'sinSTOP</i>	5' TTTTAAATTAAGCATATCTGTGTTTGAATG 3'
<i>GmPAA2-2</i>	Glyma04g 05900	<i>GmPAA2-2_5'</i>	5' CACCATGGCTACTCATCTTTCAGACTTT 3'
		<i>GmPAA2-2_5'sinPS</i>	5' CACCTGCCGCCACCGTCGTGAAATT 3'
		<i>GmPAA2-2_3'</i>	5' TTATTTTACATTAAGCATATCTGTGTTTGAAT 3'
		<i>GmPAA2-2_3'sinSTOP</i>	5' ACAGTTTTTGACCCGGGAGATGC 3'
<i>pAtPAA2</i>	At5g21930	<i>pAtPAA2_5'</i>	5' CACCTTGCGTAAATGCCGAAGAG 3'
		<i>pAtPAA2_3'</i>	5' TGGAAAGCATCGGTTACGAGG 3'

Los vectores utilizados, así como la resistencia que confieren en los diferentes organismos, se detallan en la Tabla 4.

El análisis y representación de los vectores se realizó con el programa Vector NTI versión 11.5 (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, EEUU).

Tabla 4. Vectores empleados, método de selección en los organismos *E. coli*, *A. tumefaciens*, *S. cerevisiae* y *A. thaliana* transformados, y referencias.

Vector	Resistencia en <i>E. coli</i>	Resistencia en <i>A. tumefaciens</i>	Selección en <i>S. cerevisiae</i>	Resistencia en <i>A. thaliana</i>	Referencia
pBAD TOPO TA	Ampicilina	-	-	-	Invitrogen, Life Technologies
pENTR/D TOPO	Kanamicina	-	-	-	Invitrogen, Life Technologies
pFL383	Ampicilina	-	-Histidina	-	Talke et al., 2006
pFL61	Ampicilina	-	-Uracilo	-	Minet et al., 1992
pMDC32	Kanamicina	Kanamicina	-	Higromicina	Curtis y Grossniklaus, 2003
pEarleyGate 101	Kanamicina	Kanamicina	-	Glufosinato de amonio	Earley et al., 2006
pMDC163	Kanamicina	Kanamicina	-	Higromicina	Curtis y Grossniklaus, 2003

2.6.1. Clonación en el vector pBAD TOPO TA

La sobreexpresión y purificación de proteínas en bacterias se llevó a cabo utilizando el vector pBAD TOPO TA (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, EEUU). Este vector cuenta con una estrategia de clonación de alta eficiencia (clonación TOPO) que se basa en la unión de la topoisomerasa del virus *Vaccinia* en sitios específicos y corte de un enlace fosfodiéster (Shuman, 1991), lo que produce la unión de la topoisomerasa al extremo 3' fosfato del ADN. Esta unión puede ser atacada por el extremo 5' hidroxilo del ADN, lo que produce la liberación de la topoisomerasa (Shuman, 1994). El vector se comercializa lineal, con una desoxitimina (T) protuberante en el extremo 3' y topoisomerasas unidas.

El vector cuenta con el promotor P_{BAD}, que se activa en presencia de L-arabinosa y produce unos niveles de transcripción muy bajos en su ausencia (Lee y col., 1987). Este vector

añade una región polihistidina (6xHis) al extremo C-terminal de la proteína, lo que facilita la purificación por cromatografía de afinidad sobre metales inmovilizados (IMAC, *Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography*) (Figura 1).

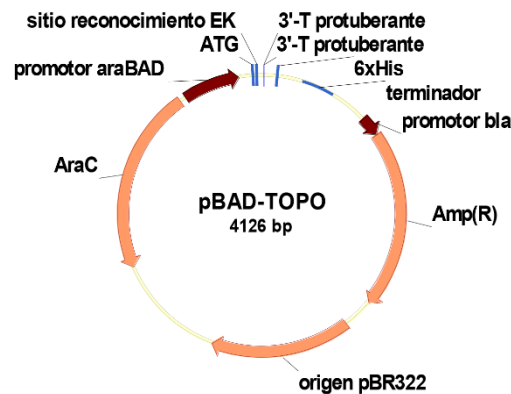


Figura 1. Organización de las principales regiones del vector pBAD TOPO TA. ATG, codón de inicio de la traducción; 3'-T protuberante, desoxitimina en el extremo 3' protuberante; 6xHis, región codificante para polihistidina; terminador, terminadores de la transcripción; promotor bla, promotor de la β -lactamasa; Amp(R), β -lactamasa (confiere resistencia a ampicilina); origen pBR322, origen de replicación derivado del plásmido pBR322; AraC, CDS de la proteína reguladora del operón arabinosa; promotor araBAD, promotor arabinosa y elementos reguladores.

Las CDS sin los péptidos señal de tránsito al cloroplasto ni los codones STOP de los genes *GmCCS* y *GmPAA2-2* se amplificaron por PCR con la enzima Phusion High Fidelity DNA Polymerase (apartado 2.4) que produce fragmentos con extremos romos. Se utilizaron los cebadores *GmCCS_5'sinPS* y *GmCCS_3'sinSTOP* para amplificar *GmCCS* y para amplificar *GmPAA2-2* se usaron los cebadores *GmPAA2-2_5'sinPS* y *GmPAA2-2_3'sinSTOP* (Tabla 3). Los productos de PCR fueron purificados en gel de agarosa (apartado 2.5), y se añadieron desoxiadeninas (A) en los extremos 3' para su posterior clonación en el vector pBAD TOPO TA. Para ello, se incubaron durante 2 h a 72 °C con 2 mM dATP, 2,5 U BIOTAQ DNA Polimerasa y tampón 1X. A continuación, el inserto se clonó en el vector pBAD TOPO TA en una proporción 2:1 vector:inserto. Para ello, el inserto (10 ng) se incubó 30 min a temperatura ambiente con 1 μ l de disolución de sal (1,2 M NaCl, 60 mM MgCl₂) y 1 μ l vector (10 ng ml⁻¹) en un volumen de 6 μ l. La mezcla de ligación se transformó en bacterias DH5 α (apartado 1.1.3) y se sembró en placas de LB/ampicilina (50 μ g ml⁻¹).

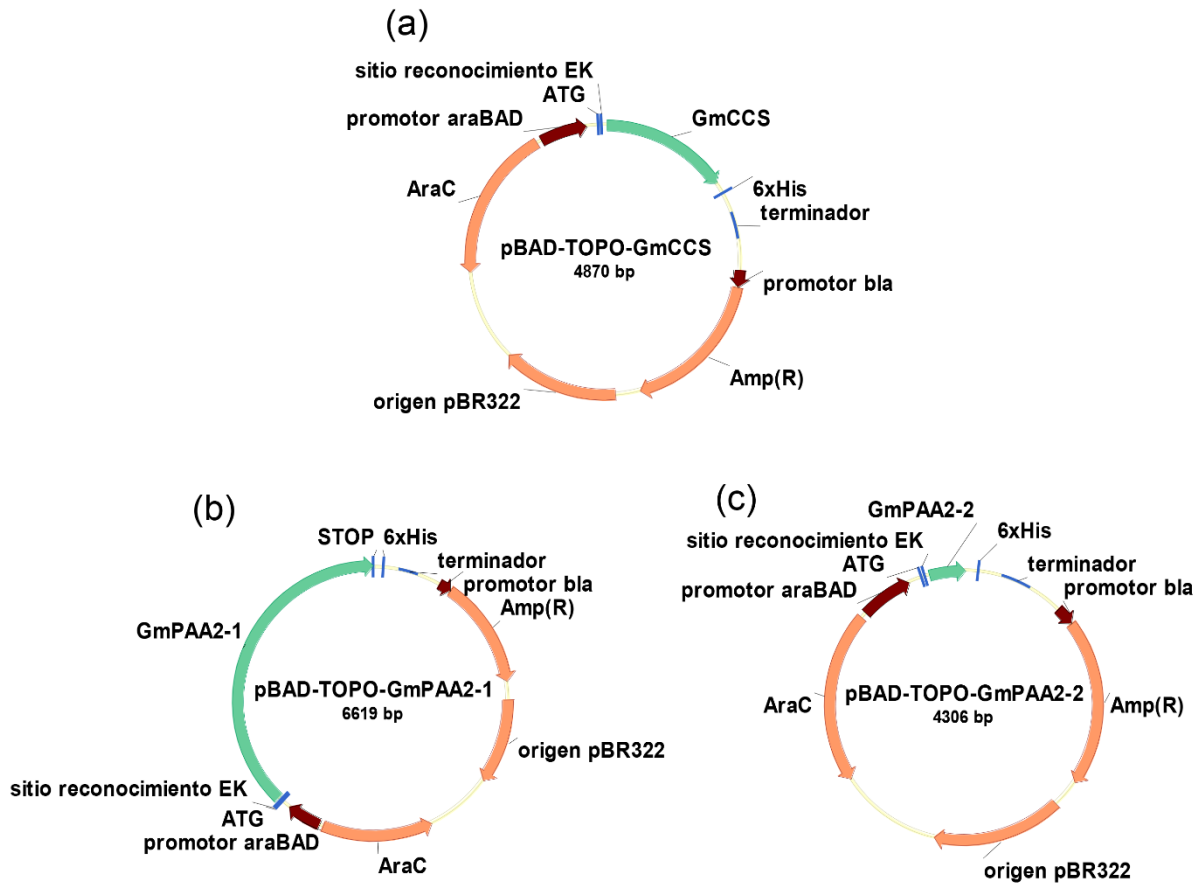


Figura 2. Esquema de los plásmidos derivados de pBAD TOPO TA utilizados para la sobreexpresión de proteínas en bacterias. (a) Construcción pBAD TOPO TA-*GmCCS*; (b) construcción pBAD TOPO TA-*GmPAA2-1*, la CDS del gen *GmPAA2-1* conserva el codón STOP propio; (c) construcción pBAD TOPO TA-*GmPAA2-2*. ATG, codón de inicio de la traducción; 6xHis, región codificante para polihistidina; terminador, terminadores de la transcripción; promotor bla, promotor de la β -lactamasa; Amp(R), β -lactamasa (confiere resistencia a ampicilina); origen pBR322, origen de replicación derivado del plásmido pBR322; AraC, CDS de la proteína reguladora del operón arabinosa; promotor araBAD, promotor arabinosa y elementos reguladores.

La construcción en el vector pBAD TOPO TA con la CDS del gen *GmPAA2-1* conteniendo el codón de STOP propio del gen fue producida por la Lda. Miren B. del Castillo en nuestro laboratorio (Figura 2b).

Una vez fueron confirmadas por secuenciación las construcciones en el vector pBAD TOPO TA, se transformaron las bacterias LMG194 (apartado 1.1.3) para la sobreexpresión y purificación de las proteínas (apartados 3.3.2 y 3.3.3).

2.6.2. Tecnología Gateway: consideraciones generales

La tecnología Gateway es un método de clonación basado en las propiedades de recombinación específica del bacteriófago lambda (Landy, 1989). Es una herramienta rápida con alta eficiencia que permite mover secuencias de ADN desde un mismo vector de entrada (pENTR/D TOPO, Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, EEUU) (Figura 3) a múltiples vectores de destino para análisis funcionales y expresión de proteínas (Hartley y col., 2000).

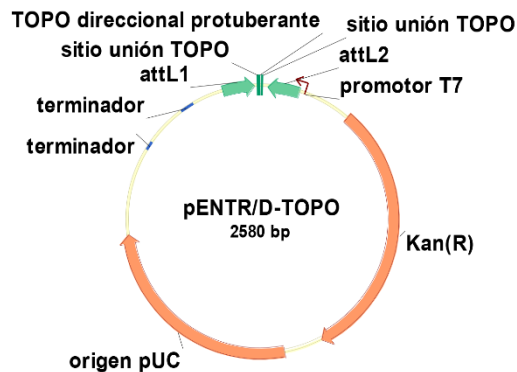


Figura 3. Organización de las principales regiones del vector pENTR/D TOPO. Sitio unión TOPO, sitio de reconocimiento de las topoisomerasas; *attL2* y *attL1*, sitios de recombinación; promotor T7, promotor del fago T7; Kan(R), gen de resistencia a kanamicina; origen pUC, origen de replicación derivado del plásmido pUC; terminador, secuencia de terminación de la transcripción.

A continuación se detalla el procedimiento general para la generación de vectores de entrada y destino y, posteriormente, las consideraciones específicas según el objetivo de las diferentes clonaciones realizadas con esta estrategia.

Para la generación de los vectores de entrada, se utilizó el kit de clonación pENTR/D TOPO según las indicaciones del fabricante. De forma general, se amplificaron los fragmentos por PCR con la enzima Phusion High Fidelity DNA Polymerase (apartado 2.4) y cebadores específicos que añadían la secuencia 5' CACC 3' al extremo 5' de los productos, con el fin de conseguir una inserción direccional (Tabla 3). Los productos de PCR se purificaron en gel de agarosa (apartado 2.5) y se clonaron en proporción 2:1 vector:inserto. Para ello, se preparó la mezcla ligación con el inserto, 1 μ l de disolución de sal (1,2 M NaCl; 0,06 M MgCl₂) y 0,5 μ l de vector (15-20 ng ml⁻¹) en un volumen de 6 μ l y se incubó durante 30 min a temperatura ambiente. La mezcla de ligación se transformó en bacterias DH5 α (apartado 1.1.3) y se sembró en placas de LB/kanamicina (50 μ g ml⁻¹).

Las construcciones en los vectores binarios de destino se generaron mediante la reacción de recombinación de los sitios *attL* del vector de entrada y *attR* del vector de destino. El inserto del vector de entrada pasa a formar parte del vector de destino, en el locus en el que estaba insertado el gen letal *ccdB*. Para ello se llevó a cabo la reacción LR clonasa (LR Clonase II Enzyme Mix, Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, EEUU) siguiendo las instrucciones del fabricante. Esta reacción produce una mezcla de vectores de entrada y destino que no han reaccionado, vectores de entrada con el gen *ccdB* y vectores de destino con el inserto (plásmido recombinante correcto).

La selección de los plásmidos recombinantes correctos se llevó a cabo por dos estrategias diferentes según la resistencia a antibióticos presente en los vectores. En el caso de que el vector de destino proporcionara a las bacterias resistencia a un antibiótico diferente al del vector de entrada (pENTR/D TOPO, resistente a kanamicina), las bacterias DH5 α transformadas con la reacción LR se seleccionaron utilizando el antibiótico del vector de destino. De esta forma, las bacterias DH5 α que hubieran incorporado el vector de destino correcto serían las únicas que sobrevivirían.

En el caso de que los vectores de entrada y destino confirieran la misma resistencia a las bacterias (resistencia a kanamicina), se siguió el protocolo descrito (Xu y Li, 2008), en el que se combina la transformación de la mezcla de reacción LR en células DH5 α y selección con kanamicina (las células DH5 α son sensibles al producto del gen *ccdB*, por lo que solo sobreviven las bacterias que hayan incorporado los vectores de destino recombinantes correctos y los vectores de entrada sin reaccionar) con la transformación en *A. tumefaciens* y selección con kanamicina (solo sobreviven las bacterias transformadas con el vector de destino recombinante correcto, ya que los vectores de entrada no poseen el origen de replicación en *A. tumefaciens* pVS1).

2.6.3. Tecnología Gateway: generación de vectores de entrada y de destino

La tecnología Gateway se utilizó en este trabajo con cinco objetivos diferentes:

Objetivo 1: expresión en levaduras de las proteínas *GmPAA2-1* y *GmPAA2-2* fusionadas al epítipo de la proteína hemaglutinina (HA) en el extremo N-terminal para comprobar la especificidad de los anticuerpos anti-*GmPAA2*.

Con este objetivo, se amplificaron las regiones codificantes (sin incluir los péptidos señal de tránsito al cloroplasto) de los genes *GmPAA2-1*, *GmPAA2-1T* (isoforma truncada de *GmPAA2-1*, ver apartado 1.1 de Resultados) y *GmPAA2-2* por PCR utilizando una ADN

polimerasa *proofreading* (apartado 2.4). Los cebadores específicos utilizados fueron *GmPAA2-1_5'sinPS* y *GmPAA2-1_3'* para amplificar las dos isoformas de *GmPAA2-1*, y *GmPAA2-2_5'sinPS* y *GmPAA2-2_3'* para amplificar *GmPAA2-2* (Tabla 3). Los productos de PCR se clonaron en el vector de entrada pENTR/D TOPO (apartado 2.6.2) y se transfirieron al vector de destino pFL383 (derivado del vector pFL38H-GW) (Talke y col., 2006). Este vector binario (Figura 4) confiere resistencia a ampicilina en bacterias y cuenta con el marcador de selección en levaduras *HIS3*, que permite la selección de colonias transformadas en un medio deficiente en histidina.

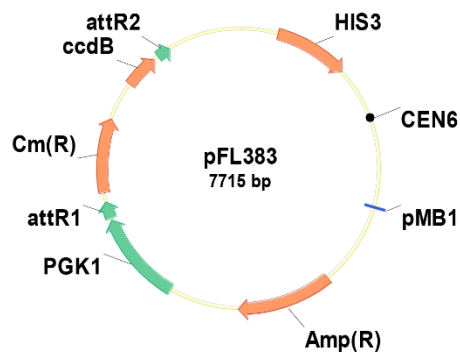


Figura 4. Organización de las principales regiones del vector pFL383 (Talke y col., 2006). *HIS3*, marcador auxotrófico para histidina en levaduras; *CEN6*, región centromérica; *pMB1*, origen de replicación derivado del vector *pMB1*; *Amp(R)*, gen de resistencia a ampicilina; *PGK1*, promotor del gen 3-fosfoglicerato kinasa; *attR1* y *attR2*, sitios de recombinación; *Cm(R)*, gen de resistencia a cloranfenicol; *ccdB*, gen letal cuyo producto inhibe la ADN girasa.

El vector pFL383 incorpora el epítipo HA en el extremo N-terminal de las proteínas, lo que permite el seguimiento de éstas por western blot (apartado 3.2). Los vectores recombinantes de destino (Figura 5) se utilizaron para transformar las levaduras de las cepas silvestres y mutante *ccc2* (apartado 1.2.3) y analizar la especificidad de los anticuerpos anti-*GmPAA2_N-terminal* y anti-*GmPAA2_bucle* (apartado 3.2.6).

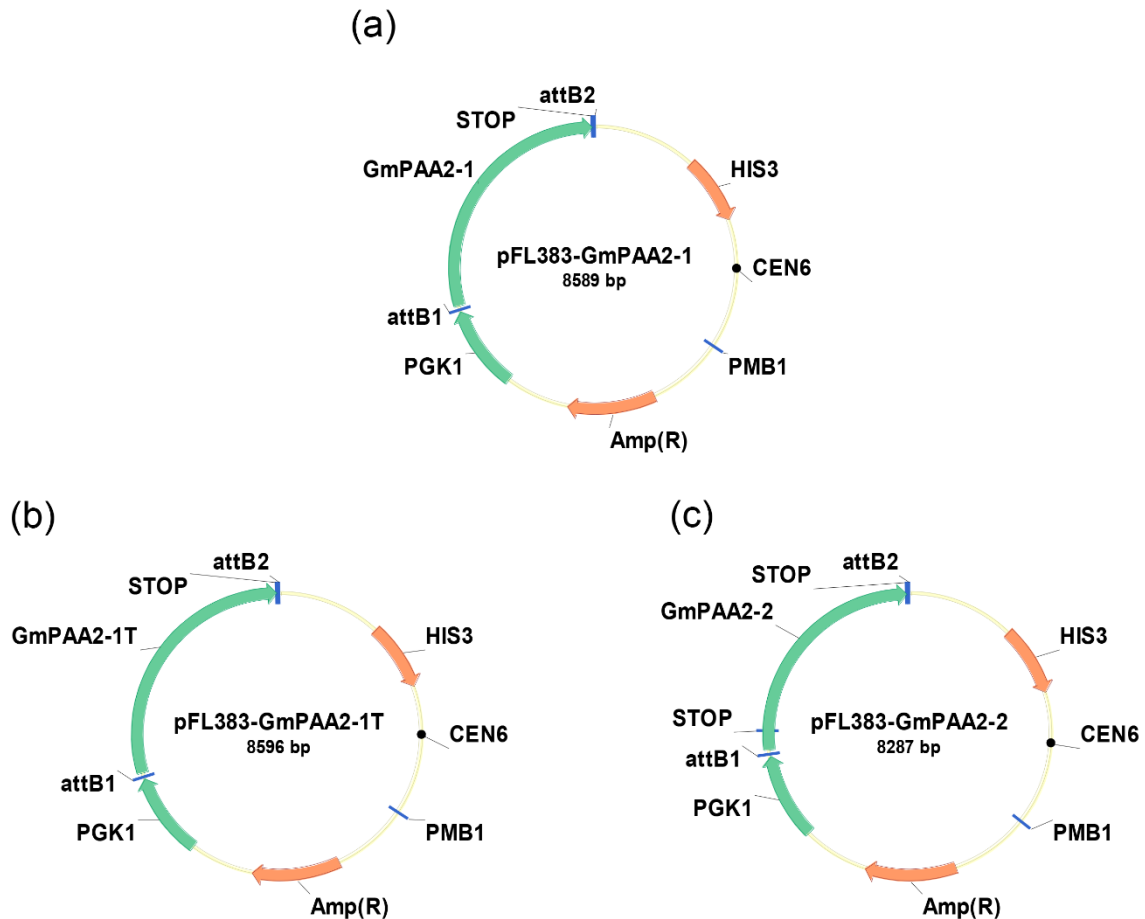


Figura 5. Esquema de los plásmidos derivados de pFL383 (Talke y col., 2006) utilizados para la expresión de proteínas en levaduras. (a) Construcción pFL383-*GmPAA2-1*; (b) construcción pFL383-*GmPAA2-1T*; (c) construcción pFL383-*GmPAA2-2*. HIS3, marcador auxotrófico para histidina en levaduras; CEN6, región centromérica; pMB1, origen de replicación derivado del vector pMB1; Amp(R), gen de resistencia a ampicilina; PGK1, promotor del gen 3-fosfoglicerato kinasa; *attB1* y *attB2*, sitios de recombinación.

Objetivo 2: estudio de la complementación funcional en levaduras de la cepa *ccc2*. La función de la proteína CCC2 de levaduras es transportar el Cu en el aparato de Golgi, y está involucrada en la carga de Cu de FET3 (*Ferrous Transport*) (Yuan et al., 1997).

Con este objetivo se utilizó el vector pFL61 Gateway (Minet y col., 1992) (Figura 6). Se trata de un vector binario de expresión en levaduras similar al pFL383, con la diferencia de que éste carece del epítipo HA y permite a las levaduras crecer en ausencia de uracilo en el medio de cultivo.

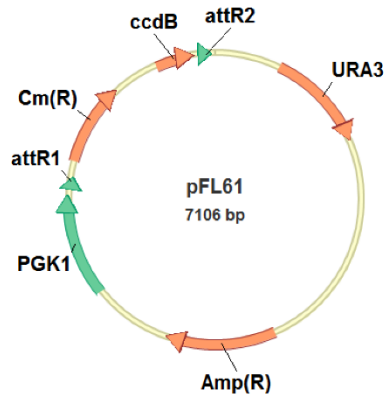


Figura 6. Organización de las principales regiones del vector pFL61 Gateway (Minet y col., 1992). URA3, marcador auxotrófico para uracilo en levaduras; Amp(R), gen de resistencia a ampicilina; PGK1, promotor del gen 3-fosfoglicerato kinasa; *attR1* y *attR2*, sitios de recombinación; Cm(R), gen de resistencia a cloranfenicol; *ccdB*, gen letal cuyo producto inhibe la ADN girasa.

Se transfirieron a este vector las mismas secuencias utilizadas en el vector pFL383 (Figura 7) y se transformaron las levaduras silvestres y *ccc2* para el estudio de la complementación funcional de los mutantes *ccc2* con las proteínas *GmPAA2-1*, *GmPAA2-1T* y *GmPAA2-2*.

Las construcciones de los vectores pFL383 y pFL61 con el gen *GmPAA2-1T* (Figura 5b,7b), y la construcción de la CDS del gen *GmPAA2-1* en el vector pENTR/D TOPO fueron producidas por la Lda. Miren B. del Castillo en nuestro laboratorio.

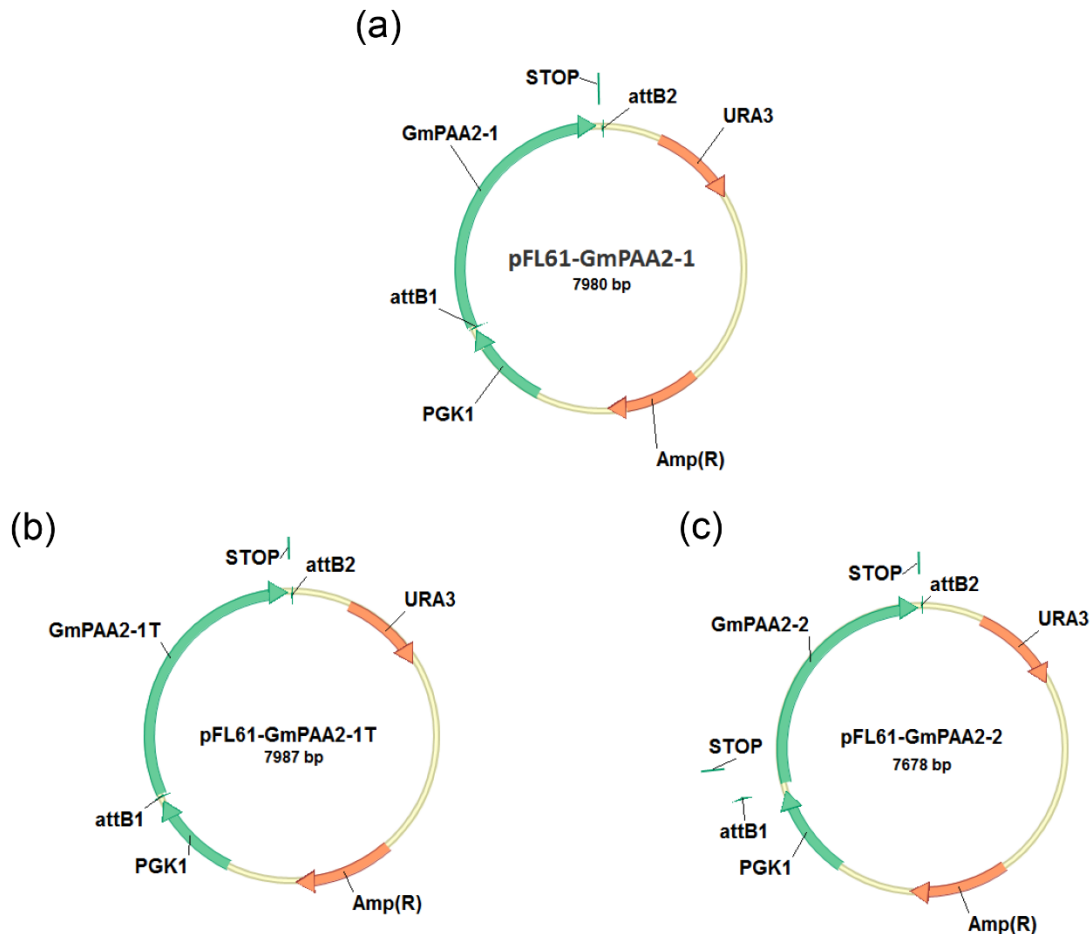


Figura 7. Esquema de los plásmidos derivados de pFL61 (Minet y col., 1992) utilizados para la expresión de proteínas en levaduras. (a) Construcción pFL61-GmPAA2-1; (b) construcción pFL61-GmPAA2-1T; (c) construcción pFL61-GmPAA2-2. URA3, marcador auxotrófico para uracilo en levaduras; Amp(R), gen de resistencia a ampicilina; PGK1, promotor del gen 3-fosfoglicerato kinasa; attB1 y attB2, sitios de recombinación.

Objetivo 3: expresión en los mutantes de *A. thaliana paa1-1* y *paa2-1* de las proteínas GmPAA2-1 y GmPAA2-2 para su posterior caracterización funcional.

Para el objetivo 3, se amplificaron por PCR las CDS completas de los genes *GmPAA2-1* y *GmPAA2-2* con los cebadores *GmPAA2-1_5'* y *GmPAA2-1_3'*, y *GmPAA2-2_5'* y *GmPAA2-2_3'*, respectivamente (Tabla 3), se clonaron en el vector de entrada pENTR/D TOPO (apartado 2.6.2) y se transfirieron al vector de destino pMDC32 (Curtis y Grossniklaus, 2003) (Figura 8,9) que confiere resistencia a kanamicina en las bacterias y a higromicina en las plantas. Este vector binario Gateway cuenta con el promotor constitutivo 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV) (Odell y col., 1985) utilizado para la expresión génica constitutiva (Curtis y Grossniklaus, 2003).

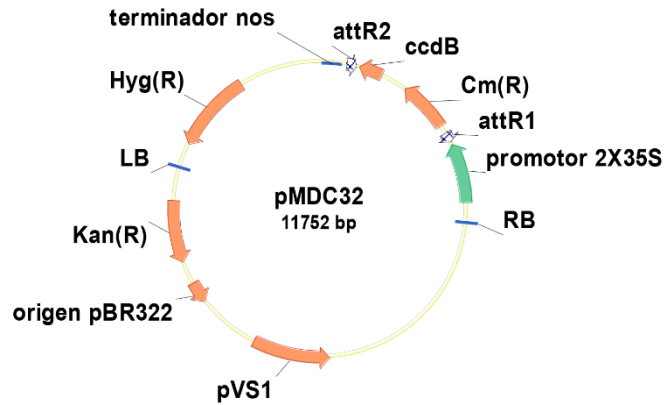


Figura 8. Organización de las principales regiones del vector pMDC32 (Curtis y Grossniklaus, 2003). *attR2* y *attR1*, regiones de recombinación; *ccdB*, gen letal cuyo producto inhibe la ADN girasa; *Cm(R)*, gen de resistencia a cloranfenicol; promotor 2X35S, promotor constitutivo 35S del CaMV; RB (*Right Border*) y LB (*Left Border*), margen derecho e izquierdo de transferencia derivados del plásmido Ti; pVS1, origen de replicación en *A. tumefaciens*; origen pBR322, origen de replicación derivado del plásmido pBR322; Kan(R), gen de resistencia a kanamicina; Hyg(R), gen de resistencia a higromicina; terminador nos, secuencia de terminación de la transcripción.

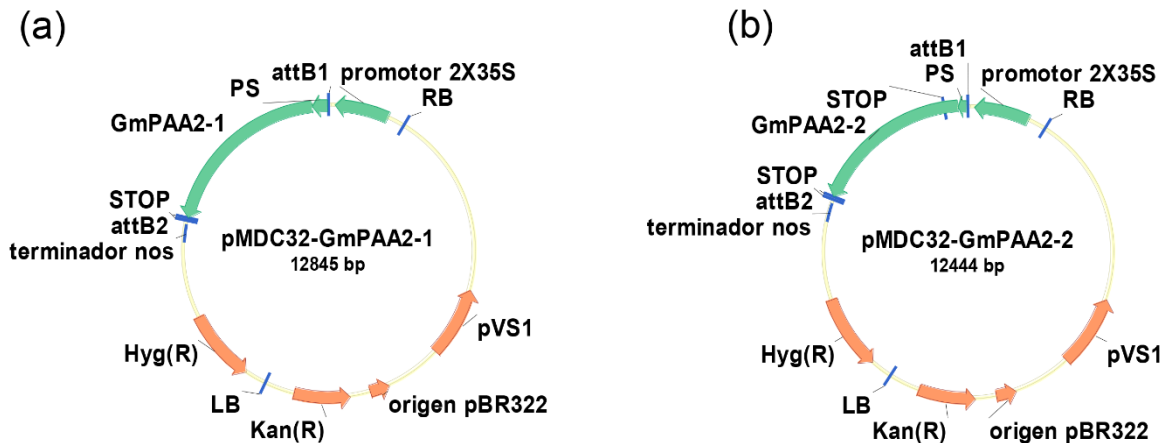


Figura 9. Representación gráfica de los plásmidos derivados de pMDC32 (Curtis y Grossniklaus, 2003). (a) Construcción pMDC32-*GmPAA2-1* y (b) construcción pMDC32-*GmPAA2-2*. PS, péptido señal; *attB1* y *attB2*, sitios de recombinación; promotor 2X35S, promotor constitutivo 35S del CaMV; RB (*Right Border*) y LB (*Left Border*), margen derecho e izquierdo de transferencia derivados del plásmido Ti; pVS1, origen de replicación en *A. tumefaciens*; origen pBR322, origen de replicación derivado del plásmido pBR322; Kan(R), gen de resistencia a kanamicina; Hyg(R), gen de resistencia a higromicina; terminador nos, secuencia de terminación de la transcripción.

Los vectores recombinantes de destino (Figura 9) se utilizaron para generar líneas transgénicas de *A. thaliana* y analizar la complementación funcional de los mutantes *paa1-1* y *paa2-1*.

Objetivo 4: localización subcelular de las proteínas *GmPAA2-1* y *GmPAA2-2* en plantas mediante la creación de proteínas de fusión con YFP en el extremo C-terminal que permitiera su seguimiento.

Se amplificaron por PCR las CDS incluyendo las secuencias de los péptidos señal de tránsito al cloroplasto y excluyendo los codones de STOP endógenos de los genes *GmPAA2-1* y *GmPAA2-2*. Se utilizaron los cebadores *GmPAA2-1_5'* y *GmPAA2-1_3'sinSTOP*, y *GmPAA2-2_5'* y *GmPAA2-2_3'sinSTOP* (Tabla 3) para amplificar ambos genes, respectivamente. Se clonaron en el vector de entrada pENTR/D TOPO (apartado 2.6.2) y se transfirieron al vector de destino pEarleyGate101 (Earley y col., 2006) con resistencia a kanamicina en bacterias y glufosinato de amonio en plantas. El vector binario pEarleyGate101 posee el promotor constitutivo 35S del CaMV, y genera una proteína de fusión con la YFP en el extremo C-terminal (Figura 10).

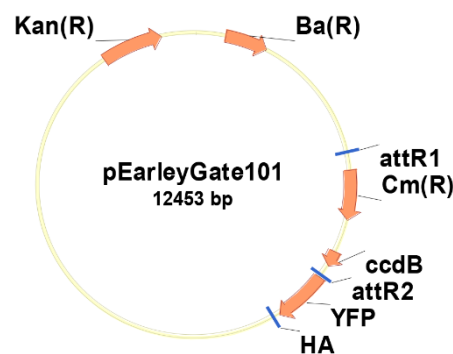


Figura 10. Organización de las principales regiones del vector pEarleyGate101 (Earley y col., 2006). Ba(R), gen de resistencia a glufosinato de amonio; *attR1* y *attR2*, regiones de recombinación; Cm(R), gen de resistencia a cloranfenicol; *ccdB*, gen letal cuyo producto inhibe la ADN girasa; YFP, gen de la proteína fluorescente amarilla; HA, epítipo de la hemaglutinina; Kan(R), gen de resistencia a kanamicina.

La representación gráfica de los vectores derivados de pEarleyGate101 se detalla en la Figura 11.

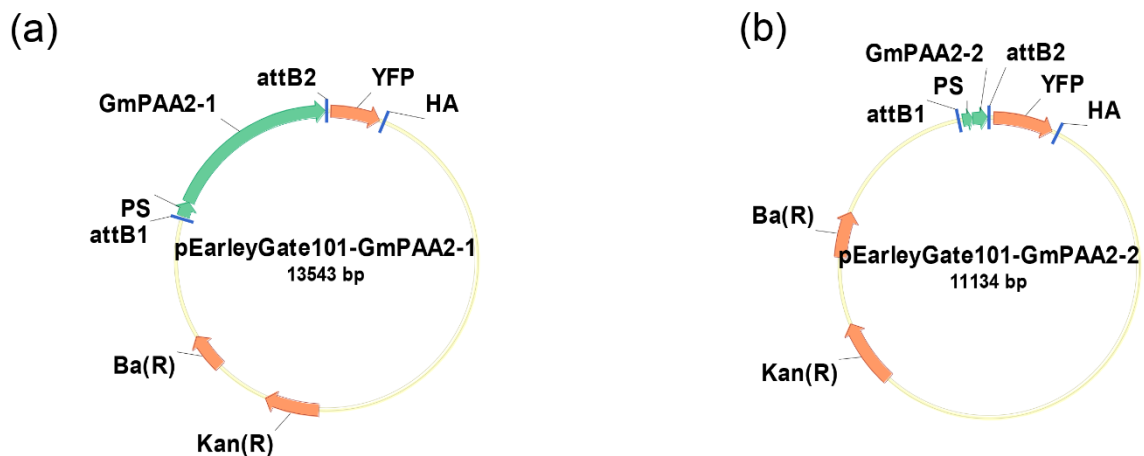


Figura 11. Esquema de los plásmidos derivados de pEarleyGate101 (Earley y col., 2006). (a) Construcción pEarleyGate101-GmPAA2-1 y (b) construcción pEarleyGate101-GmPAA2-2. Ba(R), gen de resistencia a glufosinato de amonio; attB1 y attB2, regiones de recombinación; PS, péptido señal; YPF, gen de la proteína fluorescente amarilla; HA, epítipo de la hemaglutinina; Kan(R), gen de resistencia a kanamicina.

Objetivo 5: caracterización del promotor del gen *AtPAA2* mediante la tinción histoquímica GUS.

La región promotora del gen *AtPAA2* fue amplificada por PCR utilizando los cebadores *pAtPAA2_5'* y *pAtPAA2_3'*. Se clonó en el vector de entrada pENTR/D TOPO (apartado 2.6.2) y se transfirió al vector de destino pMDC163 (Curtis y Grossniklaus, 2003) que confiere resistencia a kanamicina en bacterias y a higromicina en plantas. El vector binario pMDC163 cuenta con el gen marcador β -glucuronidasa utilizado para el análisis de los promotores (Figura 12a).

Las características principales del vector derivado de pMDC163 incluyendo el promotor del gen *AtPAA2* se detallan en la Figura 12b.

El análisis de los elementos reguladores presentes en la secuencia promotora del gen *AtPAA2* se realizó utilizando la herramienta PlantPAN (Chang y col., 2008).

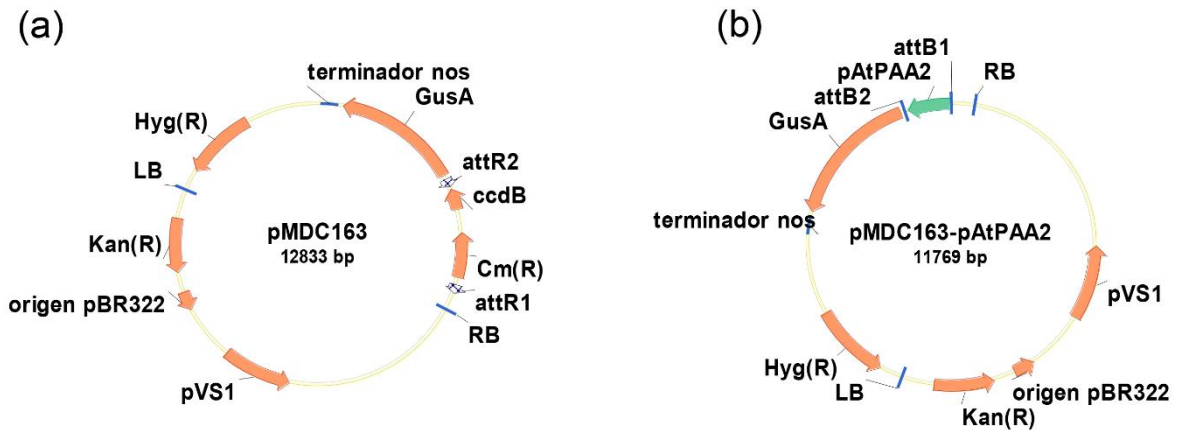


Figura 12. Organización de las principales regiones del vector (a) pMDC163 (Curtis y Grossniklaus, 2003) y (b) plásmido derivado de pMDC163 con el promotor de *AtPAA2*. Terminador nos, secuencia de terminación de la transcripción; GusA, β -glucuronidasa; *attR1* y *attR2*, regiones de recombinación; *ccdB*, gen letal cuyo producto inhibe la ADN girasa; Cm(R), gen de resistencia a cloranfenicol; RB (*Right Border*) y LB (*Left Border*), margen derecho e izquierdo de transferencia derivados del plásmido Ti; pVS1, origen de replicación en *A. tumefaciens*; origen pBR322, origen de replicación derivado del plásmido pBR322; Kan(R), gen de resistencia a kanamicina; Hyg(R), gen de resistencia a higromicina; *attB1* y *attB2*, sitios de recombinación.

2.7. PCR EN COLONIA

Las colonias de *E. coli* o *A. tumefaciens* transformadas se testaron mediante PCR en colonia. Para ello, se realizó una amplificación por PCR (apartado 2.4) utilizando como molde las colonias bacterianas, tomándolas con una punta estéril o un palillo e introduciéndolas directamente en la mezcla de reacción.

2.8. DIGESTIÓN CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN

Se seleccionaron las enzimas de restricción necesarias en cada caso utilizando el programa de análisis de secuencias BioEdit (Ibis Biosciences, Carlsbad, CA, EEUU). Las digestiones se llevaron a cabo utilizando 3 μ l de ADN plasmídico aislado (apartado 2.1.2), 1 μ l de la enzima o enzimas de restricción necesarias, tampón Tango 1X (Fermentas, Thermo Fisher Scientific, Waltman, MA, EEUU) en un volumen final de 20 μ l. La reacción se incubó 2 h a 37 °C y posteriormente se analizaron los productos mediante electroforesis en gel de agarosa y comparación con marcadores de masa molecular (apartado 2.2).

Tampones:

Tango 1X: 33 mM Tris-acetato, pH 7,9; 10 mM acetato magnésico; 66 mM acetato potásico; 0,1 mg mL⁻¹ ABS.

2.9. SECUENCIACIÓN Y ANÁLISIS

Los plásmidos y productos de PCR fueron secuenciados en los servicios de secuenciación del Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO, Madrid, España), Bioarray S.L. (Alicante, España), Colorado State University (Fort Collins, CO, EEUU) o Ruhr-Universität Bochum (Bochum, Alemania). Para ello se enviaron los productos de PCR extraídos y purificados de geles (apartado 2.5) o ADN plasmídico purificado (apartado 2.1.2) y cebadores específicos. Los resultados de secuenciación se analizaron utilizando el programa BioEdit (Ibis Biosciences, Carlsbad, CA, EEUU). El alineamiento de múltiples secuencias se hizo utilizando la herramienta MUSCLE (Multiple Sequence Comparison, EMBL-EBI, Hinxton, Reino Unido).

2.10. AMPLIFICACIÓN DEL ADNc MEDIANTE PCR SEMICUANTITATIVA

La técnica de PCR semicuantitativa se utilizó para analizar la expresión relativa de los transgenes en las plantas de *A. thaliana* transgénicas estables. Se amplificaron por PCR con la enzima BIOTAQ DNA Polimerasa las secuencias de los transgenes y el gen constitutivo *EF1α* (*Elongation Factor 1 α*) tomando como molde el ADNc de las plantas de *A. thaliana*.

Los cebadores utilizados se detallan en la Tabla 5. Los cebadores *GmPAA2_5'SQ* y *GmPAA2_3'SQ* amplifican tanto el gen *GmPAA2-1* como *GmPAA2-2* (apartado 1.1 de Resultados), pero no *AtPAA2*.

Tabla 5. Secuencias de los cebadores utilizados para la amplificación por PCR semicuantitativa de los genes *GmPAA2-1*, *GmPAA2-2* y el gen constitutivo *EF1α*. Se detallan los códigos de los genes de *G. max* y *A. thaliana* (plataforma Phytozome, Universidad de California, EEUU) y la temperatura de hibridación de los cebadores. SQ, semicuantitativa.

Gen	Código	Nombre cebador	Secuencia	Tm
<i>GmPAA2-1</i> y	Glyma06g05890 y	<i>GmPAA2_5'SQ</i>	5' ATGGCTACTCATCTCTTCAGACTTT 3'	54
<i>GmPAA2-2</i>	Glyma04g05900	<i>GmPAA2_3'SQ</i>	5' GCACGCGCCCGCACATCATC 3'	°C
<i>AtEF1α</i>	At5g60390	<i>AtEF1α_5'SQ</i>	5' TAAGGATGGTCAGACCCGRGA 3'	50
		<i>AtEF1α_3'SQ</i>	5' CAGATCCGTGTGCATCTCAAC 3'	°C

2.11. AMPLIFICACIÓN DEL ADN_g MEDIANTE PCR Y CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE LOS MUTANTES *paa1-1* Y *paa2-1*

Los mutantes de *A. thaliana paa1-1* y *paa2-1* fueron caracterizados con el fin de confirmar la presencia del alelo mutante en homocigosis en los individuos (Shikanai y col., 2003; Abdel-Ghany y col., 2005b). Para ello, se amplificaron por PCR (apartado 2.4) las regiones genómicas de los genes *AtPAA1* y *AtPAA2* flanqueando las mutaciones puntuales, con cebadores específicos (Tabla 6). Los fragmentos se purificaron en gel de agarosa (apartado 2.5) y se secuenciaron (apartado 2.9) para confirmar la presencia de cada mutación en homocigosis.

Esta técnica también se utilizó en la caracterización de las plantas transgénicas de *A. thaliana paa1-1* expresando *GmPAA2-1* y *GmPAA2-2*, con el fin de confirmar la inserción del transgén en el genoma. Para ello, se amplificó por PCR sobre el ADN_g parte de la región del promotor 35S CaMV fusionada al extremo N-terminal del transgén con los cebadores específicos *35S_CaMV_5'Tg* (hibrida en la región del promotor 35S CaMV) y *GmPAA2_3'Tg* (hibrida con *GmPAA2-1* y *GmPAA2-2*) (Tabla 6), y los productos de PCR se analizaron por electroforesis en gel de agarosa (apartado 2.2).

Tabla 6. Secuencias de los cebadores utilizados para la amplificación por PCR sobre ADN_g. Se detallan los códigos de los genes de *G. max* y *A. thaliana* (plataforma Phytozome, Universidad de California, EEUU) y la temperatura de hibridación de los cebadores. Mut, caracterización de mutantes; Tg, caracterización de plantas transgénicas.

Gen	Código	Nombre cebador	Secuencia	Tm
<i>AtPAA1</i>	At3g33520	<i>AtPAA1_5'Mut</i>	5' GTGGTCAAGTCAGGTAGAAGCA 3'	54
		<i>AtPAA1_3'Mut</i>	5' CAGCATTGCCGTTGGAGTAG 3'	°C
<i>AtPAA2</i>	At5g21930	<i>AtPAA2_5'Mut</i>	5' GAGTGGCGGAGAATGTGAAGA 3'	53
		<i>AtPAA2_3'Mut</i>	5' CGCAAAGAATAGTAGGAACCATC 3'	°C
<i>35S CaMV</i>		<i>35S_CaMV_5'Tg</i>	5' CATTTCATTTGGAGAGGACCTCGAC 3'	56
<i>GmPAA2-1</i> y <i>GmPAA2-2</i>	Glyma06g05890 y Glyma04g05900	<i>GmPAA2_3'Tg</i>	5' GCACGCGCCGCACATCATTCC 3'	°C
<i>AtACT2</i>	At3g18780	<i>AtACT2_5'Tg</i>	5' TAGCTCTCAAGATCAAAGGCT 3'	51
		<i>AtACT2_3'Tg</i>	5' AACATTGCAAAGAGTTTCAAGGT 3'	°C

2.12. PCR CUANTITATIVA

La técnica de PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR) se utilizó para analizar la expresión relativa de los genes en plantas de *G. max* en diferentes condiciones nutricionales de Cu. La amplificación de productos de PCR se llevó a cabo sobre ADNc (apartado 2.3) de *G. max* utilizando cebadores específicos (Tabla 7) y la mezcla Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EEUU). Se utilizó un termociclador LightCycler 480 System (Roche, Basel, Suiza).

Tabla 7. Secuencias de los cebadores utilizados para la amplificación por PCR cuantitativa en tiempo real. Se detallan los códigos de los genes de *G. max* y *A. thaliana* (plataforma Phytozome, Universidad de California, EEUU). Q, PCR cuantitativa en tiempo real.

Gen	Código	Nombre cebador	Secuencia
GmPAA2-1	Glyma06g05890	<i>GmPAA2-1_5'Q</i>	5' TCTGAGACTGAGCGATTGCGGATTTCC 3'
		<i>GmPAA2-1_3'Q</i>	5' CGGCTTCGACTCTTAACGACCAATTC 3'
GmPAA2-2	Glyma04g05900	<i>GmPAA2-2_5'Q</i>	5' CCAGCCCTCGCCTCGTGATAATGTC 3'
		<i>GmPAA2-2_5'Q</i>	5' GCCGGGGTTAAGTAGAGAGAGATTC 3'
GmCOPT2	Glyma11g14290	<i>GmCOPT2_3'Q</i>	5' GTCGCTGTTCTCGGTCACGCCTTG 3'
		<i>GmCOPT2_5'Q</i>	5' CGGTTTATTGAAAGCCACGGTAGA 3'
GmCCS	Glyma05g04170	<i>GmCCS_5'Q</i>	5' CTTGCTACTCCTCCCTCTGCTCTCC 3'
		<i>GmCCS_3'Q</i>	5' GTCCACCATGAACTCCGTCAGTAAC 3'
GmCSD2	Glyma12g08650	<i>GmCSD2_5'Q</i>	5' CGTCGCCACTCTCATCCAAGAAG 3'
		<i>GmCSD2_3'Q</i>	5' CCTCAGGAGCACCATGTGTCAAGT 3'
GmFSD1	Glyma10g22680	<i>GmFSD1_5'Q</i>	5' ATTTGGTTCAGGGTGGGCTTGGCTA 3'
		<i>GmFSD1_3'Q</i>	5' GGGTTCACAGCATTGGGACTCTTG 3'
GmCCH	Glyma10g14110	<i>GmCCH_5'Q</i>	5' GAAGGAGCAGAAGGTGACAGTGA 3'
		<i>GmCCH_3'Q</i>	5' AGGCTTGTTTTAGGTGGTTGTG 3'
GmACT11	Glyma18g52780	<i>GmACT11_5'Q</i>	5' ATCTTGACTGAGCGTGGTTATTCC 3'
		<i>GmACT11_3'Q</i>	5' GCTGGTCCTGGCTGTCTCC 3'
GmUKN1	Glyma12g02310	<i>GmUKN1_5'Q</i>	5' TGGTGCTGCCGCTATTTACTG 3'
		<i>GmUKN1_3'Q</i>	5' GGTGGAAGGAAGTCTAACAATC 3'

La abundancia de los transcritos se analizó en triplicados biológicos y duplicados técnicos. Se utilizaron los dos genes constitutivos *GmACT11* (*Actin 11*) y *GmUKN1* (*Unknown 1*) (Hu y col., 2009). Los resultados se analizaron con el programa LightCycler 480 (Roche, Basel, Suiza). Los niveles de transcripción relativos ($2^{-\Delta Ct}$) se calcularon como la diferencia

entre el ciclo umbral (Ct) del gen diana y el del gen de referencia para cada muestra (Arrivault y col., 2006).

2.13. AMPLIFICACIÓN DEL EXTREMO 5' DEL ADNc (5' RACE)

El ARN total aislado de las plantas de *G. max* fue utilizado para la amplificación del extremo 5' del ADNc (5'-RACE, *5'-Rapid Amplification of cDNA Ends*) utilizando el kit GeneRacer (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, EEUU) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Brevemente, el ARN total de las plantas de *G. max* tratado con ADNasa I fue desfosforilado, desprovisto de la caperuza 5' y ligado a un adaptador de ARN (GeneRacer RNA Oligo, 5' CGACUGGAGCACGAGGACACUGACAUGGACUGAAGGAGUAGAAA 3'), convertido en ADNc con el cebador GeneRacer_oligo_dT y amplificado por PCR utilizando el cebador GeneRacer_5' y un primer específico para el gen de interés (Tabla 8). Los productos de PCR se utilizaron para una nueva reacción de amplificación utilizando el cebador GeneRacer_5'Anidado y un primer específico anidado (Tabla 8). Los productos de PCR fueron purificados en gel de agarosa (apartados 2.5) y clonados en el vector pCR4 TOPO según las especificaciones del fabricante. 55 clones positivos por PCR en colonia (apartado 2.7) fueron secuenciados en el servicio de secuenciación de Colorado State University (Fort Collins, CO, EEUU) (apartado 2.9).

Tabla 8. Secuencias de los cebadores utilizados para la amplificación del extremo 5' del ADNc de los genes *GmPAA2-2*, *GmPAA2-1* y *GmPAA1*.

Gen	Código	Nombre cebador	Secuencia
<i>GmPAA2-2</i>	Glyma04g 05900	<i>GmPAA2-2_3'(1)RACE</i>	5' GACATTATCACGAGGCGAGGGCTGGC 3'
		<i>GmPAA2-2_3'(2)RACE</i>	5' GGCACCCACCGACAGAAACAGGATA 3'
		<i>GmPAA2-2_3'(3)RACE</i>	5' GCCGGGGTTAAGTAGAGAGAGTTC 3'
		<i>GmPAA2-2_3'Anidado</i>	5' CACCGGACAGAAACAGGATATGGTTC 3'
<i>GmPAA2-1</i>	Glyma06g 05890	<i>GmPAA2-1_3'RACE</i>	5' CCCAAGGAGTGGAAAATATGCGAAGCGT 3'
		<i>GmPAA2-1_3'Anidado</i>	5' CGGCTTCGACTCTTAACGACCAATTC 3'
<i>GmPAA1</i>	Glyma08g 07710	<i>GmPAA1_3'RACE</i>	5' CGCCGCACATCCCCACATACCATTC 3'
		<i>GmPAA1_3'Anidado</i>	5' CAGACTCACCGCCAGAACCGCCAC 3'
		GeneRacer_oligo_dT	5'GCTGTCAACGATACGCTACGTAACGGCATGA CAGTG(T) ₂₄ 3'
		GeneRacer_5'	5' CGACTGGAGCACGAGGACACTGA 3'
		GeneRacer_5'Anidado	5' GGACACTGACATGGACTGAAGGAGTA 3'

La representación gráfica de la estructura de los genes y los resultados de la 5'RACE se hizo utilizando la herramienta Exon-Intron Graphic Maker version 4 (Nikhil Bhatla, Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, MA, EEUU).

3. AISLAMIENTO Y ANÁLISIS DE PROTEÍNAS

3.1. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

La concentración de proteína se determinó de acuerdo con el método de Bradford (Bradford, 1976). Se utilizó una recta patrón con concentraciones conocidas de ABS disuelta en el tampón utilizado en cada caso.

3.2. ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA E INMUNODETECCIÓN

3.2.1. Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes

Las mezclas complejas de proteínas se separaron según su masa molecular mediante electroforesis en gel de poliacrilamida previamente desnaturalizadas con el detergente SDS (Laemmli, 1970). Se utilizó el sistema de electroforesis Miniprotean III (BioRad, Hercules, CA, EEUU). Los geles de poliacrilamida estaban compuestos por un gel concentrador del 4% (p/v) y un gel separador del 12-15% (p/v) de poliacrilamida (la composición detallada se muestra en la Tabla 9).

Tabla 9. Composición de los geles de poliacrilamida concentrador y separador. SDS, dodecil sulfato sódico; APS, persulfato amónico; TEMED, N,N,N',N'-tetrametiletilenodiamina.

Reactivo	Gel concentrador	Gel separador
Urea	-	4 M
Tris-HCl, pH 8,8	-	375 mM
Tris-HCl, pH 6,8	125 mM	-
SDS	0,1% (p/v)	0,1% (p/v)
Acrilamida:bis-acrilamida (29:1)	4% (p/v)	10-20% (p/v)
APS	0,02% (p/v)	0,01% (p/v)
TEMED	13,36 mM	3,34 mM

Las muestras procedentes de bacterias (apartados 3.3.1 y 3.3.3), levaduras (apartado 3.4) y plantas (apartados 3.5.1 y 3.5.3) fueron obtenidas por diferentes métodos según el objetivo. En los apartados 3.3.1, 3.3.3, 3.4, 3.5.1 y 3.5.3 se detalla la cantidad de proteína cargada y el tampón de carga utilizado en cada caso. Las muestras se cargaron en los pocillos

y la electroforesis se llevó a cabo a 120 V (voltaje constante) durante 2-3 h en tampón de electroforesis. Se utilizaron marcadores de masa molecular Mark12 Unstained Standard (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, EEUU), Prestained SDS-PAGE Standards Low Range (BioRad, Hercules, CA, EEUU), SeeBlue Plus2 Prestained Standards (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, EEUU) o PageRuler Prestained Protein Ladder (Fermentas, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EEUU) para la posterior estimación de la masa molecular de las proteínas de interés.

Tampones:

Tampón de electroforesis: 25 mM Tris-HCl, pH 8,3; 192 mM glicina; 0,1% (p/v) SDS.

3.2.2. Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones no desnaturizantes

La electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones no desnaturizantes se llevó a cabo de manera similar a la electroforesis desnaturizante (apartado 3.2.1), con la diferencia principal de que no se utilizaron los agentes desnaturizantes urea o SDS. Las muestras se obtuvieron y trataron como se detalla en el apartado 3.5.2. El tampón de electroforesis utilizado no contenía SDS.

Tabla 10. Composición de los geles de poliacrilamida concentrador y separador de geles no desnaturizantes. APS, persulfato amónico; TEMED, N,N,N',N'-tetrametiletlenodiamina.

Reactivo	Gel concentrador	Gel separador
Tris-HCl, pH 8,8	-	750 mM
Tris-HCl, pH 6,8	125 mM	-
Acrilamida:bis-acrilamida (29:1)	5% (p/v)	15% (p/v)
APS	0,1% (p/v)	0,1% (p/v)
TEMED	3,34 mM	4,67 mM

Tampones:

Tampón de electroforesis no desnaturizante: 25 mM Tris-HCl, pH 8,3; 192 mM glicina.

3.2.3. Detección de proteínas en geles de poliacrilamida con azul Coomassie

Una vez finalizada la electroforesis, los geles de poliacrilamida fueron teñidos con una solución de azul de Coomassie durante al menos 2 h y posteriormente desteñidos con solución de desteñido durante 20 min y guardados en agua destilada. Los geles desteñidos se escanearon en un escáner (EPSON Perfection 2400 PHOTO, Suwa, Japón).

Soluciones:

Solución de azul Coomassie: 0,025% (p/v) Coomassie Brilliant Blue R-250 (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EEUU); 45% (v/v) metanol; 6% (v/v) ácido acético.

Solución de desteñido: 10% (v/v) metanol; 30% (v/v) ácido acético.

3.2.4. Transferencia a membrana de nitrocelulosa o PVDF

Las proteínas separadas por electroforesis en gel de poliacrilamida fueron transferidas a membranas para la detección inmunológica con anticuerpos. La transferencia se optimizó según las características de las proteínas analizadas.

Se utilizaron membranas de nitrocelulosa (Trans-Blot Transfer Medium, BioRad, Hercules, CA, EEUU) o de polifluoruro de vinilideno (PVDF; Biotrace PVDF, Pall Corporation, Port Washington, NY, EEUU) de 0,45 µm. La membrana de PVDF se activó en 100% (v/v) metanol durante 1 min antes de su uso. Este paso no es necesario en el caso de las membranas de nitrocelulosa.

A continuación se situó la membrana junto al gel de poliacrilamida y se colocaron papeles cromatográficos (Whatman, GE Healthcare, Little Chalfont, Reino Unido) y esponjas a ambos lados. Se sumergió en tampón de transferencia y se mantuvo a 100 V (voltaje constante) durante 90 min o alternativamente a 15 V durante toda la noche. A continuación, se desensambló la carpeta de transferencia y se lavó la membrana con tampón TBS-T.

Tampones:

Tampón de transferencia: 25 mM Tris-HCl, pH 7,5; 192 mM glicina; 20% (v/v) metanol; con/sin 0,1% (p/v) SDS.

TBS-T: 25 mM Tris-HCl, pH 7,5; 0,9% (p/v) NaCl; 0,05% (v/v) Tween-20.

3.2.5. Detección de proteínas en membranas con rojo Ponceau

Tras la transferencia de las proteínas a la membrana, ésta se tiñó transitoriamente con una solución de tinte durante 1 min y se lavó repetidamente con agua destilada. Se fotografió la membrana con una cámara fotográfica y se destiñó lavando la membrana con solución de desteñido.

Soluciones:

Solución de tinte: 0,01% (p/v) rojo Ponceau S; 0,1% (v/v) ácido acético.

Solución de desteñido: 0,1 M NaOH.

3.2.6. Detección inmunológica de proteínas (western blot)

Una vez transferidas las proteínas a la membrana de nitrocelulosa o PVDF, ésta se bloqueó con tampón TBS-T con 3% (p/v) de leche desnatada en polvo durante al menos 1 h. Se utilizaron diferentes métodos de revelado según las características de los anticuerpos y las proteínas detectadas.

Los anticuerpos primarios utilizados fueron anti-*GmCCS* producido en conejo contra el péptido sintético CVPEDFLISAAVSEF en el dominio II de la proteína (Sagasti y col., 2011), anti-*GmPAA2_bucle* producido en conejo contra el péptido sintético HERFQTRANPSDLTN situado en el gran bucle citoplasmático de la proteína (Bernal y col., 2007), anti-*GmPAA2_N-terminal* producido en conejo contra el péptido sintético IEEEPASVAESLA situado en el extremo N-terminal, anti-*GmPAA2-2* producido en conejo contra el péptido sintético CLQDRREAKDSP del N-terminal (Abyntek, Derio, Bizkaia, España), anti-PC producido en conejo (Agriserá, Vannas, Suecia), anti-HA producido en ratón (Hemaglutinina, Clon HA-7, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EEUU) y anti-6xHis producido en ratón (Amersham Pharmacia Biotech, Amersham, Reino Unido). Las diluciones y métodos de revelado utilizados se detallan en la Tabla 11.

Método de revelado colorimétrico con fosfatasa alcalina. Se incubó la membrana con el anticuerpo primario desarrollado en conejo diluido en tampón TBS-T con 0,3% (p/v) leche en polvo durante 1 h. Se realizaron 5 lavados de 5 min con tampón TBS-T. Se incubó con el anticuerpo secundario anti-conejo conjugado con la enzima fosfatasa alcalina (Anti-Rabbit IgG whole molecule-Alkaline Phosphatase, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EEUU) diluido en TBS-T durante 1 h. Se realizaron 4 lavados con TBS-T, uno con TBS y uno con tampón AP durante 5 min. Se añadió el tampón AP con 0,28 mg ml⁻¹ nitroazul de tetrazolio (NBT, *Nitro Blue*

Tetrazolium) y $0,175 \text{ mg ml}^{-1}$ 5-bromo-4-cloro-indolilfosfato (BCIP), y la tinción se desarrolló en oscuridad durante unos 5 min. La reacción se paró lavando con agua destilada varias veces.

Tampones:

TBS: 25 mM Tris-HCl, pH 7,5; 0,9% (p/v) NaCl.

Tampón AP: 100 mM Tris-HCl, pH 9,5; 100 mM NaCl; 5 mM MgCl_2 .

Método de revelado colorimétrico con fosfatasa alcalina de alta sensibilidad. La membrana se incubó con el anticuerpo primario desarrollado en conejo diluido en TBS-T durante 90 min. Se realizaron 5 lavados con TBS-T de 5 min. Se incubó con el anticuerpo secundario anti-conejo conjugado con biotina (Goat Anti-Rabbit IgG (H+L)-BIOT, Southern Biotech, Birmingham, AL, EEUU) durante 90 min. Se lavó 5 veces con TBS-T durante 5 min. Se incubó con un complejo de estreptavidina-fosfatasa alcalina conjugada con biotina (Biotinylated Alkaline Phosphatase Conjugate, BioRad, Hercules, CA, EEUU) diluido en TBS-T durante 90 min. Se realizaron 5 lavados con TBS-T de 5 min. Se añadió el tampón de AP con $0,28 \text{ mg ml}^{-1}$ NBT y $0,175 \text{ mg ml}^{-1}$ BCIP y la tinción se desarrolló en oscuridad durante unos 5 min. Se paró la reacción lavando con agua destilada varias veces.

Método de revelado colorimétrico con peroxidasa. La membrana se incubó con el anticuerpo primario desarrollado en ratón disuelto en TBS con 0,1% (p/v) leche en polvo durante 1 h. Se lavó con TBS con 0,1% (p/v) leche en polvo 3 veces durante 10 min. Se incubó con el anticuerpo secundario contra ratón (Goat Anti-Mouse IgG (H+L)-HRP Conjugate, BioRad, Hercules, CA, EEUU) conjugado con peroxidasa de rábano (HRP, *HorseRadish Peroxidase*) diluido en TBS con 0,1% (p/v) leche en polvo durante 1 h. Se lavó 3 veces durante 10 min con TBS con 0,1% (p/v) leche en polvo. Se mezcló una solución de 25 ml de TBS y 0,06% H_2O_2 con una solución de 5 ml de metanol y 0,3% naftol, y se incubó la membrana con la mezcla durante unos minutos. Posteriormente se paró la reacción lavando la membrana con agua destilada.

Método de revelado quimioluminiscente con peroxidasa. La membrana se incubó con el anticuerpo primario desarrollado en conejo o ratón disuelto en TBS-T con 1% (p/v) leche en polvo durante 90 min. Se lavó con TBS-T 3 veces durante 15 min. Se incubó con el anticuerpo secundario contra conejo (Goat Anti-Rabbit IgG (H+L)-HRP Conjugate, BioRad, Hercules, CA, EEUU) o ratón (Goat Anti-Mouse IgG (H+L)-HRP Conjugate, BioRad, Hercules, CA, EEUU) conjugado con HRP diluido en TBS-T con 1% (p/v) leche en polvo durante 1 h. Se lavó 3 veces

con TBS-T durante 20 min cada vez. Se incubó con el reactivo SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific, Waltham, MA, EEUU) y se expuso una película fotográfica (CL-Xposure Blue X-Ray Film, Pierce, Thermo Scientific, Waltham, MA, EEUU) en una cámara oscura (Hypercassette, Amersham Biosciences, Buckinghamshire, Reino Unido). La película se reveló en solución reveladora (T-Max Professional, Kodak, Rochester, NY, EEUU) durante 3 min y se incubó en solución fijadora (Polymax RT, Kodak, Rochester, NY, EEUU) durante 2 min.

Tabla 11. Anticuerpos, organismos productores, diluciones y tipos de revelado utilizados para los análisis por western blot.

Anticuerpo contra	Primario/ Secundario	Huésped	Dilución	Revelado
GmCCS	Primario	Conejo	1:150	Fosfatasa alcalina alta sensibilidad
GmPAA2_bucle	Primario	Conejo	1:200	Fosfatasa alcalina alta sensibilidad, Peroxidasa quimioluminiscente
GmPAA2_N-terminal	Primario	Conejo	1:200	Fosfatasa alcalina alta sensibilidad, Peroxidasa quimioluminiscente
GmPAA2-2	Primario	Conejo	1:1000	Fosfatasa alcalina alta sensibilidad
PC	Primario	Conejo	1:2000	Fosfatasa alcalina
HA	Primario	Ratón	1:10000	Peroxidasa quimioluminiscente
6xHis	Primario	Ratón	1:3000	Peroxidasa colorimétrico
IgG conejo	Secundario	Cabra	1:25000	Peroxidasa colorimétrico y quimioluminiscente
IgG conejo	Secundario	Cabra	1:10000	Fosfatasa alcalina alta sensibilidad
IgG conejo	Secundario	Cabra	1:10000	Fosfatasa alcalina
IgG ratón	Secundario	Cabra	1:1000	Peroxidasa colorimétrico y quimioluminiscente

3.3. ESTUDIO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES

3.3.1. Sobreexpresión piloto de proteínas en *E. coli*

Las condiciones óptimas de sobreexpresión de las proteínas se determinaron mediante pruebas a escala piloto. Las bacterias de la cepa LMG194 fueron transformadas con las construcciones pBAD TOPO-*GmPAA2-2*, pBAD TOPO-*GmPAA2-1* o pBAD TOPO-

GmCCS (Figura 2) y se cultivaron en placa durante la noche a 37 °C. Se inoculó un cultivo de 25 ml de LB/ampicilina (100 µg ml⁻¹) con una colonia individual y se cultivó hasta que la absorbancia a 600 nm alcanzó un valor de 0,5 en cubetas de 1 cm de paso de luz. A continuación se indujo la expresión de las proteínas recombinantes mediante la adición de diferentes concentraciones de L-arabinosa (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, EEUU). Se probaron 0,00002%, 0,0002%, 0,002%, 0,1%, 0,2% (p/v) de L-arabinosa. También se probó la adición de 0,5 mM CuSO₄ y la incubación a diferentes temperaturas (30 °C y 37 °C). Tras la inducción, se cultivaron las células durante 4-19 h. Se tomó 1 ml de muestra para su análisis y se centrifugó a 12000 x g durante 2 min. El sedimento se resuspendió en 80 µl de tampón de carga I 4X, se desnaturalizó a 95 °C durante 5 min y se centrifugó brevemente a 12000 x g. Las muestras fueron analizadas por western blot con los anticuerpos correspondientes (apartado 3.2.6). Como control negativo se utilizaron las bacterias sin transformar, así como las bacterias transformadas sin adición de inductor.

La sobreexpresión piloto de la proteína *GmPAA2-2* fue realizada por la Lda. Patricia Lorente y la Dra. María de los Ángeles Luján en nuestro laboratorio.

Tampones:

Tampón de carga I (4X): 2% (p/v) SDS; 62 mM Tris-HCl, pH 6,8; 30% (p/v) glicerol; 80 mM DTT; 0,2% (p/v) azul de bromofenol.

3.3.2. Sobreexpresión de *GmCCS* recombinante en *E. coli*

Una vez establecidas las mejores condiciones de sobreexpresión de *GmCCS* en *E. coli* LMG194, se procedió al escalado. Se transformaron las bacterias con la construcción pBAD TOPO-*GmCCS* y se cultivaron durante la noche a 37 °C. Se inoculó un cultivo de 75 ml de medio LB líquido con 100 µg ml⁻¹ ampicilina y se cultivó durante la noche a 37 °C con agitación. Se inoculó un cultivo de 250 ml de LB/ampicilina con 9 ml del cultivo previo y se creció hasta que la absorbancia a 600 nm alcanzó 0,6 en cubetas de 1 cm de paso de luz. Se añadió 0,1% (p/v) L-arabinosa y se cultivó durante 4 h. Las células se recogieron por centrifugación a 10000 x g durante 10 min a 4 °C y se guardaron a -20 °C hasta su utilización.

3.3.3. Purificación de *GmCCS* recombinante

Las células procedentes de 2 cultivos de 250 ml cada uno fueron resuspendidas en 40 ml de tampón de proteínas I. Las bacterias se rompieron por sonicación en un Ultrasonic Processor XL2020 Minsonix (Farmingdale, NY, EEUU) durante 12 min en pulsos de 1 min con 1 min de descanso entre ellos al 20% de potencia del aparato. Los tubos con las muestras se

mantuvieron en hielo para evitar el sobrecalentamiento. Las muestras se centrifugaron a 10000 x g durante 30 min a 4 °C y el sobrenadante se centrifugó de nuevo a 10000 x g durante 10 min a 4 °C. El sobrenadante resultante se cargó en la columna HiTrap IMAC HP 5 ml (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) previamente cargada con CoCl_2 (Co^{2+} -IMAC). La columna se lavó con 25 ml de tampón de proteínas I y con 50 ml de tampón I con 50 mM imidazol a un flujo de 1 ml min^{-1} . A continuación, se aplicó un gradiente de 50-450 mM imidazol en tampón de proteínas I a un flujo de 0,5 ml min^{-1} y se recogieron fracciones de aproximadamente 1 ml en las que se encontraba la proteína recombinante *GmCCS*. El tampón de proteínas I fue cambiado por tampón de proteínas II utilizando un tubo Amicon Ultra 10000 MWCO (Merck Millipore, Darmstadt, Alemania).

La purificación se siguió mediante SDS-PAGE y tinción con azul Coomassie (apartados 3.2.1 y 3.2.3). Para ello, se tomaron muestras de 10 μl de las diferentes fracciones de la purificación, se les añadió tampón de carga I (apartado 3.3.1) y se desnaturalizaron a 95 °C durante 5 min. La concentración de proteína purificada fue determinada por el método de Bradford (apartado 3.1) y la pureza fue estimada por SDS-PAGE (apartado 3.2.1).

Tampones:

Tampón de proteínas I: 20 mM tampón fosfato sódico, pH 7,4; 500 mM NaCl; 1 mM PMSF.

Tampón de proteínas II: 100 mM MES, pH 6,0; 100 mM NaCl.

3.3.4. Determinación del contenido de Cu en *GmCCS* recombinante purificada

La cantidad de Cu unido a *GmCCS* recombinante así obtenida fue determinada utilizando un método cuantitativo con ácido bicinconínico (BCA) (Brenner y Harris, 1995). Para ello, se utilizaron 55 μl de muestra de proteína purificada (5-20 μM), a la que se le añadieron 18,4 μl de reactivo A y se agitó vigorosamente. Se centrifugó durante 5 min a temperatura ambiente a 12000 x g y se transfirieron 66 μl a un tubo de 1,5 ml nuevo. Se añadieron 5 μl de reactivo B fresco y se agitó vigorosamente. Se añadieron 29 μl de reactivo C y se mezcló vigorosamente nuevamente. Se incubó durante 5 min a temperatura ambiente y se midió la absorbancia a 360 nm en un espectrofotómetro (Beckman Instruments DU640, Fullerton, CA EEUU). Se realizó una recta patrón con 0,45, 0,9 y 1,8 mM Cu por triplicado.

Soluciones:

Reactivo A: 30% (p/v) ácido tricloroacético (TCA).

Reactivo B: 0,07% (p/v) ácido ascórbico.

Reactivo C: 0,012% (p/v) BCA; 7,2% (p/v) NaOH; 31,2% (p/v) HEPES ácido.

3.3.5. Carga de Cu⁺ de GmCCS recombinante

La carga de Cu⁺ de la proteína recombinante GmCCS se llevó a cabo mediante la incubación de la proteína con un exceso 6-10 veces molar de CuSO₄ en tampón de proteínas II (apartado 3.3.3) con 10 mM ácido ascórbico durante 10 min a temperatura ambiente con agitación suave.

3.3.6. Calorimetría isotérmica de titulación (ITC)

La calorimetría isotérmica de titulación (ITC, *Isothermal Titration Calorimetry*) se utilizó para estudiar la interacción entre GmCCS y Cu⁺. Los análisis de ITC se llevaron a cabo utilizando un instrumento Auto-ITC200 (MicroCal, GE Healthcare, Uppsala, Sweden). Los experimentos consistieron en inyecciones de 2 µl de 600 µM CuSO₄ en tampón de proteínas II (apartado 3.3.3) con 10 mM ácido ascórbico, en la célula de la muestra, que contenía inicialmente 35 µM de proteína en tampón de proteínas II con 10 mM ácido ascórbico. La velocidad de agitación fue de 1000 rpm para conseguir una solución homogénea rápidamente. Los experimentos se realizaron a 25 °C y 30 °C. El calor por inyección normalizado por mol de inyectante vs el ratio molar fue analizado mediante el software Origin 7 (OriginLab, Northampton, MA, EEUU) utilizando un modelo de dos sitios de unión.

3.3.7. Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

La estabilidad térmica de la proteína fue determinada por calorimetría diferencial de barrido (DSC, *Differential Scanning Calorimetry*) utilizando un microcalorímetro VP-DSC (MicroCal, Northampton, MA, EEUU). La línea base del instrumento fue grabada antes de los experimentos, con ambas células llenas con tampón de proteínas II (apartado 3.3.3). Todas las muestras de proteína y tampones fueron desgasificados y cargados en las células evitando la formación de burbujas. Los escáneres de desnaturalización térmica se llevaron a cabo a razón de 1 °C min⁻¹ desde 10 °C hasta 95 °C. Se utilizaron 20 µM de apo-GmCCS en tampón de proteínas II y 20 µM de GmCCS cargada con un exceso molar equivalente a 6 veces de Cu en tampón de proteínas II con 10 mM ácido ascórbico (apartado 3.3.5).

3.3.8. Cromatografía de exclusión molecular

La cromatografía de exclusión molecular se llevó a cabo en un aparato FPLC (*Fast Protein Liquid Chromatography*) en un sistema AKTA (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) a temperatura ambiente. 30 μM de apo-*GmCCS* o alternativamente 30 μM de Cu^+ -*GmCCS* cargada con un exceso 10 veces molar de Cu^+ (apartado 3.3.5) en tampón de proteínas II (apartado 3.3.3), fueron cargadas en una columna Superdex 200 HR 10/30 (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) equilibrada con el mismo tampón. La determinación de la masa molecular fue calculada utilizando marcadores estándar.

3.4. EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS DE LEVADURAS

Para la preparación de extractos crudos de proteínas de levaduras se siguió un protocolo de lisis anteriormente descrito (Braun y col., 2002) y modificado (O'Quin y col., 2010). Se inoculó con una colonia individual un cultivo previo de 10 ml de medio YPD y se cultivó durante la noche a 30 °C con agitación. Se midió la absorbancia a 600 nm y se recogió el volumen equivalente a 3×10^7 células (5 ml de cultivo de $A_{600\text{nm}} = 1$ en una cubeta de 1 cm de paso de luz) por centrifugación a 5000 x g durante 2 min. El sedimento se lavó con 1 ml de agua destilada y se resuspendió en 240 μl de tampón de resuspensión. Se añadieron 60 μl de tampón de lisis y las muestras se incubaron en hielo 10 min. Se añadieron 40 μl de 100% (p/v) TCA y se mezclaron vigorosamente. Se mantuvieron a -20 °C durante 30 min y se centrifugaron a 12000 x g durante 30 min a 4 °C. El precipitado se lavó con 500 μl de acetona y se centrifugó a 12000 x g durante 30 min a 4 °C. El precipitado se dejó secar al aire durante 10-15 min y se resuspendió en 100 μl de tampón de carga II. Las muestras se incubaron a 45 °C durante 15 min y se sometieron a SDS-PAGE y western blot (apartado 3.2.1 y 3.2.6).

Tampones:

Tampón de resuspensión: 50 mM Tris-HCl, pH 8,0.

Tapón de lisis: 1,25 M NaOH; 5% (v/v) β -mercaptoetanol.

Tampón de carga II: 62 mM Tris-HCl, pH 6,8; 8% (p/v) SDS; 10% (p/v) glicerol; 0,08% (p/v) azul de bromofenol; 5% (v/v) β -mercaptoetanol.

3.5. EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS DE PLANTAS

3.5.1. Extracción de proteínas de plantas para electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones no desnaturalizantes

La extracción de proteínas de plantas se llevó a cabo según el protocolo descrito por Bowler (Bowler y col., 1989) modificado por Shikanai (Shikanai y col., 2003). Las hojas de *A. thaliana* y *G. max* se molieron en frío (N₂ líquido) en un mortero o un molino de bolas, dependiendo del tamaño de éstas. Se pesaron y se añadió el mismo volumen de tampón de extracción de proteínas frío y se agitaron vigorosamente durante 2 min. Se centrifugaron a 12000 x g durante 10 min a 4 °C, el sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo, se centrifugó de nuevo en las mismas condiciones y se recuperó el sobrenadante. Se estimó la concentración de proteína por el método de Bradford (apartado 3.1) y se prepararon las muestras con 20 µg de proteína en un volumen de 10 µl con tampón de carga nativo.

Tampones:

Tampón de extracción de proteínas: 50 mM tampón fosfato sódico, pH 7,4; 0,1% (p/v) ácido ascórbico; 0,2% (v/v) Triton X-100; 0,05% (v/v) β-mercaptoetanol.

Tampón de carga nativo (4X): 250 mM Tris-HCl, pH 6,8; 40% (p/v) glicerol; 0,04% (p/v) azul de bromofenol.

3.5.2. Fraccionamiento subcelular de *G. max*

Varios métodos de aislamiento de cloroplastos y fracciones subcelulares fueron probados en este trabajo. El método de elección fue una modificación de uno descrito anteriormente (Alfonso, 1994). Se recogieron y lavaron 15 g de hojas de *G. max* y se batieron en tampón B1 con una batidora de vaso. Se agitó durante 10 min a 4 °C en oscuridad para favorecer la liberación de los cloroplastos retenidos entre los restos celulares y se centrifugó a 200 x g durante 2 min a 4 °C. El sobrenadante se reservó, el sedimento se resuspendió en 20 ml de tampón B1 y se centrifugó a 200 x g durante 2 min a 4 °C. El sedimento (trozos grandes, etc.) se descartó y se juntaron los sobrenadantes de ambas centrifugaciones, que se centrifugaron a 12000 x g durante 10 min a 4 °C. El sobrenadante se descartó y el sedimento resultante (cloroplastos) se resuspendió en 10 ml de tampón de choque osmótico B2 y se centrifugó a 12000 x g durante 10 min a 4 °C. El sedimento, formado principalmente por tilacoides, se resuspendió en tampón B3 y el sobrenadante se concentró utilizando tubos Amicon Ultra 10000 MWCO. Se estimó la concentración de proteína por el método de Bradford (apartado 3.1), para ello 15 µg de proteína se mezclaron con tampón de carga III, se incubaron

a 95 °C durante 5 min y posteriormente a temperatura ambiente durante 5 min. Se separaron las proteínas por SDS-PAGE y se estudiaron por western blot con anticuerpos anti-*GmPAA2-2* (apartado 3.2.1 y 3.2.6).

Tampones utilizados:

Tampón B1: 0,4 M NaCl; 2 mM MgCl₂; 20 mM Tricina, pH 8,0; 0,2% (p/v) sacarosa.

Tampón B2: 150 mM NaCl; 5 mM MgCl₂; 20 mM Tricina, pH 8,0.

Tampón B3: 15 mM NaCl; 5 mM MgCl₂; 50 mM MES, pH 6,0; 400 mM sacarosa.

Tampón de carga III (2X): 250 mM Tris-HCl, pH 6,8; 20% (p/v) glicerol; 4% (p/v) SDS; 0,1% (p/v) azul de bromofenol; 80 mM DTT.

3.6. ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD SUPERÓXIDO DISMUTASA

Las proteínas vegetales fueron extraídas según el apartado 3.5.1. Las muestras se sometieron a electroforesis en gel de 15% (p/v) poliacrilamida en condiciones no desnaturalizante (apartado 3.2.2) en oscuridad a 4 °C. La electroforesis se llevó a cabo por triplicado. Los siguientes pasos del protocolo se realizaron en una campana de extracción de gases en oscuridad y con agitación. Los geles fueron teñidos de acuerdo con el protocolo descrito (Beauchamp y Fridovich, 1971). Para ello, los 3 geles se incubaron con solución de NTB durante 20 min. Posteriormente, uno de los geles se incubó en solución sin inhibidores, el segundo gel se incubó en la misma solución más el inhibidor de la Cu/ZnSOD (1 mM KCN) y el tercer gel se incubó en la solución más el inhibidor de la Cu/ZnSOD y FeSOD (3 mM H₂O₂) durante 20 min. Tras esta incubación, los geles se lavaron con agua destilada y se expusieron a la luz durante al menos 10 min. Los geles fueron escaneados en un escáner (EPSON Perfection 2400 PHOTO, Suwa, Japón).

Tampones:

Solución de NBT: 1 mg ml⁻¹ NBT.

Solución sin inhibidores: 36 mM tampón fosfato potásico, pH 7,8; 28 μM riboflavina; 0,32% (v/v) TEMED.

3.7. REPRESENTACIÓN GRÁFICA DE PROTEÍNAS

La representación gráfica de las proteínas según su estructura secundaria (*cartoon*) se realizó con la herramienta de visualización molecular RasMol 2.7.3 (basado en RasMol 2.6, Sayle R, Biomolecular Structures Group, Hertfordshire, Reino Unido) y obteniendo los datos, depositados por sus respectivos autores, del banco de datos Protein Data Bank (Berman y col., 2000).

4. TÉCNICAS PARA EL ESTUDIO DE LAS PLANTAS

4.1. DETERMINACIÓN DEL PESO FRESCO

Las medidas de peso fresco se determinaron con una balanza de precisión. Se separaron los diferentes órganos de las plantas con un bisturí, evitando el daño innecesario.

4.2. ANÁLISIS DE LA FLUORESCENCIA DE LA CLOROFILA

El análisis de la fluorescencia de la clorofila se llevó a cabo con un fluorímetro Hansatech FMS (Fluorescence Monitoring System, Hansatech, Naborough, Reino Unido) o FluorCam 701MF (Photon Systems Instruments, Brno, República Checa). Los datos fueron analizados con el programa FluorCam 701MF version 5 (Photon Systems Instruments, Brno, República Checa).

El rendimiento cuántico del fotosistema II (Φ_{PSII}), indicativo de la eficiencia fotoquímica del fotosistema II, fue calculada como $(F'_m - F_t)/F'_m$ (F'_m , fluorescencia máxima en la luz; F_t , fluorescencia en estado estacionario previa a un pulso de luz saturante) (Genty y col., 1989). La proporción de centros de reacción del PSII cerrados ($1 - qP$), indicador del estado de oxidación de las quinonas aceptoras del PSII, fue calculada como $1 - [(F'_m - F_t)/(F'_m - F'_o)]$ (F'_o , fluorescencia mínima emitida después de que, primero, se apague la luz actínica y, después, se dé un pulso de luz del rojo lejano) (Schreiber y col., 1986).

4.3. ESPECTROMETRÍA DE EMISIÓN ATÓMICA DE PLASMA ACOPLADO INDUCTIVAMENTE (ICP-AES)

La cantidad de los diferentes elementos en los tejidos de las plantas se determinó utilizando la técnica de ICP-AES (espectrometría de emisión atómica de plasma acoplado inductivamente). Se procedió a la desorción de los metales de las raíces de las plantas utilizando el protocolo descrito (Cailliatte y col., 2010). Las raíces se incubaron en solución de desorción I fría durante 10 min, se transfirieron a solución de desorción II fría, se lavaron 2

veces con agua ultrapura y se secaron con papel. En el caso de las hojas, se lavaron con agua ultrapura y se secaron con papel. Posteriormente, los tejidos vegetales se secaron a 60 °C durante al menos 3 días.

Una vez las muestras estuvieron secas, se pesaron alrededor de 20 mg de material vegetal molido, se añadieron 2 ml de 65% (p/v) HNO₃, se mantuvieron 1 h a 80 °C y 90 min a 120 °C, se dejaron enfriar, se añadió 1 ml de 30% (v/v) H₂O₂, se incubaron a temperatura ambiente 30 min, a 60 °C 30 min y a 100 °C 30 min. Las muestras se diluyeron hasta 10 ml con agua ultrapura y se analizaron por ICP-AES (IRIS Advantage HX Duo, Thermo-Fisher, Dreieich, Alemania).

Soluciones:

Solución de desorción I: 2 mM CaSO₄; 10 mM Na₂EDTA; 1 mM MES, pH 5,7.

Solución de desorción II: 0,3 mM batofenantrolina disulfonato; 5,7 mM ditionito sódico.

4.4. TINCIÓN HISTOQUÍMICA DE PLANTAS TRANSGÉNICAS QUE EXPRESAN β -GLUCURONIDASA

El gen bacteriano *gusA*, que codifica para la enzima β -glucuronidasa (GUS), se ha empleado ampliamente como gen marcador en plantas. Se utilizó el protocolo descrito (Vitha y col., 1995). La actividad GUS fue analizada sumergiendo los tejidos en tampón de tinción frío y se infiltraron en vacío durante unos 5 min. Se incubaron a 37 °C durante 1 h y se transfirieron a 70% (v/v) etanol hasta su uso. Los tejidos se fotografiaron.

Tampones:

Tampón de tinción: 2 mM hexacianoferrato (II) de potasio; 2 mM hexacianoferrato (III) de potasio; 0,2% (p/v) Triton X-100; 50 mM tampón fosfato sódico, pH 7,2; 2 mM 5-bromo-4-cloro-3-indolil β -D-glucuronido sódico.

4.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados corresponden con la media aritmética \pm la desviación estándar de los datos. En cada apartado se detalla el número de muestras tomadas. Para la comparación de tratamientos o tejidos se aplicó un análisis de la varianza (ANOVA) que se realizó con el programa Minitab 17 (Minitab SARL, París) con un nivel de significancia del 0,05.

RESULTADOS

RESULTADOS

1. CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL, LOCALIZACIÓN Y REGULACIÓN DE PAA2

1.1. CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE *GmPAA2*

El transportador de Cu PAA2 está representado por dos genes en la planta *G. max* (Bernal, 2006), *GmPAA2-1* en el cromosoma 6 y *GmPAA2-2* en el cromosoma 4; y un solo gen en *A. thaliana* (Abdel-Ghany y col., 2005b). El gen de *A. thaliana* *AtPAA2* comparte un 69,02% de identidad con el gen *GmPAA2-1* y un 56,88% con *GmPAA2-2*. A su vez, los genes de *G. max* *GmPAA2-1* y *GmPAA2-2* tienen un 77,73% de identidad entre sí. Estos genes están compuestos por 17 y 12 exones, respectivamente (Figura 1). Las secuencias de estos genes, mostradas en la Figura 2, se obtuvieron de forma experimental (apartado 2.6 de Materiales y Métodos). También fue posible la detección de una forma de procesamiento alternativo del gen *GmPAA2-1* que retiene 7 pb de la parte final del intrón 4, a la que se denominó *GmPAA2-1T* (*GmPAA2-1* truncado). Esta inserción produce un cambio en el marco de lectura que origina un codón de stop que produciría el truncamiento de la proteína (Figura 2). Por otra parte, la secuencia codificante del gen *GmPAA2-2* retiene un teórico primer intrón que produce un cambio en el marco de lectura y el posterior truncamiento de la hipotética proteína.

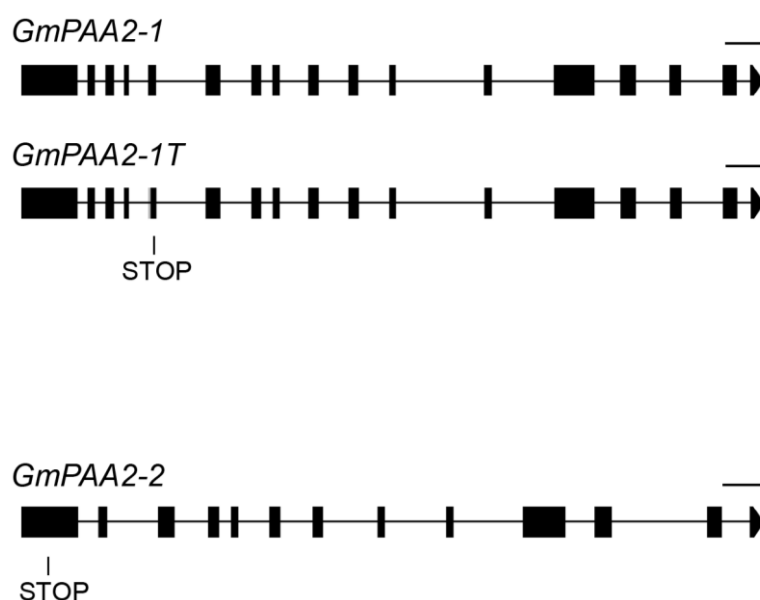


Figura 1. Esquema de los genes *GmPAA2-1* (Glyma06g05890), *GmPAA2-2* (Glyma04g05900) y de la forma de procesamiento alternativo *GmPAA2-1T*. Los recuadros negros representan los exones y las líneas los intrones. Los codones STOP están señalados. Las barras de escala corresponden a 500 pb.

AtPAA2 ATGCGCGCAATCTCTCCGATTCCTCTCCCTCCGCAATGAG-----TTCTCA--TTTCGTCBAATAG-----TTCTCTGTGAACCGA 81
 GmPAA2-1 ATGCGCTACTCATCTTTTCAGACTCTCTCTCTTCCGCAACCCAGCTCTCTTCAATACACCCCTAATCAGCACTCCACTTCATTCTCTCTGCCCCG 100
 GmPAA2-2 ATGCGCTACTCATCTTTTCAGACTCTCTCTCTTCCGCAACCCAGCTCTCTTCAATACACCCCTAATCAGCACTCCACTTCATTCTCTCTGCCCCG 100
 GmPAA2-2 ATGCGCTACTCATCTTTTCAGACTCTCTCTCTTCCGCAACCCAGCTCTCTTCAATACACCCCTAATCAGCACTCCACTTCATTCTCTCTGCCCCG 100

AtPAA2 TGCTTTCCAGACTGCGCCCTTCTCGTATCCGCGGCACTG-----TTCCGCACTTTTTTTTTTATTTCAACTCGGTCGCAATAGTACTCAATCAT 175
 GmPAA2-1 -----CAAAACGACATCCACCCCGAAACCCGCACTGCTCGAATCTCTCCGCAACCCGCTCTCTGTTCGAACTCTCTCGGCAACCGGATTTGGCTCCG 193
 GmPAA2-2 -----CAAAACGACATCCACCCCGAAACCCGCACTGCTCGAATCTCTCCGCAACCCGCTCTCTGTTCGAACTCTCTCGGCAACCGGATTTGGCTCCG 193
 GmPAA2-2 -----CAAAACGACATCCACCCCGAAACCCGCACTGCTCGAATCTCTCCGCAACCCGCTCTCTGTTCGAACTCTCTCGGCAACCGGATTTGGCTCCG 193

AtPAA2 TTGAACTACTCAATCTTCAATCGAATCTTGAATCCATTAAGGACACCGCTTATCTCTCTCGATCTCAGTGGATGATGTTGGTGGCTGGCTCCG 275
 GmPAA2-1 CGGAATTTTTCT-CTCCTTCAA--AGCAGGAGAG-----GGCCAAAGACTCCGCGGTTCTCTGCACTCACCGAATGATGTTGGTGGCTGGCTCCG 284
 GmPAA2-2 CGGAATTTTTCT-CTCCTTCAA--AGCAGGAGAG-----GGCCAAAGACTCCGCGGTTCTCTGCACTCACCGAATGATGTTGGTGGCTGGCTCCG 284
 GmPAA2-2 CGGAATTTTTCT-CTCCTTCAA--AGCAGGAGAG-----GGCCAAAGACTCCGCGGTTCTCTGCACTCACCGAATGATGTTGGTGGCTGGCTCCG 284

AtPAA2 CCGACTTAAATCGGTTTGTATGTCAGTGTCTGAGTCGCGCTCTGCTG--TGGTAACTATGCTGACTGAAACCGCGGCTGTAAGTTTAAACCGGAGCTTG 373
 GmPAA2-1 CCGACTTAAAAACACCTCTCCGCAAGCCAGGTTGACTGCTGCTG--TGGTAACTATGCTGACTGAAACCGCGGCTGTAAGTTTAAACCGGAGCTTG 382
 GmPAA2-2 CCGACTTAAAAACACCTCTCCGCAAGCCAGGTTGACTGCTGCTG--TGGTAACTATGCTGACTGAAACCGCGGCTGTAAGTTTAAACCGGAGCTTG 382
 GmPAA2-2 CCGGCTCAAAA-----ACTGTAAAGTACTCCACATCCGCTGTAATTAAGTAAACATGATAGT----- 342

AtPAA2 AGGTGACGGGCGATACGGCAAGACTTTAGCTAAGAGATTGACAGAGAGTGTTTTGAAGCTAAGAAGGAGAGTCTCGG--GATGGGACTGGCGGAGAT 471
 GmPAA2-1 AGGAACCGGGAGGCTCGCGCAAGCCCTCTGAGCTGAGCCGATTTCCGCAAGAGGAGGGCTCGA--GCTCGGGACTGACGGAAAC 480
 GmPAA2-2 AGGAACCGGGAGGCTCGCGCAAGCCCTCTGAGCTGAGCCGATTTCCGCAAGAGGAGGGCTCGA--GCTCGGGACTGACGGAAAC 480
 GmPAA2-2 -----GCTTATATGCTGGG-----TAGACACCCCTTATGATTT-----TAAGGGG--CCTTCGGATCCCTGGCTTACATATAAAT 417

AtPAA2 GTGACAAAGTGAAGCGATGGTAACTAAGAAAGAGGACTTGGT--TTTAAAGACGAGGACCGCTGTTGGCTGGGACTTGGTGGCTTGTGTGGG 571
 GmPAA2-1 GTGACAAAGTGAAGCGATGGTAAAGAAAGAGGACTTGGT--TTTAAAGACGAGGACCGCTGTTGGCTGGGACTTGGTGGCTTGTGTGGG 580
 GmPAA2-2 GTGACAAAGTGAAGCGATGGTAAAGAAAGAGGACTTGGT--TTTAAAGACGAGGACCGCTGTTGGCTGGGACTTGGTGGCTTGTGTGGG 580
 GmPAA2-2 T-----AATAAGGTA-----TCAGAACCATATCTTCTGT-----CCGGTGG--GCTCCGCG 466

AtPAA2 GGTCACACCTTCGCATATTTCACTCCTTGGGATTCACATTTGCTCATGGAAGGATTTGGGATTTGCTACACACTCTTACCTGAAAGGTTGGTGGG 671
 GmPAA2-1 GATCCACAGCTTCGCATATTTCACTCCTTGGGATTCACATTTGCTCATGGAAGGATTTGGGATTTGCTACACACTCTTACCTGAAAGGTTGGTGGG 680
 GmPAA2-2 GATCCACAGCTTCGCATATTTCACTCCTTGGGATTCACATTTGCTCATGGAAGGATTTGGGATTTGCTACACACTCTTACCTGAAAGGTTGGTGGG 680
 GmPAA2-2 ACCGCTCCGCTCGT-----GATTAAGTGGG-----GATTAAGTGGG-----GATTAAGTGGG-----GATTAAGTGGG-----GATTAAGTGGG 491

AtPAA2 CCHTGGAGCTTTGTTGGGACCGAGAGACTTCTGTTTGGATGGCTAAAGGCTTTCCGGAAGAAATCCCTAATATGAAGCTTGAATTTGGATTTGGG 771
 GmPAA2-1 TTTGGGCTCTCTATTGGGACCGAGAGACTTCTGTTTGGATGGCTAAAGGCTTTCCGGAAGAAATCCCTAATATGAAGCTTGAATTTGGATTTGGG 780
 GmPAA2-2 TTTGGGCTCTCTATTGGGACCGAGAGACTTCTGTTTGGATGGCTAAAGGCTTTCCGGAAGAAATCCCTAATATGAAGCTTGAATTTGGATTTGGG 780
 GmPAA2-2 -----AGATTAATTTTGGATGGCTAAAGGCTTTCCGGAAGAAATCCCTAATATGAAGCTTGAATTTGGATTTGGG----- 551

AtPAA2 TCCATCGCTCCATTTTCATCACTTGTATCTCACTAATTAACCAAGACTTCCGAGACTGCGGATGCGGATGCGGATGCGGATGCGGATGCGGATGCGG 863
 GmPAA2-1 TCCATCGCTCCATTTTCATCACTTGTATCTCACTAATTAACCAAGACTTCCGAGACTGCGGATGCGGATGCGGATGCGGATGCGGATGCGGATGCGG 872
 GmPAA2-2 TCCATCGCTCCATTTTCATCACTTGTATCTCACTAATTAACCAAGACTTCCGAGACTGCGGATGCGGATGCGGATGCGGATGCGGATGCGGATGCGG 879
 GmPAA2-2 -----CTACATTAACCCCGGCTGGGATGCGATCTTCTTTGATGAAC-----TGTCACTTCT 611

AtPAA2 TGGCTTTGTGCTCCTTGGGCGTTCTTGGAGAAAGSAAACCTTCAAGCATCTACCGATATGAATGAAGTATCTCAGCTCATCTCAGCTCAATCAAGA 963
 GmPAA2-1 TGGTCTTGTGCTCCTTGGGCGTTCTTGGAGAAAGSAAACCTTCAAGCATCTACCGATATGAATGAAGTATCTCAGCTCATCTCAGCTCAATCAAGA 972
 GmPAA2-2 TGGTCTTGTGCTCCTTGGGCGTTCTTGGAGAAAGSAAACCTTCAAGCATCTACCGATATGAATGAAGTATCTCAGCTCATCTCAGCTCAATCAAGA 979
 GmPAA2-2 TGGTCTTGTGCTCCTTGGGCGTTCTTGGAGAAAGSAAACCTTCAAGCATCTACCGATATGAATGAAGTATCTCAGCTCATCTCAGCTCAATCAAGA 711

AtPAA2 CTTGCTACTTACTTCAAGCAATTAACCCAGTGGATTTCTGATCTTCTCTGATCAATTTGCAATCAATGTTCACTGATGATATCCGAGTTGGG 1063
 GmPAA2-1 CTTGCTACTTACTTCAAGCAATTAACCCAGTGGATTTCTGATCTTCTCTGATCAATTTGCAATCAATGTTCACTGATGATATCCGAGTTGGG 1072
 GmPAA2-2 CTTGCTACTTACTTCAAGCAATTAACCCAGTGGATTTCTGATCTTCTCTGATCAATTTGCAATCAATGTTCACTGATGATATCCGAGTTGGG 1079
 GmPAA2-2 CTTGCTACTTACTTCAAGCAATTAACCCAGTGGATTTCTGATCTTCTCTGATCAATTTGCAATCAATGTTCACTGATGATATCCGAGTTGGG 811

AtPAA2 ACTCGCTATTGGTTTGGCTGGGCAAGACTTCCCTCTGATGGAGTCTGCTAGCTGGAAGAAGTGTATAGATGAATCATGCTACAGGCACTCACT 1163
 GmPAA2-1 ACTCGCTATTGGTTTGGCTGGGCAAGACTTCCCTCTGATGGAGTCTGCTAGCTGGAAGAAGTGTATAGATGAATCATGCTACAGGCACTCACT 1172
 GmPAA2-2 ACTCGCTATTGGTTTGGCTGGGCAAGACTTCCCTCTGATGGAGTCTGCTAGCTGGAAGAAGTGTATAGATGAATCATGCTACAGGCACTCACT 1179
 GmPAA2-2 ACTCGCTATTGGTTTGGCTGGGCAAGACTTCCCTCTGATGGAGTCTGCTAGCTGGAAGAAGTGTATAGATGAATCATGCTACAGGCACTCACT 911

AtPAA2 TCCGCTTTTAAAGAGAGAGGCTGCTCAGTTTCCAGCGGCAATTAACCTGGGATGGCCCTCTACGGATCAAGCTTCTTCACTGGTTCACAGTCAAGC 1263
 GmPAA2-1 TCCGCTTTTAAAGAGAGAGGCTGCTCAGTTTCCAGCGGCAATTAACCTGGGATGGCCCTCTACGGATCAAGCTTCTTCACTGGTTCACAGTCAAGC 1272
 GmPAA2-2 TCCGCTTTTAAAGAGAGAGGCTGCTCAGTTTCCAGCGGCAATTAACCTGGGATGGCCCTCTACGGATCAAGCTTCTTCACTGGTTCACAGTCAAGC 1279
 GmPAA2-2 TCCGCTTTTAAAGAGAGAGGCTGCTCAGTTTCCAGCGGCAATTAACCTGGGATGGCCCTCTACGGATCAAGCTTCTTCACTGGTTCACAGTCAAGC 1011

AtPAA2 ATATCAAAATTGTCAAGATGGTTGAGGATGCCAAGGTAATGACAGCTCTGTGACACAGGCTGGCAGATGCAATAGCTGGACCTTCTGCTATATCTATA 1363
 GmPAA2-1 ATATCAAAATTGTCAAGATGGTTGAGGATGCCAAGGTAATGACAGCTCTGTGACACAGGCTGGCAGATGCAATAGCTGGACCTTCTGCTATATCTATA 1372
 GmPAA2-2 ATATCAAAATTGTCAAGATGGTTGAGGATGCCAAGGTAATGACAGCTCTGTGACACAGGCTGGCAGATGCAATAGCTGGACCTTCTGCTATATCTATA 1379
 GmPAA2-2 ATATCAAAATTGTCAAGATGGTTGAGGATGCCAAGGTAATGACAGCTCTGTGACACAGGCTGGCAGATGCAATAGCTGGACCTTCTGCTATATCTATA 1111

AtPAA2 TGCCTTTATCTGCAATGACCTTTGCTTCTGGTATTATGCTGCTTCCACACATATTTCCAGATGTTTTTCTCAATGATATTTGCTGGACCTGATGGAGATGC 1463
 GmPAA2-1 TGCCTTTATCTGCAATGACCTTTGCTTCTGGTATTATGCTGCTTCCACACATATTTCCAGATGTTTTTCTCAATGATATTTGCTGGACCTGATGGAGATGC 1472
 GmPAA2-2 TGCCTTTATCTGCAATGACCTTTGCTTCTGGTATTATGCTGCTTCCACACATATTTCCAGATGTTTTTCTCAATGATATTTGCTGGACCTGATGGAGATGC 1479
 GmPAA2-2 TGCCTTTATCTGCAATGACCTTTGCTTCTGGTATTATGCTGCTTCCACACATATTTCCAGATGTTTTTCTCAATGATATTTGCTGGACCTGATGGAGATGC 1211

AtPAA2 TTTGGCTTTAGCTTAAACTGCTGCTGATGCTTTGCTATTTCTCTCCGCTGCTGCACTGGGCTTGGAGACCAACCTGCAATTTAAATTTGGACCTCT 1563
 GmPAA2-1 TTTGGCTTTAGCTTAAACTGCTGCTGATGCTTTGCTATTTCTCTCCGCTGCTGCACTGGGCTTGGAGACCAACCTGCAATTTAAATTTGGACCTCT 1572
 GmPAA2-2 TTTGGCTTTAGCTTAAACTGCTGCTGATGCTTTGCTATTTCTCTCCGCTGCTGCACTGGGCTTGGAGACCAACCTGCAATTTAAATTTGGACCTCT 1579
 GmPAA2-2 TTTGGCTTTAGCTTAAACTGCTGCTGATGCTTTGCTATTTCTCTCCGCTGCTGCACTGGGCTTGGAGACCAACCTGCAATTTAAATTTGGACCTCT 1310

AtPAA2 CTTGGAGCAAGCGGCGGATATCTTATCAGAGGAGGAGATGTTTGAAGCTTGGGATCCATAATTTGCTTGGCTTTAGACAAGACAGGCTACTCTTACTG 1663
 GmPAA2-1 CTTGGGCAAGCAAGCGGCGGATATCTTATCAGAGGAGGAGATGTTTGAAGCTTGGGATCCATAATTTGCTTGGCTTTAGACAAGACAGGCTACTCTTACTG 1672
 GmPAA2-2 CTTGGGCAAGCAAGCGGCGGATATCTTATCAGAGGAGGAGATGTTTGAAGCTTGGGATCCATAATTTGCTTGGCTTTAGACAAGACAGGCTACTCTTACTG 1679
 GmPAA2-2 CTTGGGCAAGCAAGCGGCGGATATCTTATCAGAGGAGGAGATGTTTGAAGCTTGGGATCCATAATTTGCTTGGCTTTAGACAAGACAGGCTACTCTTACTG 1410

Figura 3. Comparación de las proteínas PAA2. (a) Alineamiento de las secuencias de las proteínas AtPAA2, GmPAA2-1, GmPAA2-1T y GmPAA2-2 deducidas de las secuencias de nucleótidos. Los aminoácidos idénticos están resaltados en negro. Los números a la derecha corresponden con el número de aminoácidos. HMB, dominio de unión a metal (*Heavy Metal Binding*), TM1–TM8 regiones transmembrana. (b) Representación esquemática bidimensional de las proteínas GmPAA2-1, GmPAA2-1T y GmPAA2-2.

1.1.1. Expresión heteróloga de GmPAA2-1 en *E. coli*

Para un estudio bioquímico de la proteína GmPAA2-1, se intentó su sobreexpresión utilizando un sistema heterólogo, como es el caso de la bacteria *E. coli*. El uso de bacterias con vectores de expresión es un método común para conseguir cantidades suficientes de una proteína que puede ser poco abundante en el organismo originario (Alberts y col., 2014). Para ello, el gen *GmPAA2-1* se clonó en el vector pBAD TOPO TA (apartado 2.6.1 de Materiales y Métodos) y la sobreexpresión en las bacterias se analizó mediante ensayos a escala piloto en los que se varió el tiempo de incubación, la temperatura, la cantidad de inductor (L-arabinosa), así como la cantidad de Cu añadido al medio. Como controles negativos se utilizaron tanto las bacterias sin transformar con y sin adición de inductor, como las bacterias transformadas sin la adición de inductor. Los extractos crudos de proteína bacteriana se analizaron por SDS-PAGE y tinción azul Coomassie (Figura 4a). Mediante esta técnica, no se observaron diferencias que indicasen la sobreexpresión de proteínas del peso molecular esperado (89 kDa) para GmPAA2-1 expresada utilizando el vector pBAD TOPO TA.

Los extractos crudos de proteína bacteriana se analizaron también por western blot utilizando dos anticuerpos diseñados contra la proteína GmPAA2-1 (Figura 4b,c). Uno de ellos diseñado contra un péptido sintético cuya secuencia se localiza en la zona N-terminal (denominado anti-GmPAA2_N-terminal) y el otro diseñado contra un péptido en la zona del gran bucle estromático (denominado anti-GmPAA2_bucle) (apartado 3.2.6 de Materiales y Métodos) (Bernal y col., 2007). Como control se realizó un western blot sin anticuerpos primarios para comprobar que los anticuerpos secundarios no producían ninguna reacción inespecífica (Figura 4d). Los inmunoensayos no mostraron diferencias entre las muestras procedentes de bacterias control y de bacterias transformadas inducidas, lo que no permitió determinar la presencia de la proteína GmPAA2-1 en los extractos bacterianos.

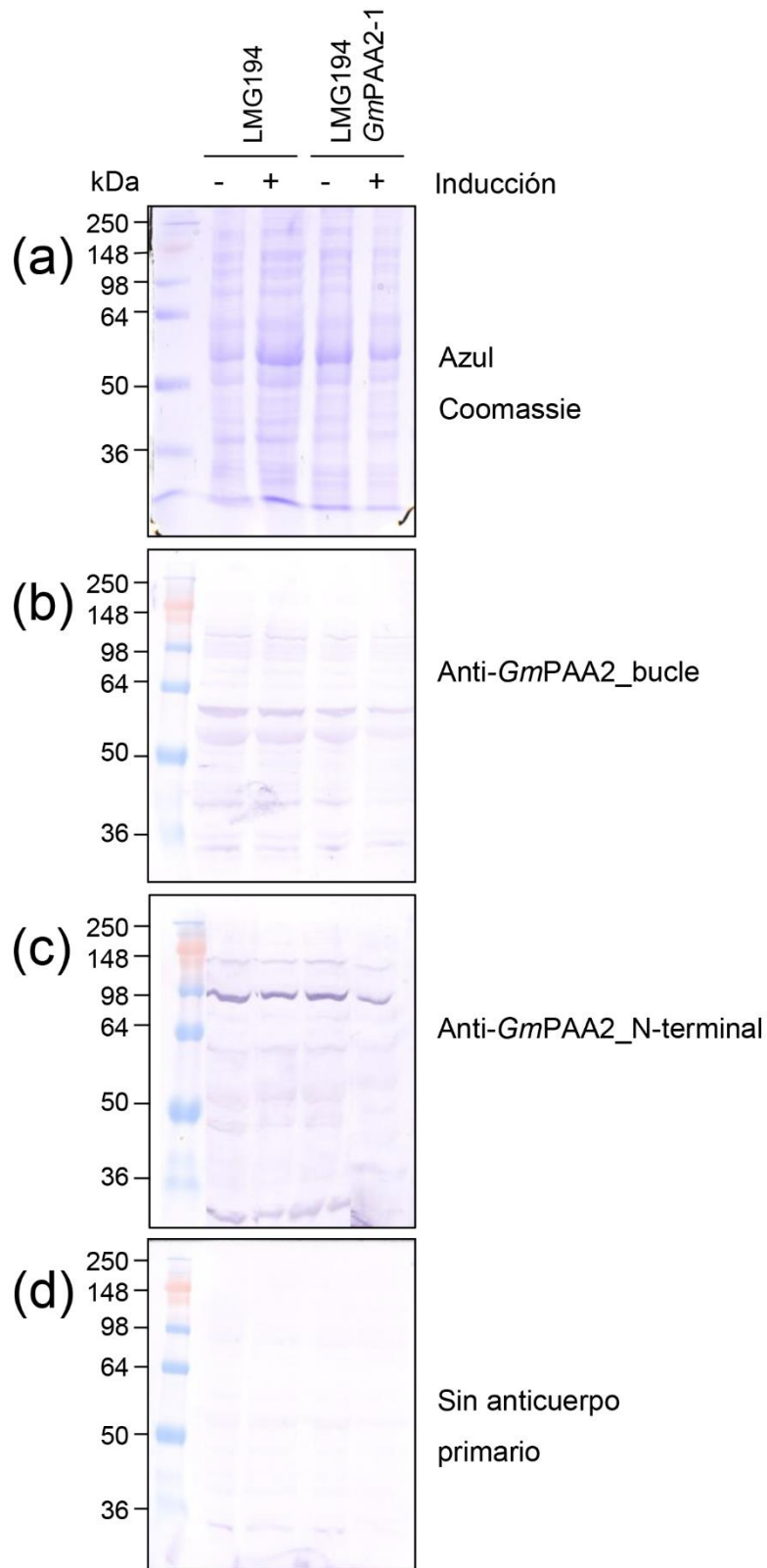


Figura 4. Análisis por SDS-PAGE y western blot de extractos bacterianos. (a) Tinción azul Coomassie; (b) anti-*GmPAA2_bucle*; (c) anti-*GmPAA2_N-terminal*; (d) sin anticuerpo primario. Los extractos crudos fueron de bacterias de la cepa LMG194 sin transformar no inducidas (-) e inducidas (+) (LMG194), y transformadas con la construcción para la

Figura 4 (continuación). sobreexpresión de la proteína *GmPAA2-1* (LMG194 *GmPAA2-1*), no inducidas (-) e inducidas (+) con L-arabinosa.

1.1.2. Expresión heteróloga de *GmPAA2-2* en *E. coli*

La secuencia codificante del gen *GmPAA2-2* sin la secuencia del péptido señal de tránsito al cloroplasto ni el codón STOP prematuro se clonó en el vector pBAD TOPO TA, que añade a la proteína de fusión el epítipo 6xHis (apartado 2.6.1 de Materiales y Métodos). Se transformaron las bacterias y se realizó un ensayo de sobreexpresión. Como control negativo se utilizaron las bacterias sin transformar. Los extractos crudos de proteína bacteriana se analizaron por SDS-PAGE y tinción azul Coomassie (Figura 5a) o western blot con anticuerpos anti-6xHis (Figura 5b). Mediante esta técnica no se detectó la proteína de fusión *GmPAA2-2*, por lo que no fue posible la purificación de la posible proteína para su posterior análisis.

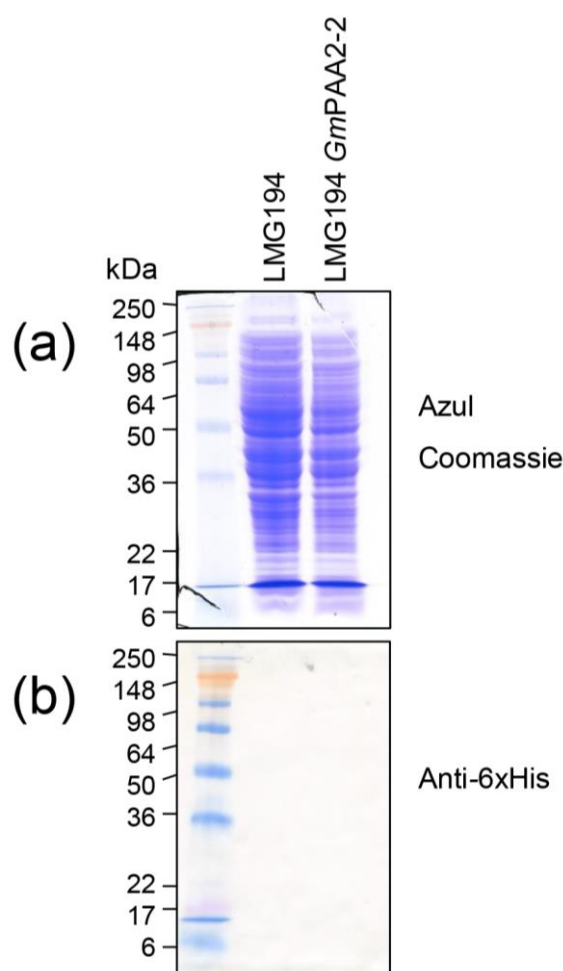


Figura 5. Análisis por SDS-PAGE y western blot de extractos bacterianos. (a) Tinción azul Coomassie; (b) western blot con el anticuerpo anti-6xHis de los extractos crudos de la cepa LMG194, sin transformar (LMG194) y transformadas con la construcción para la sobreexpresión de la proteína *GmPAA2-2* (LMG194 *GmPAA2-2*). La inducción se hizo con L-arabinosa.

1.1.3. Expresión de *GmPAA2-1*, *GmPAA2-1T* y *GmPAA2-2* en *S. cerevisiae*

Las secuencias codificantes de *GmPAA2-1*, *GmPAA2-1T* y *GmPAA2-2* sin los péptidos señal de tránsito al cloroplasto se clonaron mediante la estrategia de clonación Gateway en el vector binario de levaduras pFL383 (ver sección 2.6.3 de Materiales y Métodos). Este vector permite el crecimiento de las levaduras en medio mínimo sin histidina, lo que posibilita la selección de las levaduras transformadas; y añade al extremo N-terminal de la proteína el epítipo de la hemaglutinina (HA) para su seguimiento mediante la técnica de western blot.

Para este estudio se utilizaron levaduras silvestres y mutantes *ccc2*, que carecen del transportador de Cu del aparato de Golgi (Gaxiola y col., 1998). A pesar de la ausencia de cloroplastos en las levaduras, esta cepa se ha utilizado para el estudio de transportadores de Cu plastidiales como *AtPAA1* y *HvHMA1* (Catty y col., 2011; Mikkelsen y col., 2012). Las levaduras *ccc2* se transformaron con las construcciones con *GmPAA2-1*, *GmPAA2-1T* y *GmPAA2-2*, y como controles se utilizaron las levaduras silvestres y *ccc2* transformadas con el vector vacío pFL383. Los extractos crudos d

e levaduras se analizaron por western blot con diferentes anticuerpos, lo que permitió analizar la expresión de las proteínas, así como la efectividad de los dos anticuerpos diseñados contra diferentes péptidos de *GmPAA2*. El inmunoblot con el anticuerpo anti-HA (Figura 6b) muestra dos bandas concordantes con el peso molecular esperado para *GmPAA2-1* y *GmPAA2-1T* en este sistema de expresión (103 kDa y 41 kDa, respectivamente). En cambio, la expresión de *GmPAA2-2* (18 kDa) no se detectó en las condiciones testadas.

A continuación se realizó un western blot con el anticuerpo anti-*GmPAA2*_N-terminal sobre las mismas muestras (Figura 6c). En este caso, no se observaron bandas correspondientes con ninguna de las proteínas *GmPAA2*, lo que parece indicar que el anticuerpo no detecta las proteínas contra las que fue diseñado en las condiciones testadas. También se utilizó el anticuerpo anti-*GmPAA2*_bucle (Figura 6d) en las muestras con el vector vacío (control negativo) y con la proteína *GmPAA2-1*. En este caso no se incluyeron las muestras con las proteínas *GmPAA2-1T* y *GmPAA2-2* debido a que ambas proteínas se truncan antes de la secuencia contra la que está diseñado el anticuerpo. Utilizando este anticuerpo, solo se observó una banda de aproximadamente 30 kDa de peso molecular, presente en todas las muestras, incluyendo las utilizadas como control negativo, por lo que parece corresponder con una banda inespecífica. Por lo tanto, en este caso tampoco se observó la banda correspondiente con *GmPAA2-1*, lo que parece indicar que este anticuerpo no reconoce la proteína de *G. max* en estas condiciones.

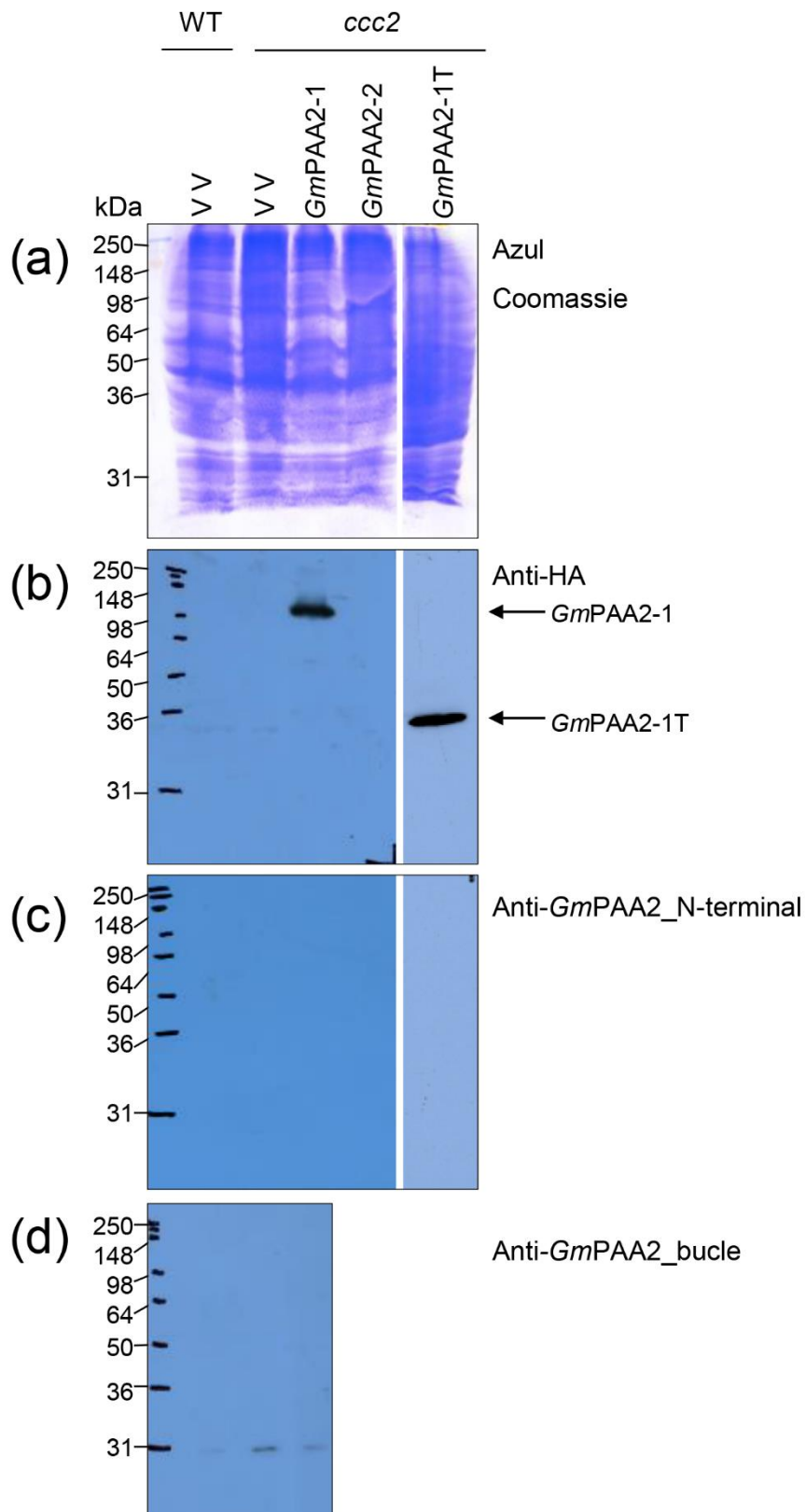


Figura 6. Análisis por SDS-PAGE y western blot de extractos de levadura. (a) Tinción azul Coomassie; (b) western blot con los anticuerpos anti-HA; (c) con anti-*GmPAA2_N-terminal*; (d) con anti-*GmPAA2_bucle* de los extractos crudos de levaduras silvestres (WT) y *ccc2*

Figura 6 (continuación). transformadas con el vector vacío (VV) o transformadas con las construcciones para la sobreexpresión de *GmPAA2-1*, *GmPAA2-2* o *GmPAA2-1T*.

1.1.4. Análisis funcional de las proteínas *GmPAA2-1*, *GmPAA2-1T* y *GmPAA2-2* en levaduras

1.1.4.1. Complementación funcional de los mutantes *ccc2* de *S. cerevisiae* con *GmPAA2-1*, *GmPAA2-1T* y *GmPAA2-2*

Se llevó a cabo un estudio de complementación funcional de los mutantes *ccc2* con las proteínas *GmPAA2-1*, *GmPAA2-1T* y *GmPAA2-2*. Para ello, se transformaron las levaduras con las construcciones con *GmPAA2-1*, *GmPAA2-1T* y *GmPAA2-2* en el vector pFL61 (apartado 2.6.3 de Materiales y Métodos), y tres colonias independientes de cada transformación fueron crecidas en medio líquido, diluidas de manera serial y sembradas en placas de cultivo. Como control del crecimiento se utilizaron placas de medio mínimo SD-Ura. Las levaduras se crecieron en placas de medio mínimo SD-Ura con diferentes concentraciones de Cu y quelantes de Cu (batocuproína disulfonato, BCS) y Fe (batofenantrolina disulfonato, BPS) para analizar el fenotipo de las levaduras mutantes. Se observó que la mayor diferencia entre las levaduras silvestres y las mutantes *ccc2* se apreciaba en medio mínimo SD-Ura suplementado con 20 µM BCS y 20 µM BPS, por lo que se consideró éste como el medio de elección (Figura 7).

. Tras dos días de crecimiento en placa (Figura 7), las levaduras silvestres mostraron capacidad para crecer en medio mínimo SD-Ura y medio mínimo SD-Ura suplementado con 20 µM BCS y 20 µM BPS. En cambio, las levaduras *ccc2*, presentaron un crecimiento similar a las silvestres en medio mínimo SD-Ura y un crecimiento limitado en el medio mínimo SD-Ura suplementado con 20 µM BCS y 20 µM BPS. Las levaduras mutantes *ccc2* con las construcciones con *GmPAA2-1*, *GmPAA2-1T* o *GmPAA2-2* se comportaron de manera similar a las levaduras mutantes *ccc2*, por lo que parece que las proteínas *GmPAA2* no son capaces de restablecer el fenotipo mutante.

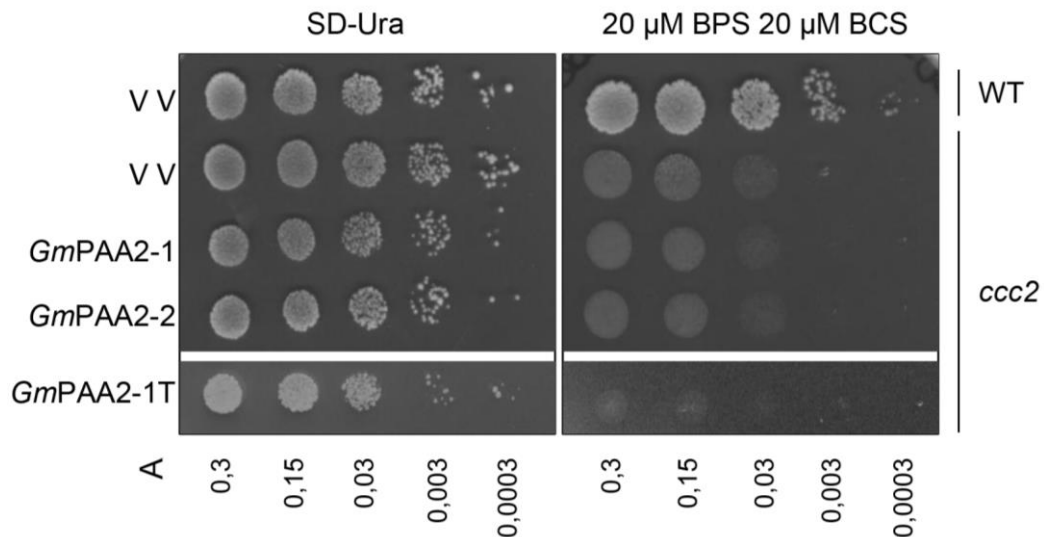


Figura 7. Ensayo de complementación en levaduras. WT, cepa silvestre BY4741; *ccc2*, cepa mutante *ccc2*; VV, vector vacío pFL61; SD-Ura, medio mínimo sin uracilo; A, absorbancia a 600 nm en cubeta de 1 cm de paso de luz.

1.1.4.2. Estudio de las proteínas *GmPAA2-1*, *GmPAA2-1T* y *GmPAA2-2* en levaduras silvestres

Se ha visto que la expresión de la proteína *AtPAA2* en levaduras silvestres BY4741 puede producir hipersensibilidad al Cu, lo que podría producirse por una sobrecarga de Cu^+ en el retículo endoplásmico debida a la actividad de *AtPAA2* (Sautron y col., 2015). Para evaluar la funcionalidad de las proteínas *GmPAA2-1*, *GmPAA2-1T* y *GmPAA2-2* en las levaduras, éstas se transformaron con el vector pFL61 vacío y las construcciones en este vector (apartado 2.6.3 de Materiales y Métodos), y se realizó un ensayo fenotípico en placas con medio SD-Ura con diferentes concentraciones de CuSO_4 añadido (Figura 8).

En las diferentes condiciones nutricionales de Cu testadas, no se observaron diferencias entre las levaduras con el vector vacío y con *GmPAA2-1*, *GmPAA2-1T* o *GmPAA2-2*. Esto podría deberse a que las proteínas no adquieran su correcto plegamiento o localización, lo que les impida realizar su función. También podría deberse a que no hay suficiente expresión de las proteínas que permitiera ver diferencias fenotípicas.

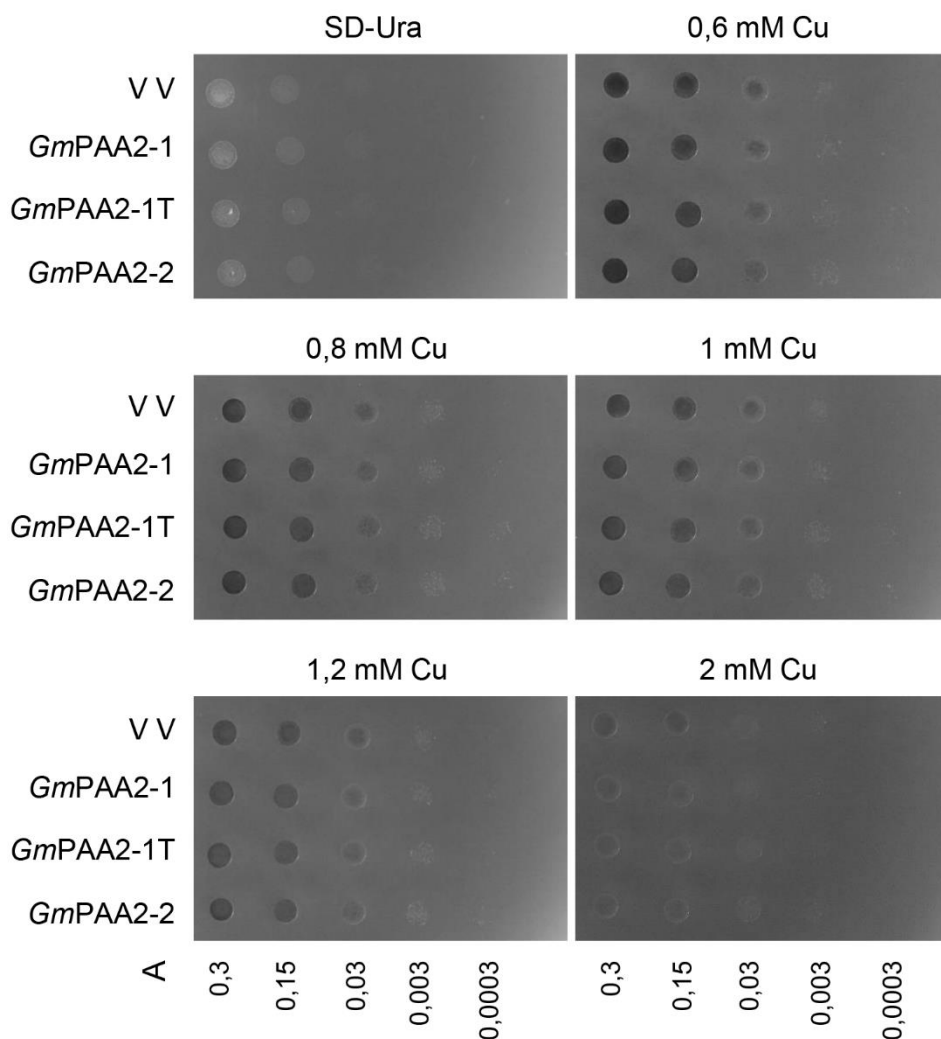


Figura 8. Ensayo funcional en levaduras silvestres BY4741. VV, vector vacío pFL61; SD-Ura, medio mínimo sin uracilo sin suplementar o suplementado con las concentraciones de CuSO_4 indicadas; A, absorbancia a 600 nm en cubeta de 1 cm de paso de luz.

1.1.5. Complementación funcional de los mutantes de *A. thaliana paa1-1* y *paa2-1* con *GmPAA2-1* y *GmPAA2-2*

Las plantas de *A. thaliana* mutantes *paa1-1* y *paa2-1* fueron, en primer lugar, caracterizadas genótipicamente para confirmar la presencia de la mutación puntual en homocigosis en cada caso. Para ello, se amplificó la región de ADN que flanquea la mutación y se analizó la secuencia de la región genómica.

El mutante *paa1-1*, ecotipo Ler (Landsberg *erecta*), tiene una mutación sin sentido en el exón 8 (C → T), lo que provoca el truncamiento de la región C-terminal, que contiene la zona de transducción de iones, fosforilación y dominio de unión a ATP. Esto resulta en un alelo nulo sin actividad PAA1 (Shikanai y col., 2003). El mutante *paa2-1*, ecotipo Col-3, tiene una mutación sin sentido en el exón 2 (G → A) y se trata de un alelo nulo (Abdel-Ghany y col.,

2005b). En ambos mutantes se confirmó la presencia de la mutación, así como del alelo silvestre del gen correspondiente al otro transportador (Figura 9).

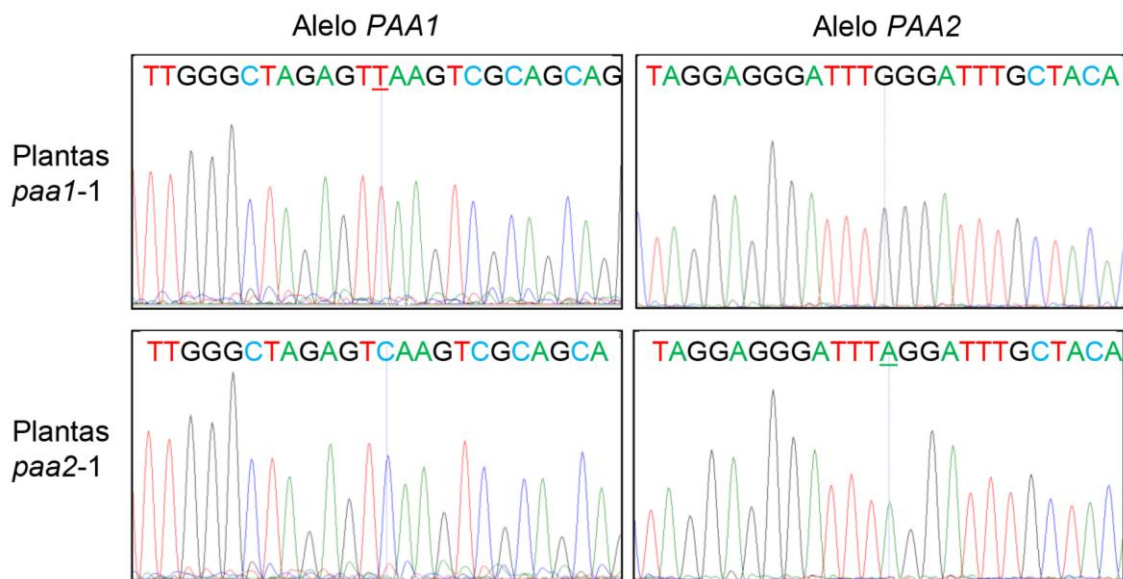


Figura 9. Caracterización genotípica de los mutantes *paa1-1* y *paa2-1*. Se muestran los fragmentos de los cromatogramas de la secuenciación sobre ADNg en los que se observan las mutaciones puntuales (subrayadas) o bien los alelos silvestres de los genes *AtPAA1* y *AtPAA2*.

1.1.5.1. Complementación funcional del mutante *paa1-1* con *GmPAA2-1* y *GmPAA2-2*

Para estudiar la complementación funcional de los mutantes *paa1-1* con las proteínas de *G. max* *GmPAA2-1* y *GmPAA2-2*, las regiones codificantes incluyendo los péptidos señal de tránsito al cloroplasto de ambos genes se clonaron en el vector pENTR/D TOPO y se transfirieron al vector pMDC32 mediante la tecnología Gateway (sección 2.6.3 de Materiales y Métodos). Este vector cuenta con el promotor 35S CaMV que produce una expresión génica constitutiva (Curtis y Grossniklaus, 2003). Las plantas de *A. thaliana* silvestres Ler se transformaron con el vector vacío pMDC32 y las plantas *paa1-1* se transformaron con las construcciones con *GmPAA2-1* y *GmPAA2-2*. Las plantas transgénicas se seleccionaron en medio ½ MS con 1% (p/v) sacarosa suplementado con higromicina.

Para los experimentos de complementación del mutante *paa1-1* se utilizaron plantas Ler, Ler con el vector vacío pMDC32 (dos líneas transgénicas independientes homocigotas), plantas *paa1-1*, plantas *paa1-1* expresando *GmPAA2-1* (dos líneas transgénicas independientes heterocigotas) y plantas *paa1-1* expresando *GmPAA2-2* (una línea transgénica heterocigota). Como se indica, estos dos últimos grupos de plantas transgénicas

son procedentes de plantas progenitoras heterocigotas (segunda generación de plantas transgénicas, T2). Esto suponía que alrededor de un 25% de las plantas corresponderían con plantas transgénicas homocigotas, un 50% heterocigotas y un 25% no transgénicas. Con el fin de diferenciar las plantas transgénicas de las no transgénicas, se amplificó por PCR sobre ADNg parte del promotor 35S CaMV fusionado al extremo N-terminal del transgén. Las plantas que mostraron amplificación del fragmento y gen de referencia *AtACT2* (*Actina 2*) se consideraron transgénicas, y las que solo mostraron amplificación en el gen de referencia, no transgénicas.

Las plantas se crecieron sembrándolas directamente en tierra y se regaron con agua corriente o agua corriente suplementada con 1 mM CuSO₄ (Figura 10). Paralelamente, se crecieron plantas en placas de plástico con medio ½ MS con 1% (p/v) sacarosa sin suplementar o suplementado con 10 µM CuSO₄ (Figura 11). La concentración de Cu en el medio ½ MS es inferior a 0,5 µM, lo que representa una disponibilidad de Cu subóptima para *A. thaliana* (Abdel-Ghany y col., 2005b; Andrés-Colás y col., 2013). Las placas de ½ MS con sacarosa sin Cu añadido se prepararon con material desprovisto de metales y con especial cuidado para evitar la contaminación con Cu.

Las plantas se crecieron en estas dos condiciones nutricionales de Cu, ya que el fenotipo del mutante *paa1-1* (y también el de *paa2-1*) es rescatable mediante la adición de Cu (Abdel-Ghany y col., 2005b). El uso de plantas crecidas en tierra y en placa permitió la mejor identificación del fenotipo de las plantas mutantes *paa1-1*, que se mostró más evidente en uno u otro sistema de cultivo según la característica fenotípica analizada. Estas características fueron: peso fresco, contenido de PC, patrón de actividad SOD y actividad fotosintética a través de la fluorescencia de la clorofila.

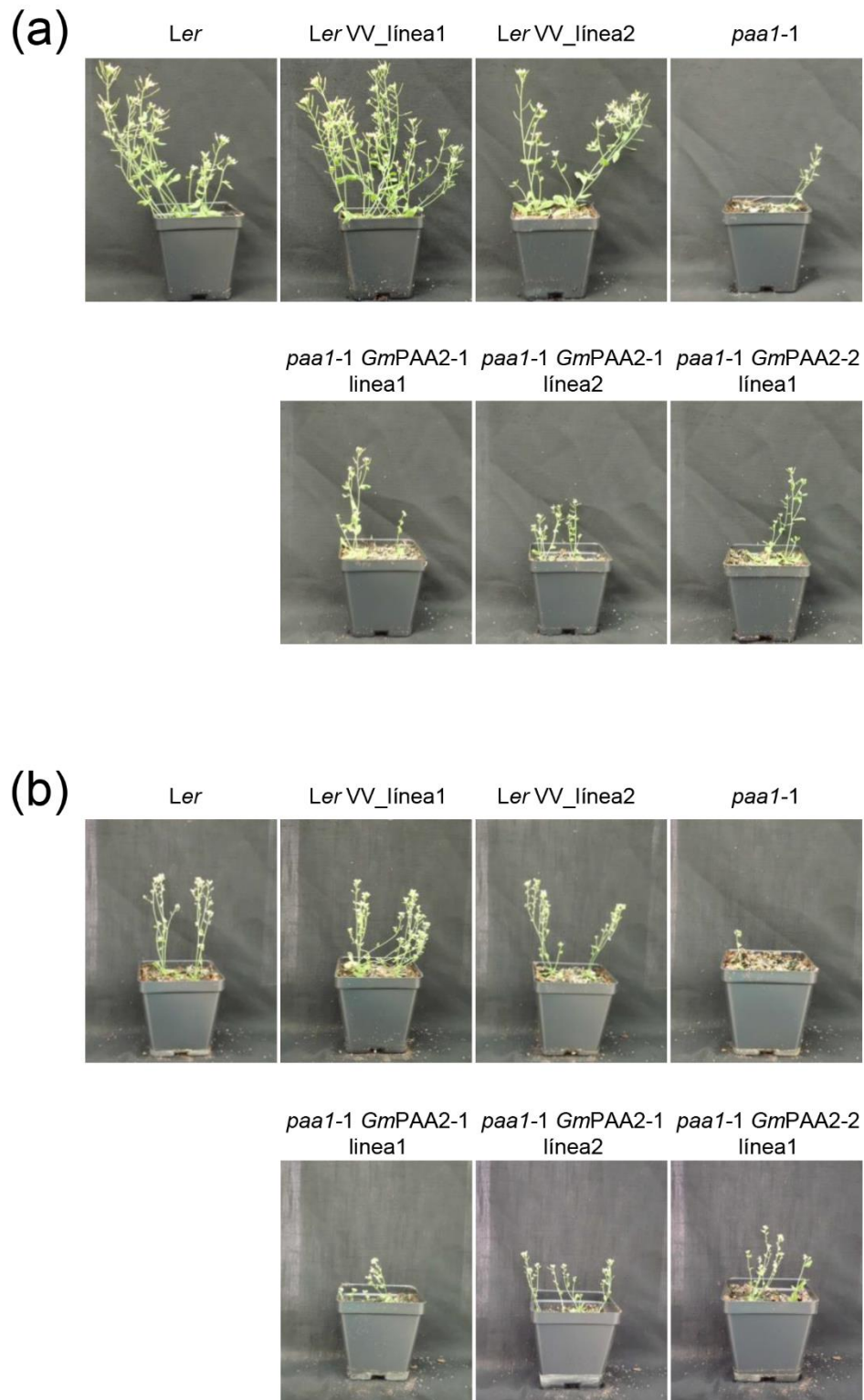


Figura 10. Cultivo de plantas sembradas directamente en tierra y regadas con agua corriente (a) sin suplementar o (b) suplementada con 1 mM CuSO₄. Se cultivaron plantas Ler, dos líneas transgénicas independientes de plantas Ler con el vector vacío (Ler VV_línea1 y Ler VV_línea2), plantas *paa1-1*, dos líneas transgénicas independientes de plantas *paa1-1* expresando *GmPAA2-1* (*paa1-1 GmPAA2-1_línea1* y *paa1-1 GmPAA2-1_línea2*) y una línea transgénica de plantas *paa1-1* expresando *GmPAA2-2* (*paa1-1 GmPAA2-2_línea1*).

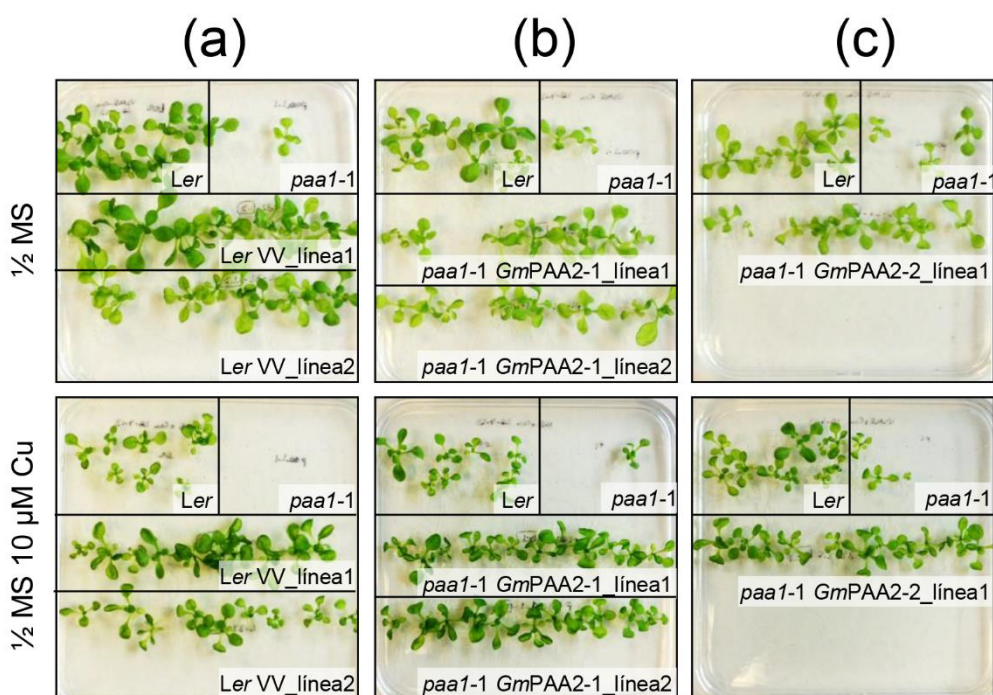


Figura 11. Cultivo de plantas en medio $\frac{1}{2}$ MS con 1% (p/v) sacarosa ($\frac{1}{2}$ MS), o $\frac{1}{2}$ MS con 1% (p/v) sacarosa suplementado con $10 \mu\text{M}$ CuSO_4 ($\frac{1}{2}$ MS $10 \mu\text{M}$ Cu). En la parte superior de las placas se sembraron plantas *Ler* y *paa1-1*. En la zona media e inferior se sembraron (a) dos líneas transgénicas independientes de plantas *Ler* con el vector vacío (*Ler* VV_línea1 y *Ler* VV_línea2), (b) dos líneas transgénicas independientes de plantas *paa1-1* expresando *GmPAA2-1* (*paa1-1 GmPAA2-1_línea1* y *paa1-1 GmPAA2-1_línea2*) y (c) una línea transgénica de plantas *paa1-1* expresando *GmPAA2-2* (*paa1-1 GmPAA2-2_línea1*).

1) Análisis del peso fresco. Una de las características fenotípicas de los mutantes *paa1-1* es que tienen un crecimiento reducido en comparación con las plantas silvestres. Esta reducción se ve exacerbada en condiciones limitantes de Cu (Shikanai y col., 2003). Por tanto, tras la cosecha de las plantas, se midió el peso fresco, teniendo en cuenta los resultados del análisis genotípico de las plantas, y se observó que, en el caso de las plantas crecidas en placa (Figura 12a), no había diferencias significativas en el peso de las plantas silvestres *Ler* y mutantes *paa1-1*, crecidas tanto en medio $\frac{1}{2}$ MS con 1% (p/v) sacarosa como en $\frac{1}{2}$ MS con 1% (p/v) sacarosa suplementado con $10 \mu\text{M}$ CuSO_4 . En cambio, en el caso de las plantas crecidas en tierra (Figura 12b), las plantas *paa1-1* mostraron una disminución significativa del peso, tanto en cultivo en tierra regada con agua corriente como regada con 1 mM CuSO_4 en comparación con las plantas silvestres; y las líneas transgénicas *paa1-1* expresando *GmPAA2-1* y *GmPAA2-2* tenían un peso similar al de las plantas *paa1-1* mutantes. Estos resultados de peso fresco, teniendo en cuenta el análisis genotípico de los individuos para diferenciar entre las plantas transgénicas de las no transgénicas, parecen indicar que las

proteínas *GmPAA2-1* y *GmPAA2-2* no son capaces de revertir el fenotipo de crecimiento reducido que tiene el mutante *paa1-1*.

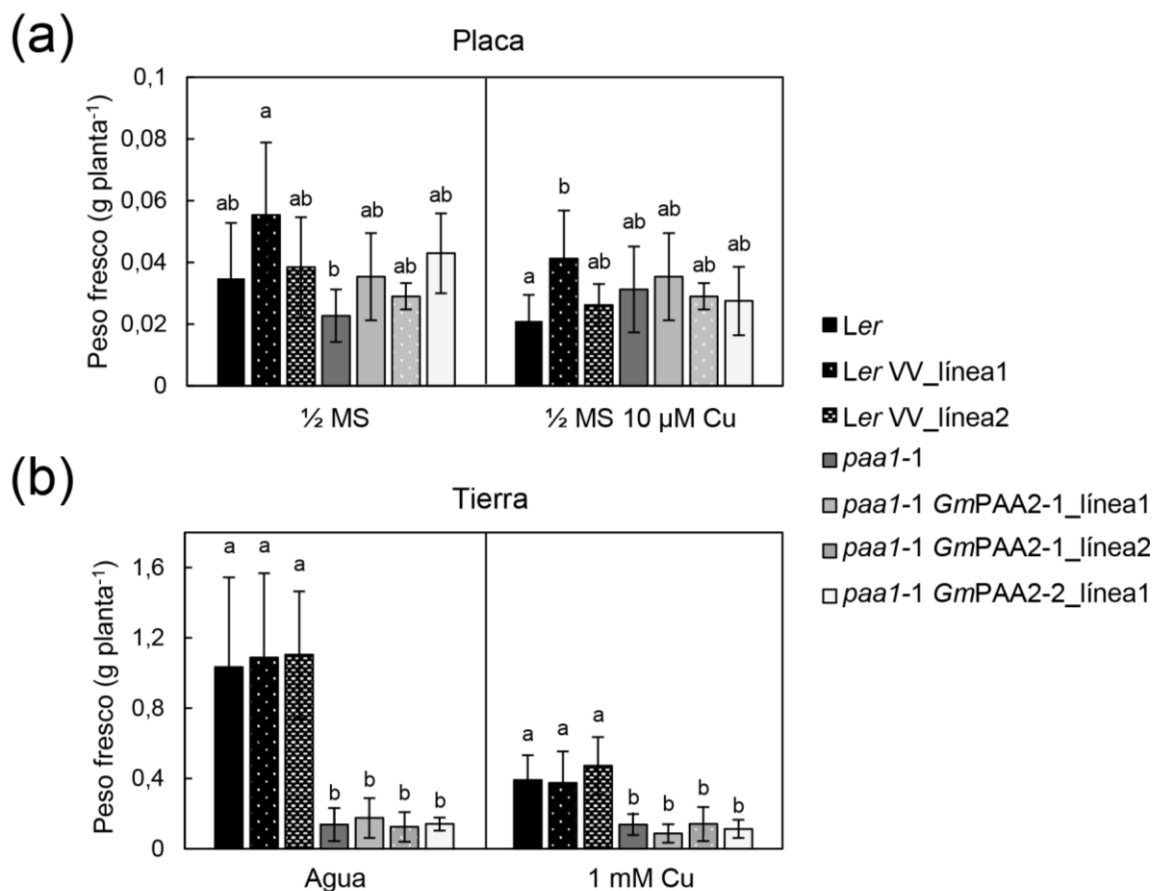


Figura 12. Peso fresco por planta silvestre *Ler*, dos líneas transgénicas independientes de plantas *Ler* con el vector vacío (*Ler VV_línea1* y *Ler VV_línea2*), plantas *paa1-1*, dos líneas transgénicas independientes de plantas *paa1-1* expresando *GmPAA2-1* (*paa1-1 GmPAA2-1_línea1* y *paa1-1 GmPAA2-1_línea2*) y una línea transgénica de plantas *paa1-1* expresando *GmPAA2-2* (*paa1-1 GmPAA2-2_línea1*) crecidas en (a) placas con medio ½ MS con 1% (p/v) sacarosa sin suplementar (½ MS) y suplementado con 10 µM CuSO₄ (½ MS 10 µM Cu) o (b) tierra regada con agua corriente (agua) o con 1 mM CuSO₄ (1 mM Cu). Se muestran las medias de al menos tres réplicas biológicas ± la desviación estándar. Las letras distintas indican diferencias significativas entre los diferentes genotipos (p<0,05).

2) Análisis del contenido de PC. Los mutantes *paa1-1* tienen menor contenido de holo-PC, lo que es indicativo de un aporte insuficiente de Cu en el lumen tilacoidal (Shikanai y col., 2003). Para detectar la cantidad de PC, las plantas *Ler*, dos líneas de plantas transgénicas independientes *Ler* con el vector vacío, plantas *paa1-1*, dos líneas transgénicas independientes de plantas *paa1-1* expresando *GmPAA2-1* y una línea transgénica de plantas *paa1-1* expresando *GmPAA2-2* se utilizaron para obtener extractos crudos y realizar un inmunoensayo con anticuerpos anti-PC (Figura 13).

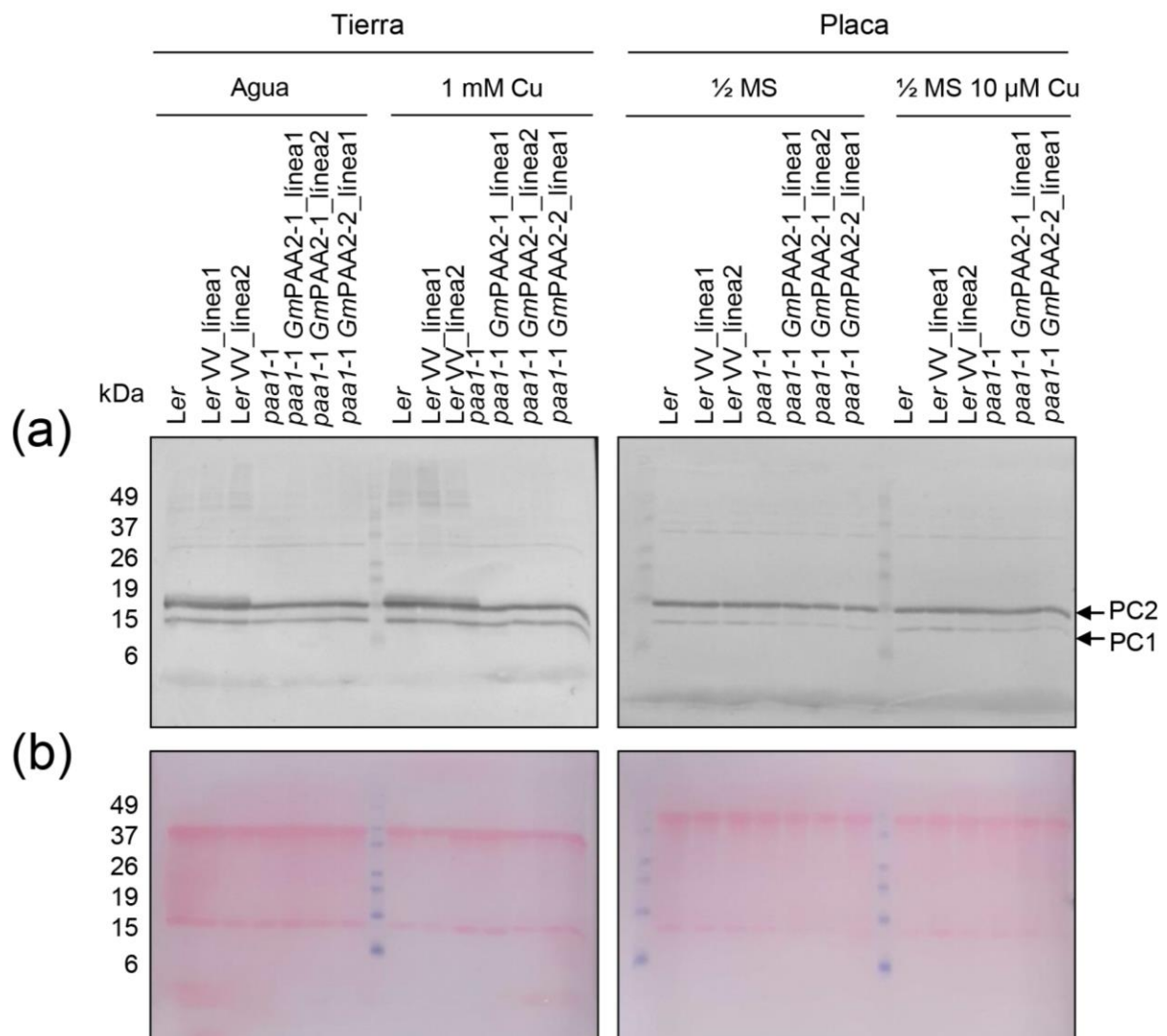


Figura 13. Análisis de los extractos crudos de las plantas *Ler*, dos líneas transgénicas independientes de plantas *Ler* con el vector vacío (*Ler VV_línea1* y *Ler VV_línea2*), plantas *paa1-1*, dos líneas transgénicas independientes de plantas *paa1-1* expresando *GmPAA2-1* (*paa1-1 GmPAA2-1_línea1* y *paa1-1 GmPAA2-1_línea2*) y una línea transgénica de plantas *paa1-1* expresando *GmPAA2-2* (*paa1-1 GmPAA2-2_línea1*) por (a) SDS-PAGE y western blot. con anticuerpos anti-PC o (b) tinción rojo Ponceau. Las plantas se cultivaron en tierra regada con agua (agua) o 1 mM CuSO₄ (1 mM Cu) y en placa con medio ½ MS con 1% (p/v) sacarosa (½ MS) o con medio ½ MS con 1% (p/v) sacarosa y 10 µM CuSO₄ añadido (10 µM Cu). PC1, plastocianina 1; PC2, plastocianina 2.

Los resultados de las plantas crecidas en tierra regadas tanto con agua como con 1 mM CuSO₄, mostraron una reducción en el contenido de PC de las plantas *paa1-1* y *paa1-1* expresando *GmPAA2-1* y *GmPAA2-2* en comparación con las plantas silvestres *Ler*. Las plantas silvestres *Ler* y *Ler* con el vector vacío pMDC32 mostraron resultados similares entre sí. En las plantas crecidas en placa no se observaron diferencias entre las plantas silvestres *Ler* y mutantes *paa1-1*, tanto en las crecidas en ½ MS con 1% (p/v) sacarosa como en ½ MS

con 1% (p/v) sacarosa y 10 μM CuSO_4 añadido. Por tanto, parece que las condiciones más propicias para evaluar la diferencia de contenido en PC entre las plantas silvestres *Ler* y mutantes *paa1-1* y, por tanto, poder evaluar la complementación con las proteínas *GmPAA2-1* y *GmPAA2-2*, son los cultivos en tierra, especialmente en tierra regada con agua. En estas condiciones, los resultados parecen indicar que las proteínas *GmPAA2-1* y *GmPAA2-2* no complementan al mutante *paa1-1*.

3) Análisis de la actividad SOD. En los mutantes *paa1*, la actividad SOD se ve afectada, disminuyendo la actividad CSD2 y FeSOD, y aumentando la actividad CSD1, respecto de las plantas silvestres (Shikanai y col., 2003; Abdel-Ghany y col., 2005b). Se realizó un ensayo de actividad SOD en las plantas *Ler*, dos líneas de plantas transgénicas independientes *Ler* con el vector vacío, plantas *paa1-1*, dos líneas transgénicas independientes de plantas *paa1-1* expresando *GmPAA2-1* y una línea transgénica de plantas *paa1-1* expresando *GmPAA2-2* (Figura 14).

En este caso, el fenotipo de los mutantes *paa1-1* pudo verse tanto en las plantas crecidas en placa como en tierra, siendo más apreciable en las plantas crecidas en placa. En cultivo en placa con medio $\frac{1}{2}$ MS con 1% (p/v) sacarosa, las plantas *Ler* y *Ler* con el vector vacío mostraron una mayor actividad FeSOD, mientras que la actividad Cu/ZnSOD (CSD1, CSD2) era prácticamente indetectable. En las plantas *paa1-1* se observó una mayor actividad Cu/ZnSOD (debido, probablemente, a una mayor actividad CSD1) y reducida actividad FeSOD. Las plantas *paa1-1* expresando *GmPAA2-1* y *GmPAA2-2* mostraron un patrón de actividad SOD similar al mostrado por los mutantes *paa1-1*. Por otra parte, las plantas crecidas en medio $\frac{1}{2}$ MS con 1% (p/v) sacarosa y 10 μM CuSO_4 añadido o en tierra regadas con 1 mM CuSO_4 , mostraron una mayor actividad Cu/ZnSOD en todos los casos, especialmente apreciable en las plantas crecidas en placa. Según indican los ensayos de actividad con inhibidores específicos, la banda inferior corresponde con la Cu/ZnSOD (Figura 14), en este caso parece corresponder con ambas isoformas CSD1 y CSD2 en conjunto. Los resultados de actividad SOD de las plantas *paa1-1*, crecidas en placa en medio $\frac{1}{2}$ MS con 1% (p/v) sacarosa, y las plantas *paa1-1* expresando *GmPAA2-1* y *GmPAA2-2* eran comparables, lo que parece indicar de nuevo que las proteínas *GmPAA2-1* y *GmPAA2-2* no complementan el fenotipo del mutante *paa1-1*.

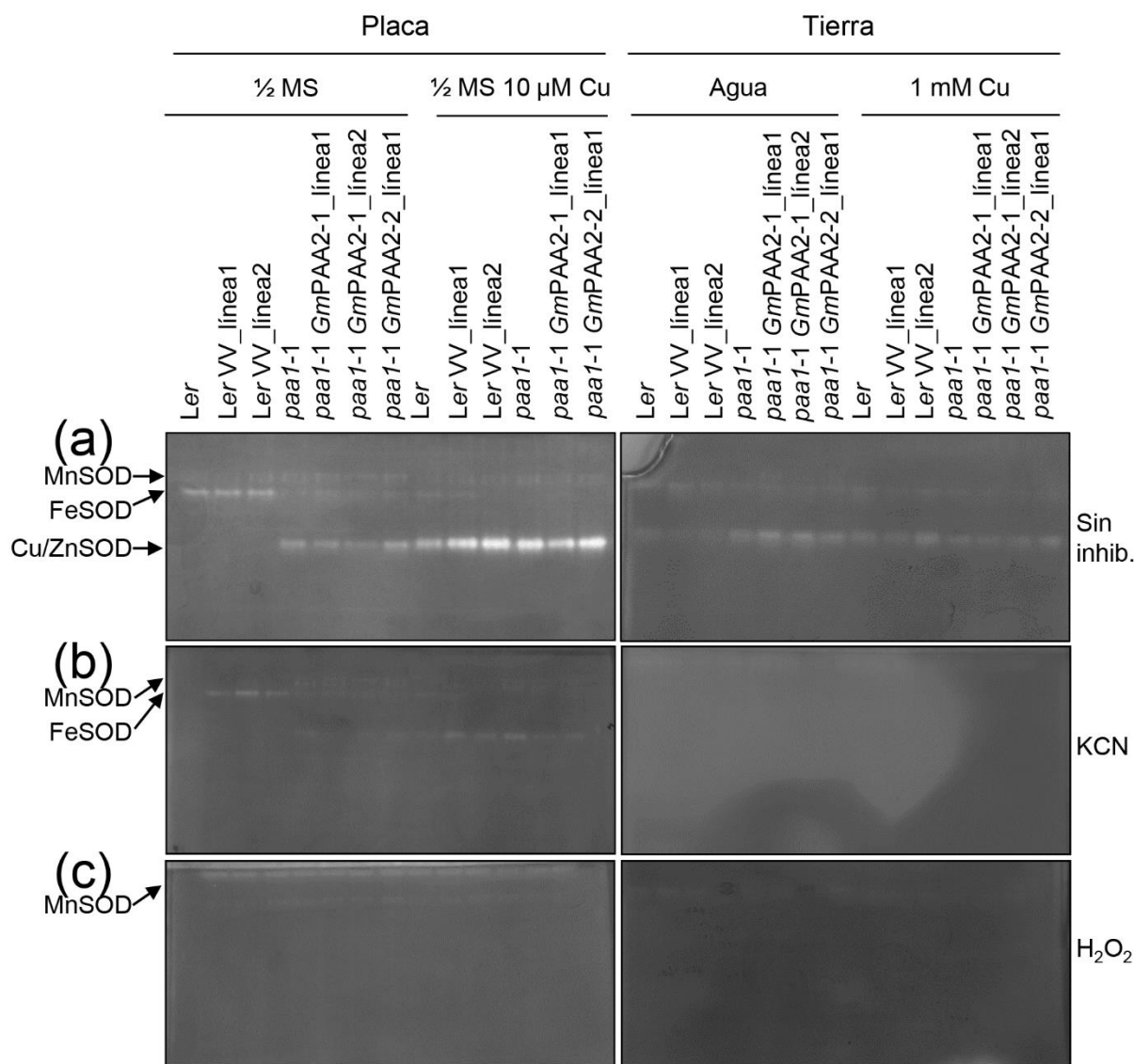


Figura 14. Ensayo de actividad SOD en las plantas Ler, dos líneas transgénicas independientes de plantas Ler con el vector vacío (Ler VV_línea1 y Ler VV_línea2), plantas *paa1-1*, dos líneas transgénicas independientes de plantas *paa1-1* expresando *GmPAA2-1* (*paa1-1 GmPAA2-1_línea1* y *paa1-1 GmPAA2-1_línea2*) y una línea transgénica de plantas *paa1-1* expresando *GmPAA2-2* (*paa1-1 GmPAA2-2_línea1*). Los geles fueron incubados (a) sin inhibidores; (b) con KCN, inhibidor de la Cu/ZnSOD o (c) con H₂O₂, inhibidor de la FeSOD y Cu/ZnSOD. Las plantas se cultivaron en placa con medio ½ MS con 1% (p/v) sacarosa (½ MS) o medio ½ MS con 1% (p/v) sacarosa y 10 µM CuSO₄ (½ MS 10 µM Cu), y en tierra regada con agua (agua) o con 1 mM CuSO₄ (1 mM Cu).

4) Análisis de la fluorescencia de la clorofila. Los mutantes *paa1* fueron identificados por primera vez por su fenotipo de alta fluorescencia de la clorofila (Shikanai y col., 2003). Esto es debido a que las plantas con defectos en el transporte electrónico fotosintético pueden mostrar un fenotipo de alta fluorescencia (Abdel-Ghany y col., 2005b). Dado que este es el rasgo fenotípico más característico de los mutantes *paa1*, se realizó un estudio de la

fluorescencia de la clorofila en las plantas *Ler*, dos líneas de plantas transgénicas independientes de plantas *Ler* con el vector vacío, plantas *paa1-1*, dos líneas transgénicas independientes de plantas *paa1-1* expresando *GmPAA2-1* y una línea transgénica de plantas *paa1-1* expresando *GmPAA2-2* crecidas en tierra regadas con agua o con 1 mM CuSO_4 y en placa con medio $\frac{1}{2}$ MS con 1% (p/v) sacarosa o $\frac{1}{2}$ MS con 1% (p/v) sacarosa y 10 μM CuSO_4 añadido (Figura 15).

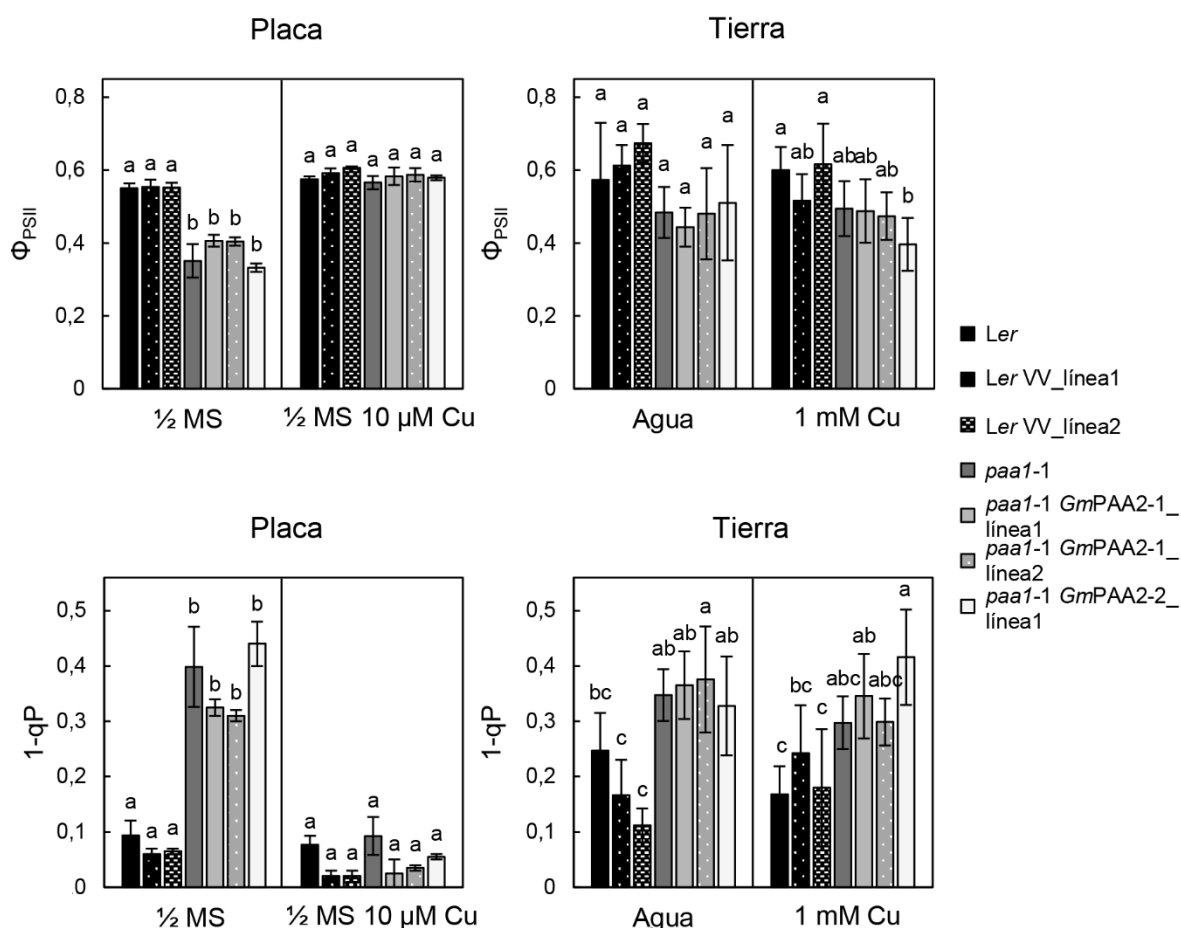


Figura 15. Parámetros de fluorescencia de la clorofila Φ_{PSII} y $1-qP$ en las plantas *Ler*, dos líneas transgénicas independientes de plantas *Ler* con el vector vacío (*Ler VV_linea1* y *Ler VV_linea2*), plantas *paa1-1*, dos líneas transgénicas independientes de plantas *paa1-1* expresando *GmPAA2-1* (*paa1-1 GmPAA2-1_linea1* y *paa1-1 GmPAA2-1_linea2*) y una línea transgénica de plantas *paa1-1* expresando *GmPAA2-2* (*paa1-1 GmPAA2-2_linea1*). Las plantas se cultivaron en placa con medio $\frac{1}{2}$ MS con 1% (p/v) sacarosa ($\frac{1}{2}$ MS), en placa con $\frac{1}{2}$ MS con 1% (p/v) sacarosa y 10 μM CuSO_4 añadido ($\frac{1}{2}$ MS 10 μM CuSO_4), en tierra regada con agua (agua) y en tierra regada con 1 mM CuSO_4 (1 mM Cu). Se muestran las medias de dos réplicas técnicas \pm la desviación estándar (plantas crecidas en placa) o al menos tres réplicas biológicas \pm la desviación estándar (plantas crecidas en tierra). Las letras distintas indican diferencias significativas entre los diferentes genotipos ($p < 0,05$).

En este caso, tanto las plantas crecidas en tierra como en placa mostraron resultados que indicaban una misma tendencia, viéndose el fenotipo de alta fluorescencia más claramente en los mutantes *paa1-1* crecidos en placa (Figura 15). En las plantas cultivadas en placa con medio ½ MS con 1% (p/v) sacarosa, el Φ_{PSII} (indicativo de la eficiencia fotoquímica del PSII) se ve disminuido en las plantas mutantes *paa1-1*, así como en las plantas *paa1-1* expresando *GmPAA2-1* y *GmPAA2-2*, respecto de las plantas silvestres *Ler*. Por otra parte, la proporción de centros de reacción de PSII cerrados ($1-qP$) se veía aumentado tanto en las plantas *paa1-1* como *paa1-1* expresando *GmPAA2-1* y *GmPAA2-2* en comparación con las plantas silvestres *Ler*. Estos resultados muestran que las plantas *paa1-1* expresando *GmPAA2-1* o *GmPAA2-2* tienen los mismos defectos fotosintéticos que los mutantes *paa1-1*, lo que indicaría que las proteínas de soja *GmPAA2-1* y *GmPAA2-2* no son capaces de complementar el fenotipo del mutante *paa1-1* de *A. thaliana*.

1.1.5.2. Complementación funcional del mutante *paa2-1* con *GmPAA2-1* y *GmPAA2-2*

A continuación se llevó a cabo la complementación funcional de los mutantes *paa2-1* con las proteínas de soja *GmPAA2-1* y *GmPAA2-2*. Para este experimento se utilizaron plantas silvestres Col-3, mutantes *paa2-1* y líneas transgénicas homocigotas *paa2-1* expresando las proteínas de soja *GmPAA2-1* y *GmPAA2-2* fusionadas o sin fusionar a la proteína YFP.

Excepto por la alta fluorescencia de la clorofila, los mutantes *paa2-1* no tienen ningún otro fenotipo visible (Abdel-Ghany y col., 2005b), por lo que se utilizaron diferentes medios de cultivo para intentar distinguir el fenotipo de los mutantes *paa2-1*. Las plantas silvestres Col-3, mutantes *paa2-1*, tres líneas transgénicas independientes homocigotas de plantas *paa2-1* expresando *GmPAA2-1*-YFP, una línea transgénica independiente de plantas *paa2-1* expresando *GmPAA2-1* y tres líneas transgénicas independientes homocigotas de plantas *paa2-1* expresando *GmPAA2-2*-YFP, se cultivaron en placas de cristal desprovistas de metales con medio Hoagland I y agar lavado sin Cu añadido o con 0,5 μM CuSO_4 (Figura 16), así como en placas de plástico con medio ½ MS suplementado con 0,1% (p/v) sacarosa (Figura 17) (ver apartado 1.3.2 de Materiales y Métodos). Como marcador de deficiencia de Cu, se utilizó el mutante *sp17-2* (y su respectivo ecotipo silvestre, Col-0), que tiene un severo fenotipo en condiciones de bajo Cu (Bernal y col., 2012). Las líneas de plantas descritas previamente se utilizaron para las medidas de peso fresco, análisis de la expresión de los transgenes, contenido en PC y patrón de actividad SOD.

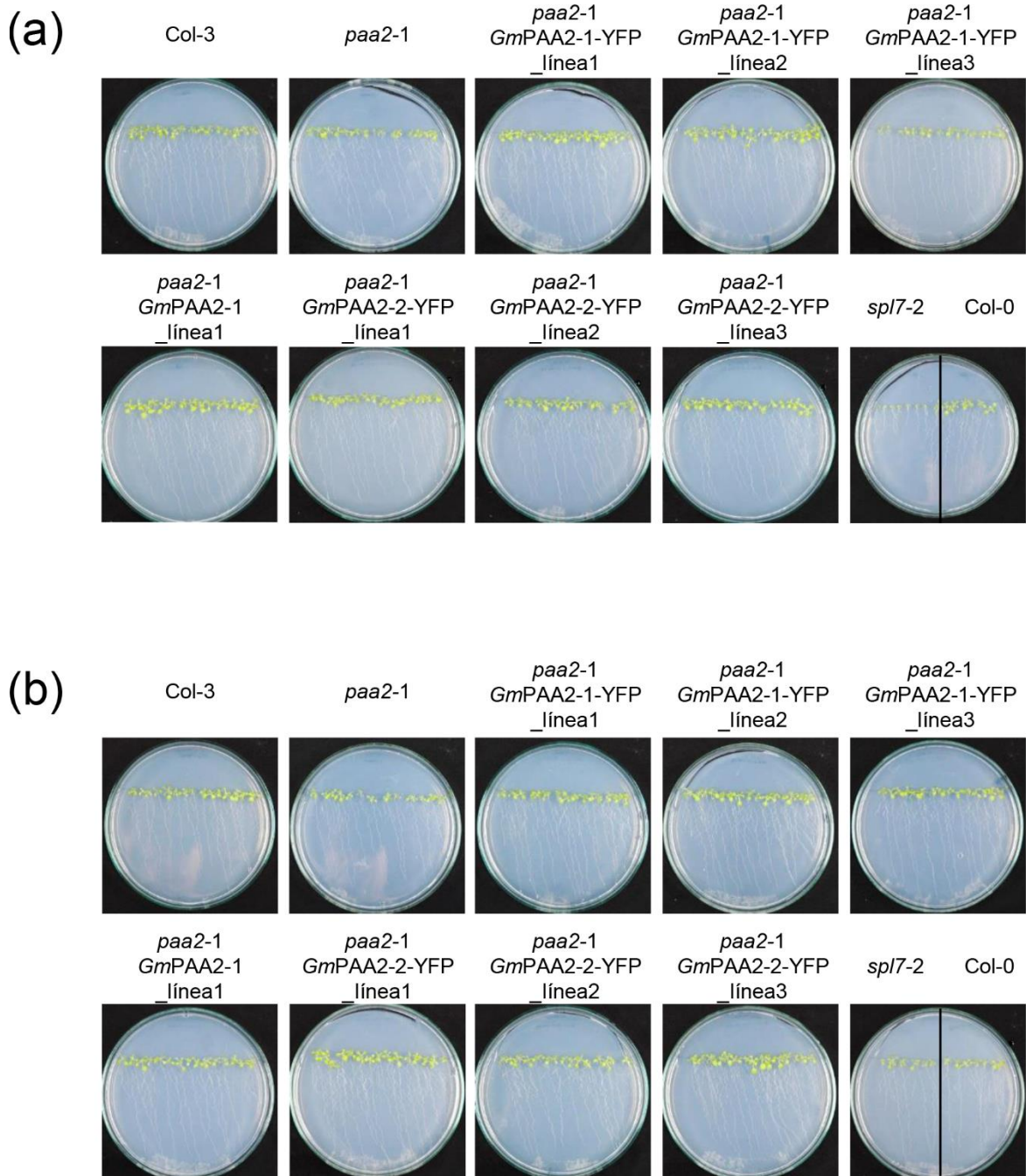


Figura 16. Cultivo en placas de cristal con agar lavado y medio Hoagland I (a) sin Cu añadido y (b) con 0,5 μM CuSO_4 . Las plantas cultivadas corresponden con Col-3, plantas *paa2-1*, tres líneas transgénicas independientes de plantas *paa2-1* expresando *GmPAA2-1-YFP* (*paa2-1 GmPAA2-1-YFP_línea1*, *paa2-1 GmPAA2-1-YFP_línea2* y *paa2-1 GmPAA2-1-YFP_línea3*), una línea transgénica de plantas *paa2-1* expresando *GmPAA2-1* (*paa2-1 GmPAA2-1_línea1*), tres líneas transgénicas independientes de plantas *paa2-1* expresando *GmPAA2-2-YFP* (*paa2-1 GmPAA2-2-YFP_línea1*, *paa2-1 GmPAA2-2-YFP_línea2* y *paa2-1 GmPAA2-2-YFP_línea3*), Col-0 y *spl7-2*.

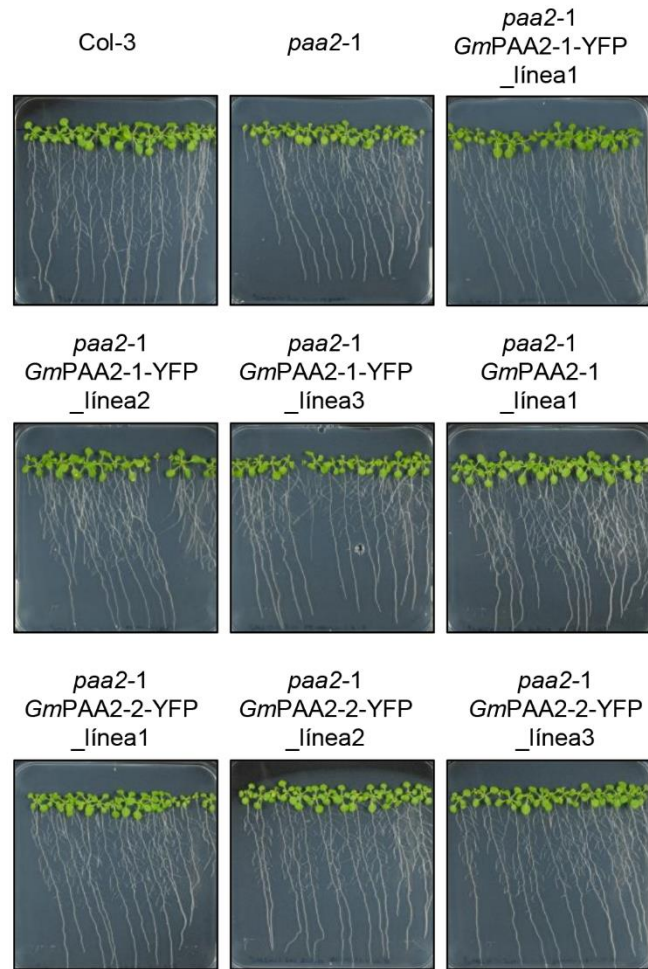


Figura 17. Cultivo en placas de plástico con medio $\frac{1}{2}$ MS con 0,1% (p/v) sacarosa de plantas Col-3, plantas *paa2-1*, tres líneas transgénicas independientes de plantas *paa2-1* expresando *GmPAA2-1-YFP* (*paa2-1 GmPAA2-1-YFP_línea1*, *paa2-1 GmPAA2-1-YFP_línea2* y *paa2-1 GmPAA2-1-YFP_línea3*), una línea transgénica de plantas *paa2-1* expresando *GmPAA2-1* (*paa2-1 GmPAA2-1_línea1*) y tres líneas transgénicas independientes de plantas *paa2-1* expresando *GmPAA2-2-YFP* (*paa2-1 GmPAA2-2-YFP_línea1*, *paa2-1 GmPAA2-2-YFP_línea2* y *paa2-1 GmPAA2-2-YFP_línea3*).

Por otra parte, el análisis de la fluorescencia de la clorofila se realizó en plantas silvestres Col-3, mutantes *paa2-1*, dos líneas transgénicas independientes homocigotas de *paa2-1* expresando *GmPAA2-1-YFP*, dos líneas transgénicas independientes homocigotas de *paa2-1* expresando *GmPAA2-1*, una línea transgénica homocigota de *paa2-1* expresando *GmPAA2-2-YFP* y tres líneas transgénicas independientes homocigotas de *paa2-1* expresando *GmPAA2-2*. Estas plantas se cultivaron directamente en tierra y se regaron con agua corriente.

En las plantas crecidas en placas con medio Hoagland I sin la adición de Cu o con 0,5 μM CuSO_4 (Figura 16), no se observaron diferencias visibles en el fenotipo de los mutantes

paa2-1. En cambio, los mutantes *sp17-2* mostraron un crecimiento reducido frente a las plantas silvestres Col-0 en medio Hoagland I sin Cu añadido, observaciones concordantes con estudios previos, donde se advertía la sensibilidad de los mutantes *sp17-2* a la deficiencia de Cu (Bernal y col., 2012)

1) Análisis del peso fresco. Las plantas crecidas tanto en placas de cristal con medio Hoagland I sin Cu añadido y con 0,5 μM CuSO_4 como de plástico con medio $\frac{1}{2}$ MS con 0,1% (p/v) sacarosa (Figuras 16,17) se cosecharon y se determinó el peso fresco (Figura 18). En las plantas crecidas en placas de cristal no se observaron diferencias significativas en la biomasa de las plantas silvestres Col-3 y mutantes *paa2-1* en medio Hoagland I sin Cu añadido, sin embargo, en medio Hoagland I con 0,5 μM CuSO_4 añadido, las plantas Col-3 mostraron un peso fresco mayor que los mutantes *paa2-1*. En el caso de las plantas crecidas en medio $\frac{1}{2}$ MS con 0,1% (p/v) sacarosa, los mutantes *paa2-1* mostraron un crecimiento reducido en comparación con las plantas silvestres Col-3. Varias de las líneas *paa2-1* expresando *GmPAA2-1-YFP* o *GmPAA2-2-YFP*, mostraron un peso fresco significativamente mayor que las plantas mutantes *paa2-1*, aunque menor que las Col-3; y las plantas *paa2-1* expresando *GmPAA2-1*, presentaron un peso similar a las plantas silvestres. Estos datos podrían indicar que las proteínas *GmPAA2-1-YFP* y *GmPAA2-2-YFP* podrían suponer una mejora en el crecimiento de los mutantes *paa2-1* y que, especialmente la proteína de soja *GmPAA2-1*, podría complementar al mutante *paa2-1*.

Las plantas crecidas en placas de cristal con medio Hoagland I sin Cu añadido y con 0,5 μM CuSO_4 (Col-3, *paa2-1*, *paa2-1* expresando *GmPAA2-1-YFP*, *paa2-1* expresando *GmPAA2-1* y *paa2-1* expresando *GmPAA2-2*) se utilizaron para ver la expresión de los transgenes por PCR semicuantitativa. Para ello se extrajo ARN, se sintetizó el ADNc y se amplificó por PCR un fragmento de los transgenes con cebadores que amplificaban tanto *GmPAA2-1* como *GmPAA2-2* (Figura 19). Se vio que tanto en el medio Hoagland I sin Cu añadido como en el medio Hoagland I con 0,5 μM CuSO_4 , los transgenes se expresaban en todas las líneas y las que mostraron una expresión mayor fueron las líneas *paa2-1* expresando *GmPAA2-2-YFP*, especialmente la línea 1.

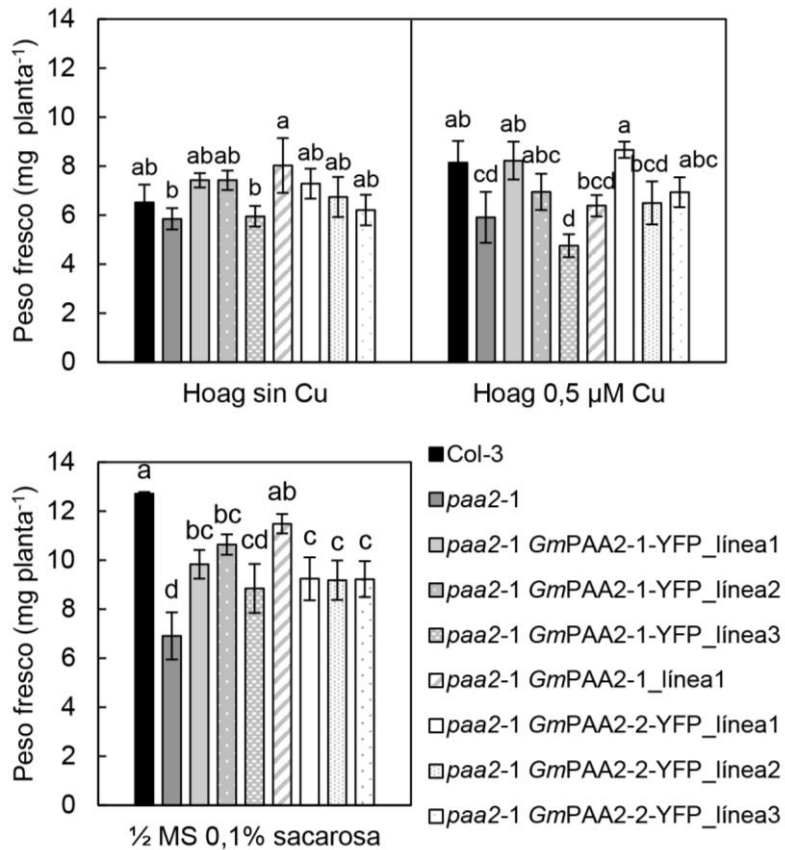


Figura 18. Peso fresco de las plantas Col-3, plantas *paa2-1*, tres líneas transgénicas independientes de plantas *paa2-1* expresando *GmPAA2-1-YFP* (*paa2-1* *GmPAA2-1-YFP_línea1*, *paa2-1* *GmPAA2-1-YFP_línea2* y *paa2-1* *GmPAA2-1-YFP_línea3*), una línea transgénica de plantas *paa2-1* expresando *GmPAA2-1* (*paa2-1* *GmPAA2-1_línea1*) y tres líneas transgénicas independientes de plantas *paa2-1* expresando *GmPAA2-2-YFP* (*paa2-1* *GmPAA2-2-YFP_línea1*, *paa2-1* *GmPAA2-2-YFP_línea2* y *paa2-1* *GmPAA2-2-YFP_línea3*), crecidas en placas de cristal con medio Hoagland I sin Cu añadido (Hoag sin Cu) o con 0,5 μM CuSO₄ (Hoag 0,5 μM Cu) y placas de plástico con medio 1/2 MS con 0,1% (p/v) sacarosa (1/2 MS 0,1% sacarosa). Se muestran las medias de tres réplicas biológicas ± la desviación estándar. Las letras distintas indican diferencias significativas entre los diferentes genotipos (p<0,05).

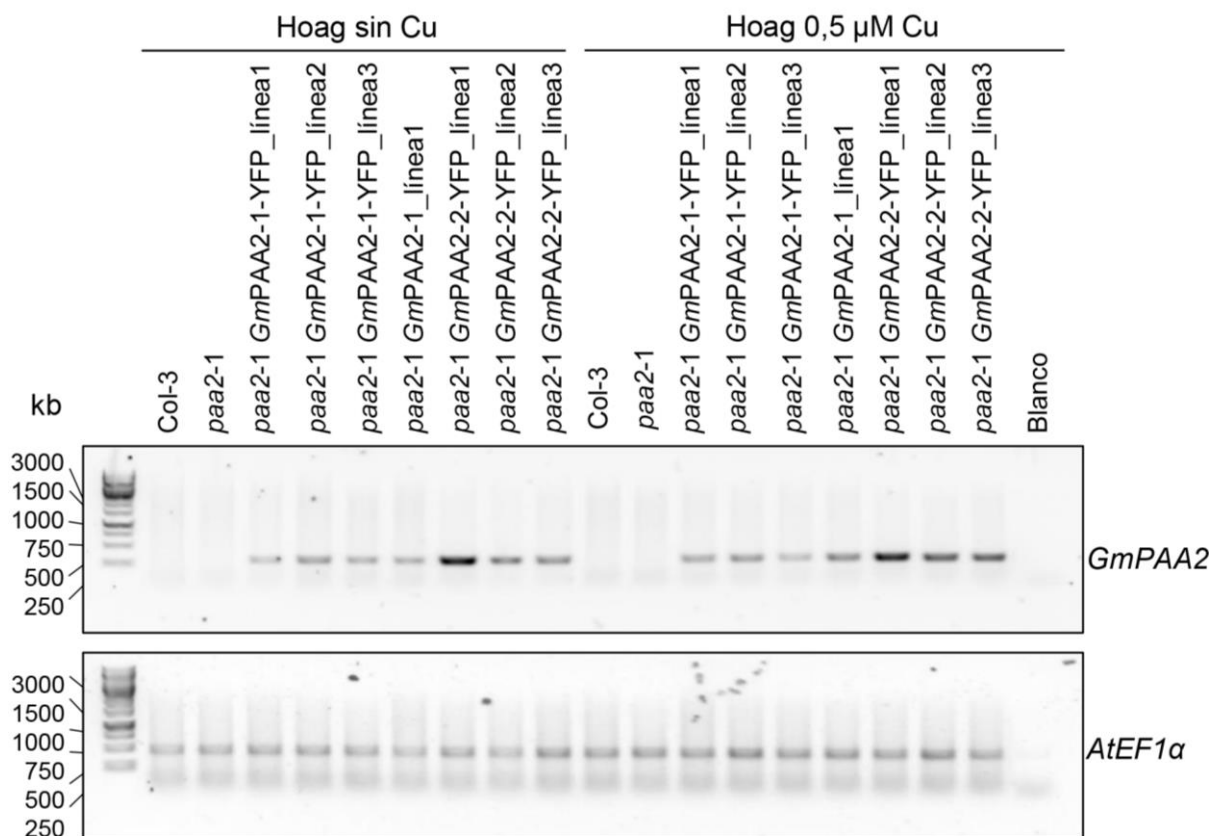


Figura 19. Análisis por PCR semicuantitativa de la expresión de los transgenes *GmPAA2-1-YFP*, *GmPAA2-1* y *GmPAA2-2-YFP* en las plantas Col-3, plantas *paa2-1*, tres líneas transgénicas independientes de plantas *paa2-1* expresando *GmPAA2-1-YFP* (*paa2-1 GmPAA2-1-YFP_línea1*, *paa2-1 GmPAA2-1-YFP_línea2* y *paa2-1 GmPAA2-1-YFP_línea3*), una línea transgénica de plantas *paa2-1* expresando *GmPAA2-1* (*paa2-1 GmPAA2-1_línea1*) y tres líneas transgénicas independientes de plantas *paa2-1* expresando *GmPAA2-2-YFP* (*paa2-1 GmPAA2-2-YFP_línea1*, *paa2-1 GmPAA2-2-YFP_línea2* y *paa2-1 GmPAA2-2-YFP_línea3*), cultivadas en placas de cristal con medio Hoagland I sin Cu añadido (Hoag sin Cu) o con 0,5 μM CuSO_4 añadido (Hoag 0,5 μM Cu). El gen *AtEF1 α* se utilizó como control.

2) Análisis del contenido de PC. A continuación se llevó a cabo el estudio de la cantidad de PC en forma de apo- y holoenzima en plantas crecidas en medio Hoagland I sin Cu añadido o con 0,5 μM CuSO_4 , utilizando anticuerpos anti-PC. Se ha visto que en las plantas mutantes *paa2*, la PC se acumula en forma de apoproteína y la holoproteína es difícilmente detectable, mientras que en las plantas silvestres de *A. thaliana* hay una mayor cantidad de holo-PC en condiciones control (Abdel-Ghany y col., 2005b). Para realizar este ensayo, se extrajeron las proteínas vegetales, se separaron por PAGE en condiciones no desnaturizantes y se realizó un inmunoensayo con anticuerpos anti-PC (Figura 20).

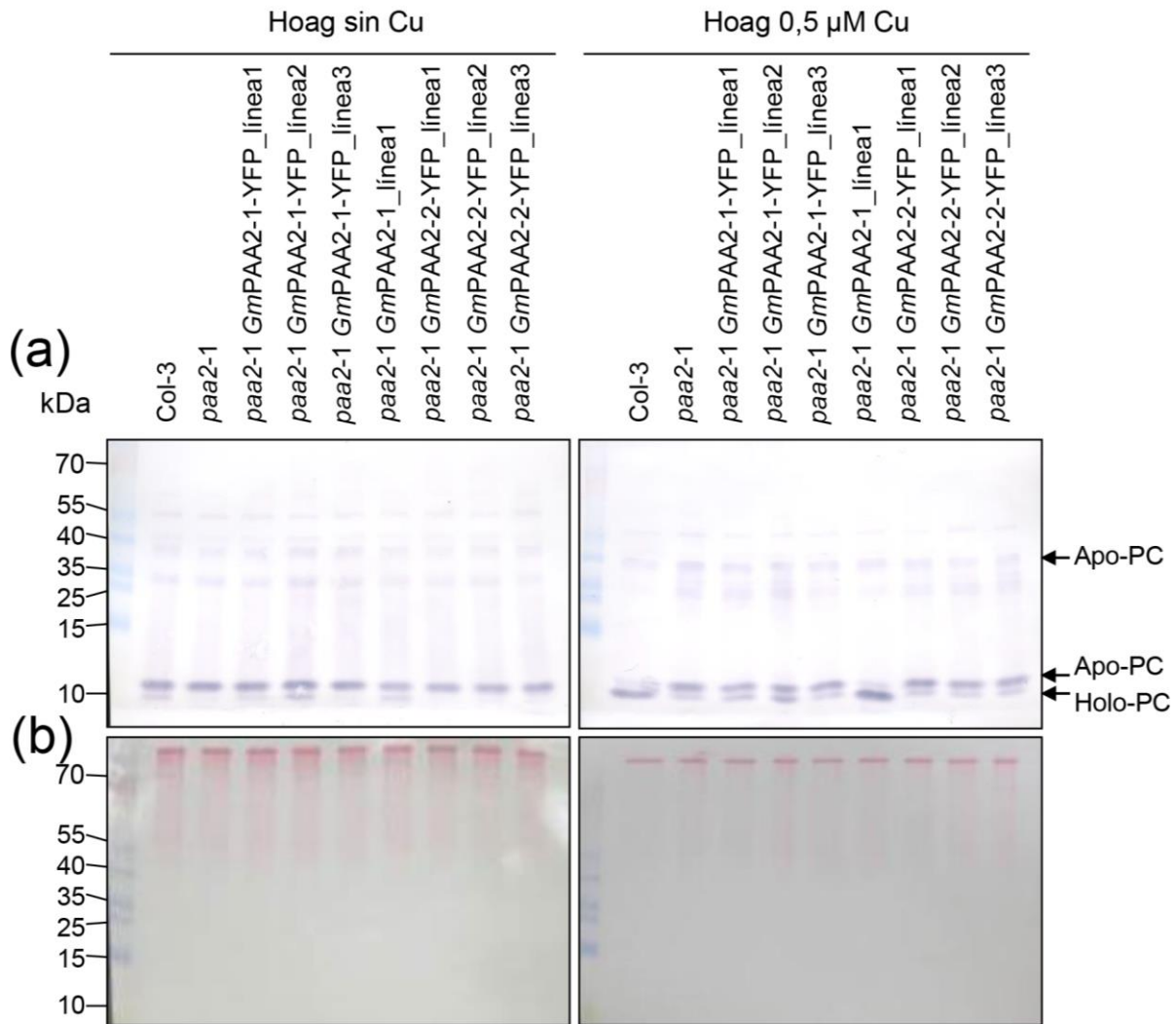


Figura 20. Análisis del contenido de PC en las plantas Col-3, plantas *paa2-1*, tres líneas transgénicas independientes de plantas *paa2-1* expresando *GmPAA2-1-YFP* (*paa2-1 GmPAA2-1-YFP_línea1*, *paa2-1 GmPAA2-1-YFP_línea2* y *paa2-1 GmPAA2-1-YFP_línea3*), una línea transgénica de plantas *paa2-1* expresando *GmPAA2-1* (*paa2-1 GmPAA2-1_línea1*) y tres líneas transgénicas independientes de plantas *paa2-1* expresando *GmPAA2-2-YFP* (*paa2-1 GmPAA2-2-YFP_línea1*, *paa2-1 GmPAA2-2-YFP_línea2* y *paa2-1 GmPAA2-2-YFP_línea3*) por PAGE en condiciones no desnaturalizantes. (a) Western blot con anticuerpos anti-PC; (b) tinción rojo Ponceau. Las plantas se cultivaron en placas de cristal con medio Hoagland I sin Cu añadido (Hoag sin Cu) o con 0,5 μM CuSO₄ (Hoag 0,5 μM Cu).

En los cultivos en medio Hoagland I sin Cu añadido, la PC se encuentra mayoritariamente en forma de apoproteína en todos los genotipos testados, debido probablemente a la baja concentración de Cu en el medio. A pesar de ello, en estas condiciones también puede detectarse una pequeña fracción de PC en forma de holoproteína en las plantas Col-3, así como en las *paa2-1* expresando *GmPAA2-1-YFP* (líneas 1 y 2) y *paa2-1* expresando *GmPAA2-1*. En los cultivos en medio Hoagland I con 0,5 μM CuSO₄

(Figura 20), los resultados indicaron que las plantas silvestres Col-3 tienen un mayor contenido en holo-PC que los mutantes *paa2-1*, que tienen más apo-PC. En el caso de las plantas *paa2-1* expresando *GmPAA2-1*, se vio un contenido en holo-PC semejante al silvestre, lo que sugiere que la proteína *GmPAA2-1* podría complementar al mutante *paa2-1*. Las plantas *paa2-1* expresando *GmPAA2-1-YFP* mostraron un contenido mayor de holo-PC que los mutantes *paa2-1*, aunque menor que las plantas silvestres Col-3, observándose diferencias entre las líneas independientes, debido probablemente a un diferente comportamiento, como se ha visto en numerosos estudios (Zhang y col., 2010; Tanaka y col., 2011; Mu y col., 2013; Wang y col., 2014; Xu y col., 2014; Liu y col., 2015b). Las plantas *paa2-1* expresando *GmPAA2-2-YFP* mostraron un contenido de apo-PC similar a *paa2-1*, teniendo un fenotipo muy similar a las plantas mutantes *paa2-1* (Figura 20). En conjunto, el análisis del contenido de PC en forma de holoproteína o apoproteína indica que la proteína *GmPAA2-1* es capaz de complementar el mutante *paa2-1*. A su vez, la proteína de fusión *GmPAA2-1-YFP* parece complementar parcialmente al mutante *paa2-1* con menor eficiencia que la proteína sin YFP, debido, probablemente, a un posible efecto negativo de la fusión con la YFP. En cambio, la proteína *GmPAA2-2-YFP* parece no complementar al mutante *paa2-1*.

3) Análisis de la actividad SOD. En estudios previos se ha visto que en las plantas *paa2-1*, la actividad de FeSOD se reduce ligeramente, mientras que la actividad CSD1 y CSD2 aumenta respecto de las plantas silvestres (Abdel-Ghany y col., 2005b). Para analizar la actividad SOD, se realizó un ensayo en extractos crudos de las plantas Col-3, *paa2-1*, *paa2-1* expresando *GmPAA2-1-YFP*, *GmPAA2-1* o *GmPAA2-2-YFP*, crecidas en placas con medio Hoagland I sin Cu añadido y en medio Hoagland I con 0,5 μM CuSO_4 (Figura 21). El ensayo de actividad SOD reveló una diferencia muy ligera entre las plantas Col-3 y *paa2-1* crecidas en medio Hoagland I con 0,5 μM CuSO_4 (Figura 21). Las plantas *paa2-1* expresando *GmPAA2-1* parecen tener una actividad SOD similar a las plantas silvestres, aunque como ya hemos comentado, el fenotipo es muy sutil en las condiciones testadas. En las plantas crecidas en medio Hoagland I sin adición de Cu, no se aprecia el fenotipo de los mutantes (Figura 21).

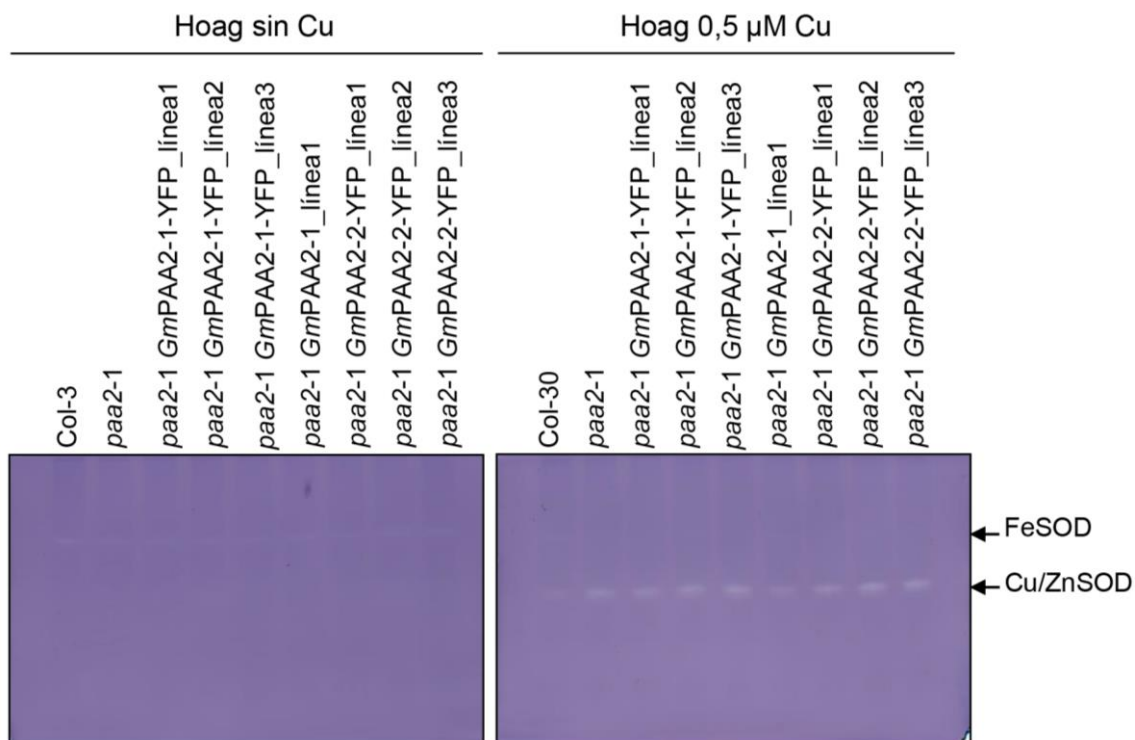


Figura 21. Ensayo de actividad SOD en extractos crudos de las plantas Col-3, plantas *paa2-1*, tres líneas transgénicas independientes de plantas *paa2-1* expresando *GmPAA2-1-YFP* (*paa2-1 GmPAA2-1-YFP_línea1*, *paa2-1 GmPAA2-1-YFP_línea2* y *paa2-1 GmPAA2-1-YFP_línea3*), una línea transgénica de plantas *paa2-1* expresando *GmPAA2-1* (*paa2-1 GmPAA2-1_línea1*) y tres líneas transgénicas independientes de plantas *paa2-1* expresando *GmPAA2-2-YFP* (*paa2-1 GmPAA2-2-YFP_línea1*, *paa2-1 GmPAA2-2-YFP_línea2* y *paa2-1 GmPAA2-2-YFP_línea3*). Las plantas se cultivaron en placas de cristal con medio Hoagland I sin Cu añadido (Hoag sin Cu) o con medio Hoagland I con 0,5 µM Cu (Hoag 0,5 µM Cu).

4) Análisis de la fluorescencia de la clorofila. Se realizó un estudio de la fotosíntesis a través de la fluorescencia de la clorofila en plantas crecidas directamente en tierra y regadas con agua corriente. Los mutantes *paa2-1* se identificaron gracias a que tienen un fenotipo de alta fluorescencia de la clorofila (Abdel-Ghany y col., 2005b) (Figura 22). Para este estudio se utilizaron plantas silvestres Col-3, mutantes *paa2-1*, *paa2-1* expresando *GmPAA2-1-YFP* (2 líneas transgénicas homocigotas independientes), *paa2-1* expresando *GmPAA2-1* (2 líneas transgénicas homocigotas independientes), *paa2-1* expresando *GmPAA2-2-YFP* (1 línea transgénica homocigota) y *paa2-1* expresando *GmPAA2-2* (3 líneas transgénicas homocigotas independientes). En las plantas mutantes *paa2-1*, la eficiencia fotoquímica del PSII (Φ_{PSII}) es menor que en las plantas silvestres Col-3. A su vez, en las plantas *paa2-1* expresando *GmPAA2-1* (líneas 1 y 2) y *GmPAA2-1-YFP* (línea 2), el Φ_{PSII} es comparable a las plantas silvestres Col-3. Por otra parte, las plantas *paa2-1* expresando tanto *GmPAA2-2-*

YFP como *GmPAA2-2*, tienen un Φ_{PSII} similar a las plantas *paa2-1* (Figura 22), de acuerdo con el contenido de holo-PC (Figura 20).

El análisis de la proporción de centros de reacción de PSII cerrados ($1-qP$) mostró un mayor valor en las plantas *paa2-1* en comparación con las plantas silvestres. Las plantas *paa2-1* expresando *GmPAA2-1-YFP* (línea 2) y *paa2-1* expresando *GmPAA2-1* (líneas 1 y 2) tienen un valor de $1-qP$ menor, similar a las plantas silvestres. Por otra parte, las plantas *paa2-1* expresando *GmPAA2-2-YFP* o *GmPAA2-2*, mostraron un valor de $1-qP$ elevado, similar a las plantas *paa2-1* (Figura 22), de acuerdo con la menor cantidad de holo-PC (Figura 20).

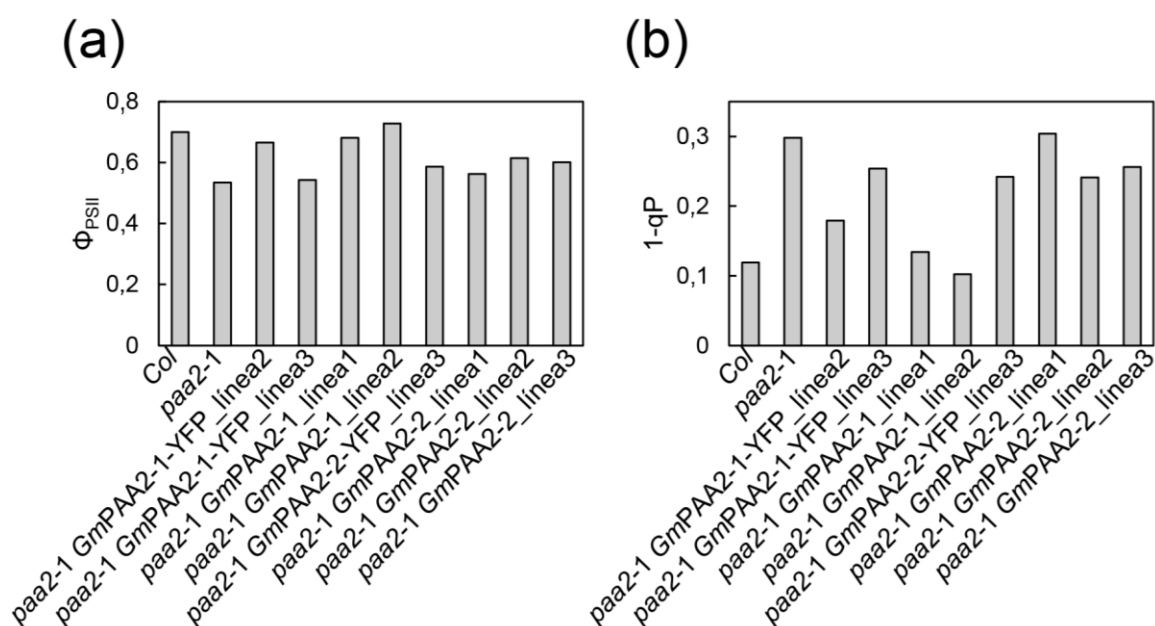


Figura 22. Parámetros de fluorescencia (a) Φ_{PSII} y (b) $1-qP$ en las plantas Col-3, plantas *paa2-1*, dos líneas transgénicas independientes de plantas *paa2-1* expresando *GmPAA2-1-YFP* (*paa2-1 GmPAA2-1-YFP_línea2* y *paa2-1 GmPAA2-1-YFP_línea3*), dos líneas transgénicas independientes de plantas *paa2-1* expresando *GmPAA2-1* (*paa2-1 GmPAA2-1_línea1* y *paa2-1 GmPAA2-1_línea2*), una línea transgénica de plantas *paa2-1* expresando *GmPAA2-2-YFP* (*paa2-1 GmPAA2-2-YFP_línea1*) y tres líneas transgénicas independientes de plantas *paa2-1* expresando *GmPAA2-2* (*paa2-1 GmPAA2-2_línea1*, *paa2-1 GmPAA2-2_línea2* y *paa2-1 GmPAA2-2_línea3*) crecidas en tierra y regadas con agua corriente.

En conjunto, los resultados indican que la proteína *GmPAA2-1*, con elevada identidad con *AtPAA2*, es capaz de realizar la función de *AtPAA2* al complementar el mutante *paa2-1* y restablecer su fenotipo. A su vez, la fusión de la proteína *GmPAA2-1* a la YFP (*GmPAA2-1-YFP*) parece complementar solo parcialmente al mutante *paa2-1*, en especial la línea 2, lo que podría ser debido a una interferencia de la proteína YFP en el correcto funcionamiento del transportador *GmPAA2-1*. En cambio, la proteína *GmPAA2-2* parece no complementar al mutante *paa2-1*. Esta proteína podría tener, por tanto, una función diferente a la de *AtPAA2*.

1.2. LOCALIZACIÓN DE *GmPAA2-1* y *GmPAA2-2*

1.2.1. Expresión transitoria de *GmPAA2-1* y *GmPAA2-2* en protoplastos de *A. thaliana*

La localización de las proteínas *GmPAA2-1* y *GmPAA2-2* se estudió mediante la expresión transitoria en protoplastos de *A. thaliana* transformados con las construcciones en el vector pEarleyGate101 (ver apartados 1.3.4 y 2.6.3 de Materiales y Métodos) con *GmPAA2-1* y *GmPAA2-2* bajo el control del promotor constitutivo 35S CaMV, y fusionadas a la proteína YFP en la región C-terminal (Figura 23). Se eligió este modelo con la proteína en el extremo C-terminal, ya que las proteínas *GmPAA2-1* y *GmPAA2-2* tienen un péptido señal de tránsito al cloroplasto en la región N-terminal que podría ser procesado.

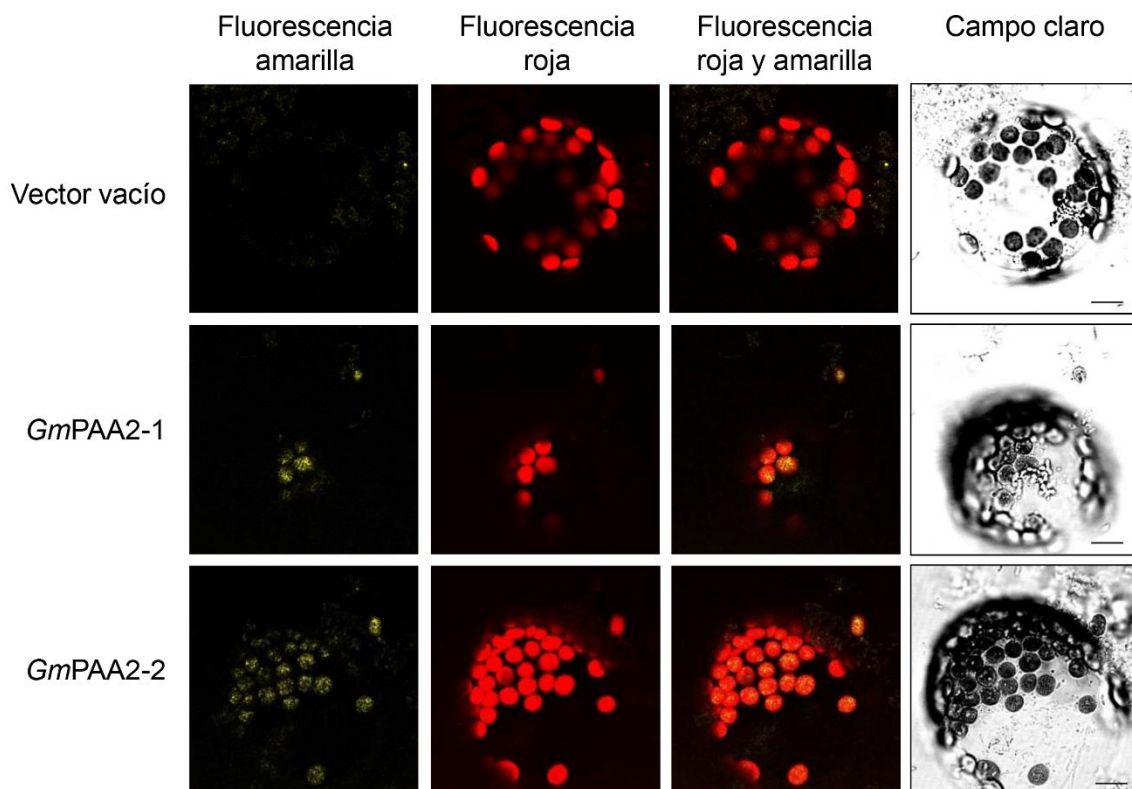


Figura 23. Localización subcelular de las proteínas *GmPAA2-1* y *GmPAA2-2*. Los protoplastos de *A. thaliana* fueron transformados con las construcciones de los genes *GmPAA2-1* y *GmPAA2-2* bajo el control del promotor constitutivo 35S CaMV. Se utilizó el vector vacío como control. Tras 16 h de expresión, los protoplastos fueron observados utilizando un microscopio de barrido láser confocal. Las barras de escala corresponden con 10 µm.

Los protoplastos transformados se analizaron por microscopía laser confocal, como control se utilizaron protoplastos transformados con el vector vacío. Los resultados indicaron

que ambas proteínas *GmPAA2-1*-YFP y *GmPAA2-2*-YFP se localizan en los cloroplastos (Figura 23).

1.2.2. Expresión estable de *GmPAA2-1* y *GmPAA2-2* en plantas transgénicas de *A. thaliana*

La localización de las proteínas *GmPAA2-1* y *GmPAA2-2* se estudió, a su vez, mediante la generación de plantas transgénicas homocigotas *paa2-1* que expresaban las proteínas *GmPAA2-1* y *GmPAA2-2* fusionadas a la proteína YFP en la región C-terminal bajo el control del promotor constitutivo 35S CaMV (Figura 24).

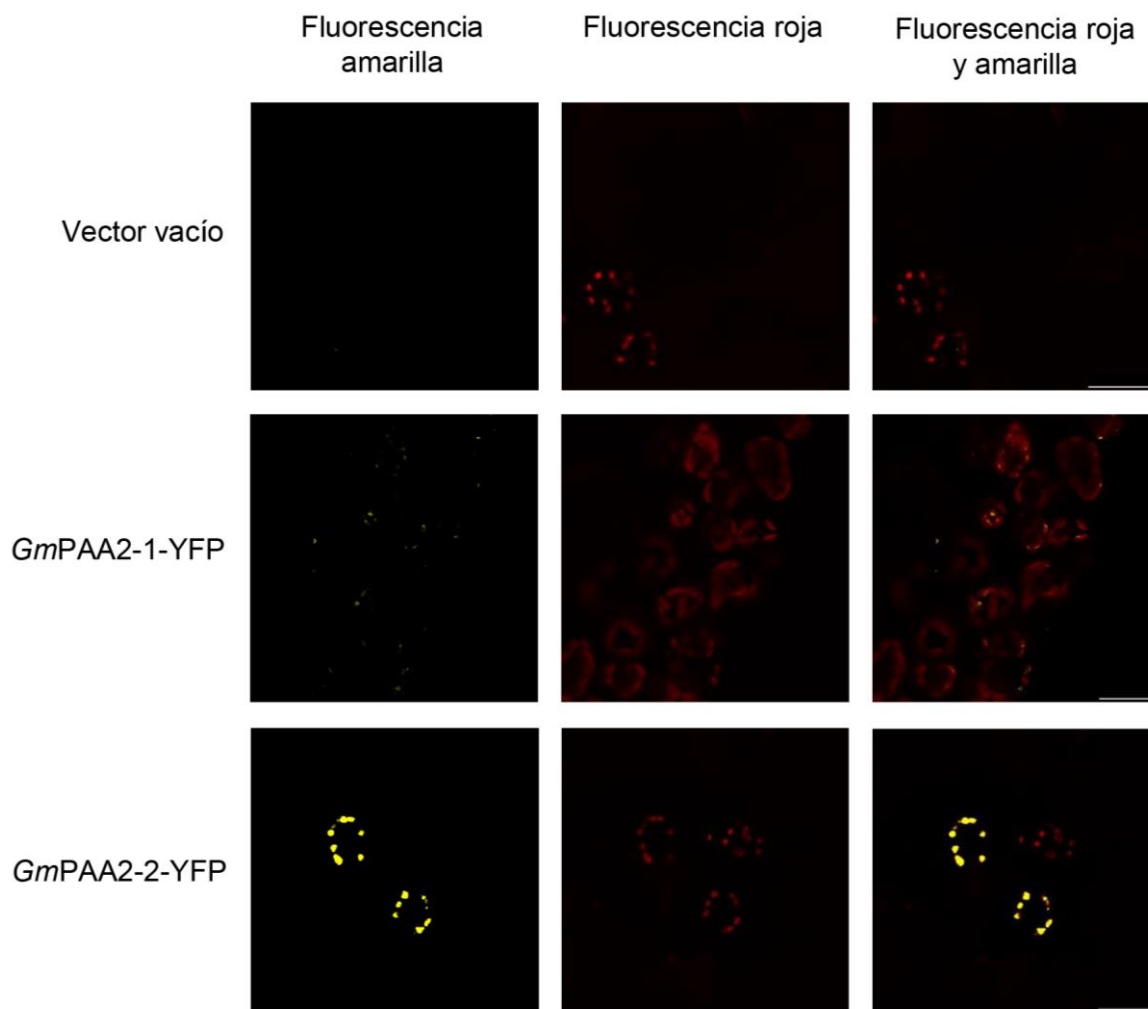


Figura 24. Localización subcelular de las proteínas *GmPAA2-1* y *GmPAA2-2*. Las plantas transgénicas homocigotas con las construcciones de los genes *GmPAA2-1* y *GmPAA2-2* bajo el control del promotor constitutivo 35S CaMV y con el vector vacío como control, se observaron utilizando un microscopio de barrido láser confocal. Las barras de escala corresponden con 25 μ m.

Estas líneas de plantas transgénicas fueron las mismas que se utilizaron para la complementación de los mutantes *paa2-1* (apartado 1.1.5.2). Como control se utilizaron plantas transgénicas homocigotas con los vectores vacíos. El análisis de las plantas por microscopía láser confocal mostró que la señal de la proteína *GmPAA2-1-YFP* parece corresponder con una localización cloroplástica. A su vez, la proteína *GmPAA2-2-YFP* parece tener también localización cloroplástica, mostrando una fuerte señal en los cloroplastos de las células oclusivas (Figura 24).

1.3. ANÁLISIS Y REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL DE PAA2

1.3.1. Análisis de la actividad del promotor de *AtPAA2*

La secuencia del promotor del gen *AtPAA2* se amplificó y clonó en el vector pMDC163 (Curtis y Grossniklaus, 2003) mediante la tecnología Gateway. Este vector facilita la detección de la actividad del promotor mediante la tinción histoquímica GUS (apartados 2.6.3 y 4.4 de Materiales y Métodos). Para el análisis del patrón de expresión del promotor *AtPAA2* se generaron líneas transgénicas homocigotas estables en ecotipo Col-0. En cambio, numerosos intentos para clonar los promotores de los genes *GmPAA2-1* y *GmPAA2-2* fueron infructuosos.

La secuencia promotora del gen *AtPAA2*, incluyendo 465 nucleótidos por delante del inicio de la traducción y 90 nucleótidos aguas abajo, se analizó con la herramienta PlantPAN (Chang y col., 2008) (Figura 25). El análisis de las secuencias mostró una gran cantidad de elementos reguladores, especialmente en las regiones localizadas entre -280 y -263 y entre -100 y -122: 1) elementos de respuesta a la luz como el motivo conservado GATA, de unión al factor de transcripción ASF-2 (*Activating Sequence Factor-2*) presente en genes de respuesta a la luz (Lam y Chua, 1989); secuencias G-box de unión a GBF (*G-box Binding Factor*) presente en el promotor del gen *RBCS* (*Ribulose 1,5-Bisphosphate Carboxylase/Oxygenase*) regulado por luz (Giuliano y col., 1988); de unión a HY5 (*Elongated Hypocotyl 5*) y al factor de transcripción PIF3 (*Phytochrome Interacting Factor 3*) (Martínez-García y col., 2000); elementos GT-1 presentes en genes regulados por luz (Terzaghi y Cashmore, 1995); elementos SORLIP (*Sequences Over-Represented in Light-Induced Promoters*) (Hudson y Quail, 2003); elementos T-box que pueden ser moduladores en genes activados por luz como *GAPB* (*Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase B*) (Chan y col., 2001); 2) elementos de respuesta a ABA (ácido abscísico) (Guiltinan y col., 1990; Iwasaki y col., 1995; Kim y col., 1997; Choi y col., 2000; Hattori y col., 2002; Abe y col., 2003; Kaplan y col., 2006); 3) secuencias de unión al regulador de la respuesta ARR1 (*Arabidopsis Response*

Regulator 1) (Sakai y col., 2000), implicado en la regulación por citoquininas (Kurepa y col., 2014); 4) elementos de respuesta a auxinas (AuxRE), de unión a los factores de transcripción sensibles a auxinas (ARFs) (Ulmasov y col., 1999); 5) secuencias presentes en los genes regulados por GA (giberelinas) (Ogawa y col., 2003); 6) secuencias MADS-box (*MCM1*, *AG*, *ARG80*, *DEF A*, *SRF box*), de unión del factor de transcripción AG (*Agamous*), implicado en el control del desarrollo floral (Huang y col., 1993) y de unión al factor de transcripción AGL3 (*Agamous-Like 3*) (Huang y col., 1995); 7) elementos de respuesta a la deficiencia de azufre (SURE) (Maruyama-Nakashita y col., 2005); 8) elementos de unión al factor de transcripción RAV1 (*Related to ABI3/VP1*) (Kagaya y col., 1999), implicado probablemente en la maduración y senescencia de las hojas (Woo y col., 2010); 9) una secuencia G-box, que podría ser necesaria para mantener un elevado nivel de actividad del promotor (Chandrasekharan y col., 2003); 10) una secuencia de unión del factor de transcripción CDC5 (*Cell Division Cycle 5*), probablemente implicado en la regulación del ciclo celular (Hirayama y Shinozaki, 1996); y 11) un elemento W-box, que podría ser la diana de las proteínas de unión a ADN WRKY (Trp, Arg, Lys, Tyr) y que son, a su vez, inducidas por ácido salicílico en la infección por patógenos (Yu y col., 2001).

La actividad del promotor del gen *AtPAA2* se analizó mediante la tinción histoquímica GUS en cuatro líneas transgénicas homocigotas independientes de plantas generadas en ecotipo Col-0. Las plantas fueron crecidas en placas de plástico en diferentes condiciones nutricionales de Cu ($\frac{1}{2}$ MS con 1% (p/v) sacarosa o $\frac{1}{2}$ MS con 1% (p/v) sacarosa y 10 μ M CuSO₄ añadido) y diferentes condiciones de iluminación ($\frac{1}{2}$ MS con 1% (p/v) sacarosa cultivadas con baja luz o elevada luz) (apartado 1.3.2 de Materiales y Métodos) (Figura 26).

Las plantas mostraron una elevada actividad del promotor de *AtPAA2* (Figura 26) especialmente en el limbo de las hojas. También se observó la actividad en los haces vasculares y peciolo, mientras que la actividad era reducida en las hojas más jóvenes y las raíces. Las plantas crecidas en medio con Cu añadido podrían tener una leve disminución de la actividad del promotor de *AtPAA2* respecto de las plantas crecidas en medio sin Cu añadido (Figura 26). Esta diferencia de actividad parece ser muy sutil, y el promotor parece ser activo en los mismos órganos de la planta.

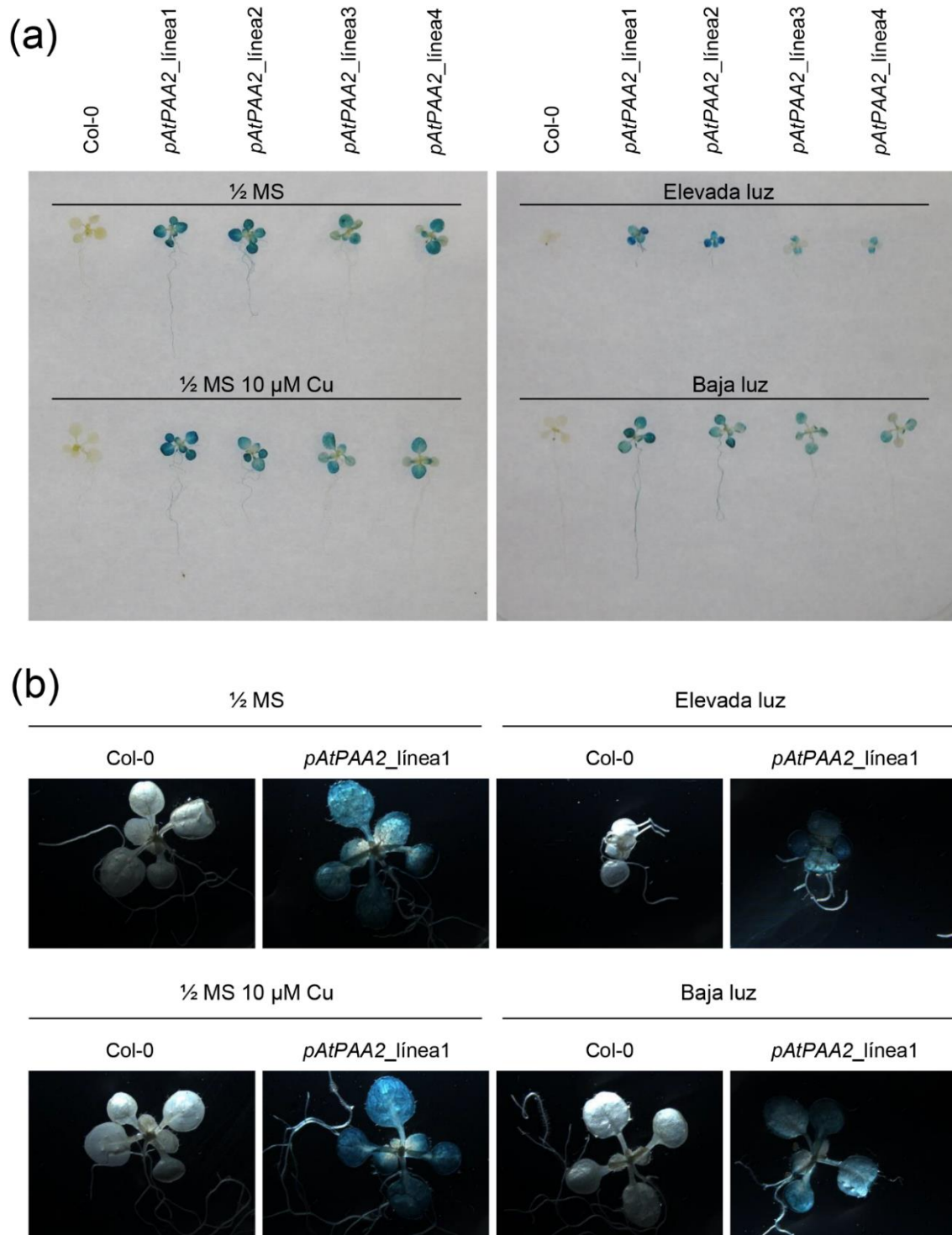


Figura 26. Patrón de actividad espacial del promotor del gen *AtPAA2*. Detección histoquímica de la actividad GUS (azul) en (a) plantas silvestres Col-0 y 4 líneas homocigotas independientes con *pAtPAA2::GUS* (*pAtPAA2_línea1*, *pAtPAA2_línea2*, *pAtPAA2_línea3* y *pAtPAA2_línea4*) cultivadas en dos condiciones diferentes de Cu: 1/2 MS con 1% (p/v) sacarosa sin Cu añadido (1/2 MS) o 1/2 MS con 1% (p/v) sacarosa y 10 μ M CuSO_4 añadido (1/2 MS 10 μ M Cu), y en dos condiciones lumínicas diferentes: intensidad lumínica 320 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (elevada luz) o 60 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (baja luz). (b) Detalle de las plantas Col-0 y la línea transgénica número 1 *pAtPAA2::GUS* (*pAtPAA2_línea1*).

El promotor de *AtPAA2* contiene varias secuencias de regulación por luz, por lo que se llevó a cabo un estudio de su actividad en condiciones de baja y elevada luz (Figura 26). Las plantas crecidas en elevada luz mostraron un crecimiento reducido debido probablemente a un efecto fotoinhibitorio (Taiz, 2010). Tanto en condiciones de baja como elevada luz, el promotor parece tener una mayor actividad en el limbo de las hojas, como se ha descrito anteriormente. En cambio, parece que la luz no tiene un claro efecto regulatorio en la actividad del promotor en las condiciones testadas.

1.3.2. Estudio de la región 5' del gen *GmPAA2-2*

El inicio de la transcripción del gen *GmPAA2-2* se estudió mediante 5' RACE. Para ello, las plantas de *G. max* fueron germinadas en vermiculita en oscuridad durante 3 días y crecidas durante 4 días adicionales también en vermiculita en luz (una semana en total). A continuación, las plántulas se transfirieron a cultivo hidropónico y se mantuvieron durante una semana en solución Hoagland II con 0,5 μM CuSO_4 y una semana adicional en solución hidropónica Hoagland II con diferentes concentraciones de Cu: sin Cu añadido al medio, con 0,5 μM CuSO_4 y con 10 μM CuSO_4 (apartado 1.3.7 de Materiales y Métodos).

Las plantas se cosecharon, se congelaron con nitrógeno líquido y se mantuvieron a -80 °C hasta su utilización. A continuación, se extrajo el ARN, se purificó y se trató con ADNasa I. La pureza e integridad del ARN es extremadamente importante para el desarrollo de esta técnica. Por este motivo, se evaluó la concentración de ARN en un microespectrofotómetro a 260 nm y la contaminación por proteínas y polisacáridos mediante el cociente de este valor y la absorbancia a 280 nm y 230 nm, respectivamente. Los valores obtenidos para los ARNs fueron de aproximadamente 2 $\mu\text{g ml}^{-1}$ y los cocientes alrededor de 2, indicando una pureza aceptable para esta técnica. Para evaluar la integridad de los ARNs, éstos se analizaron por electroforesis en gel de agarosa (Figura 27), donde no se apreciaron signos de degradación.

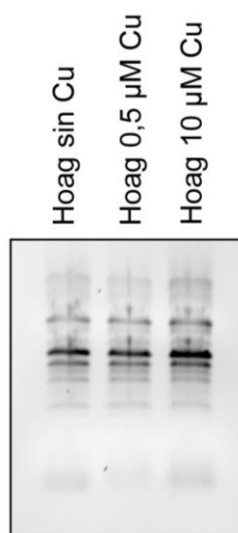


Figura 27. Electroforesis en gel de agarosa del ARN de plantas de *G. max* crecidas en solución Hoagland II sin Cu añadido (Hoag sin Cu), con 0,5 µM CuSO₄ (Hoag 0,5 µM Cu) y con 10 µM CuSO₄ (Hoag 10 µM Cu); tratado con ADNasa I y utilizado posteriormente para el análisis por 5' RACE.

Una vez comprobada la pureza e integridad del ARN, éste fue desfosforilado, desprovisto de la caperuza 5' y ligado a un adaptador de ARN. Se sintetizó el ADN complementario (ADNc), y los inicios 5' de los genes fueron amplificados por PCR utilizando el cebador directo GeneRacer_5' y cebadores reversos específicos para los genes de interés. Para la amplificación del gen *GmPAA2-2* se utilizaron tres cebadores reversos específicos: *GmPAA2-2_3'(1)RACE*, *GmPAA2-2_3'(2)RACE* y *GmPAA2-2_3'(3)RACE* (Tabla 8 en Material y Métodos) (Figura 28).

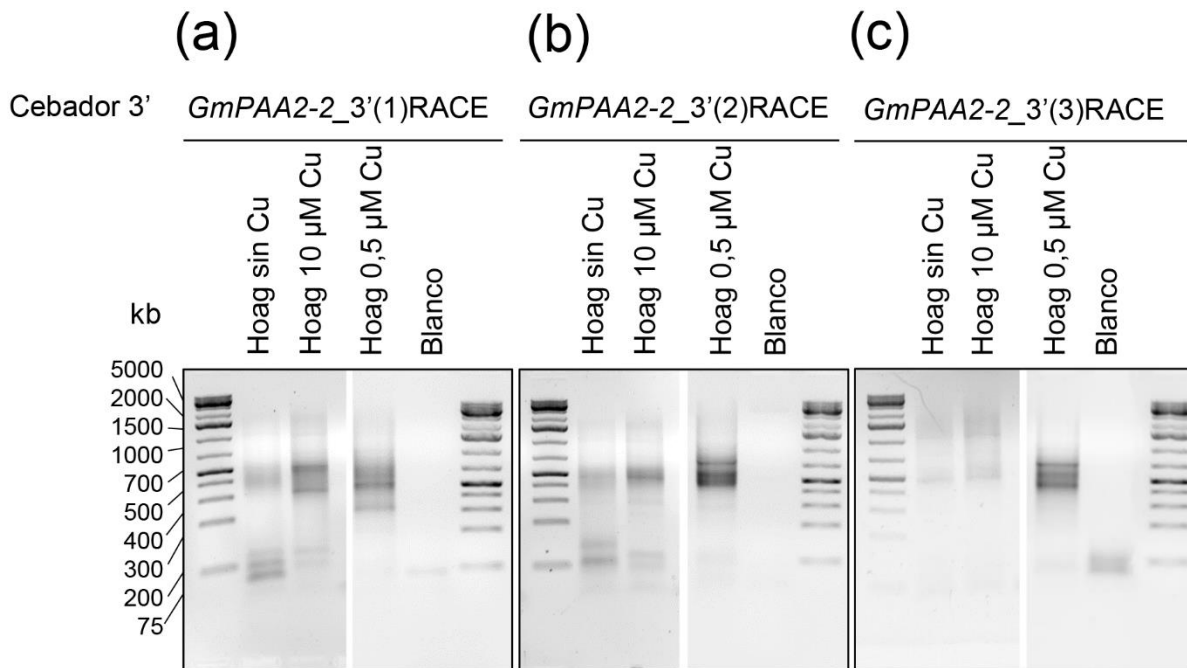


Figura 28. Electroforesis en gel de agarosa de la amplificación por PCR de la zona 5' del gen *GmPAA2-2*. El molde utilizado fue ADNc de plantas crecidas en solución Hoagland II sin Cu añadido (Hoag sin Cu), con 0,5 µM CuSO₄ (Hoag 0,5 µM Cu) y con 10 µM CuSO₄ (Hoag 10 µM Cu). Los cebadores reversos utilizados en cada caso fueron: (a) *GmPAA2-2_3'(1)RACE*, (b) *GmPAA2-2_3'(2)RACE* y (c) *GmPAA2-2_3'(3)RACE*.

A continuación, se utilizaron las reacciones de PCR anteriores como molde para una segunda ronda de amplificación. Para ello, se utilizó el cebador GeneRacer_5'Anidado y cebadores específicos anidados. Para la amplificación de *GmPAA2-2* se utilizó el cebador *GmPAA2-2_3'Anidado* (Tabla 8 en Material y Métodos) (Figura 29).

Las bandas resultantes se analizaron para conocer la secuencia del inicio de la transcripción del gen *GmPAA2-2*. Para ello, las dos bandas de la calle 1, las bandas de las calles 4, 7, 8 y las dos bandas de la calle 9 (Figura 29) se clonaron en el vector pCR4 TOPO. Se aislaron al menos 10 colonias de cada clonación y se secuenciaron. Las secuencias correspondieron con el gen *GmPAA2-2* excepto en los casos siguientes: 1) la banda 4 correspondió con el gen Glyma15g04891 (de función desconocida), 2) dos de las 10 secuencias de la banda superior de la calle 9 correspondieron con los genes Glyma08g07710 (*GmPAA1*) y Glyma12g32060 (posiblemente implicada en el ciclo celular) y 3) la banda inferior de la calle 9 correspondió con Glyma16g03230 (de función desconocida).

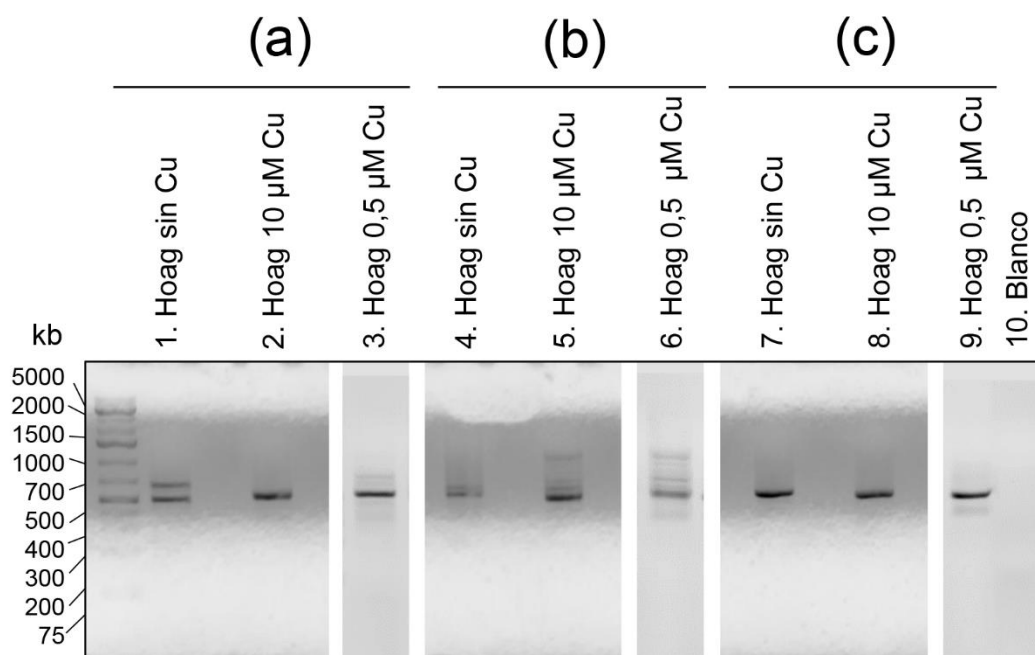


Figura 29. Electroforesis en gel de agarosa de la amplificación por PCR de las regiones 5' del gen *GmPAA2-2* con cebadores anidados, usando como molde los productos de PCR de la Figura 28, provenientes de plantas cultivadas en solución Hoagland II sin Cu añadido (Hoag sin Cu), con 0,5 μM CuSO_4 (Hoag 0,5 μM Cu) y con 10 μM CuSO_4 (Hoag 10 μM Cu). Se utilizaron como molde los productos de PCR amplificados con los siguientes cebadores reversos: (a) *GmPAA2-2_3'(1)RACE*, (b) *GmPAA2-2_3'(2)RACE* y (c) *GmPAA2-2_3'(3)RACE*.

Se obtuvieron en total 30 secuencias positivas en las plantas crecidas en solución Hoagland II sin Cu añadido, 7 secuencias en las plantas crecidas en solución con 0,5 μM CuSO_4 y 10 secuencias en las plantas crecidas en solución con 10 μM CuSO_4 . Las secuencias mostraron la existencia de diferentes puntos de inicio de la transcripción. En el caso de las secuencias analizadas de las plantas crecidas sin Cu añadido, se encontró una secuencia que se iniciaba en la posición -175 (tomando como 1 el nucleótido del inicio de la traducción), 5 secuencias en -174, 10 secuencias en -56 y 14 secuencias en -20. Las plantas crecidas en solución con 0,5 μM CuSO_4 mostraron 2 secuencias que se iniciaban en -49 y 5 secuencias en -25. Las plantas crecidas en solución con 10 μM CuSO_4 añadido presentaban 4 secuencias iniciadas en -25, 2 secuencias en -24 y 4 secuencias en -10 (Figura 30). Todas las secuencias de *GmPAA2-2* encontradas en todos los tratamientos testados retenían el primer intrón hipotético, por lo que contenían un codón de STOP prematuro que produciría el truncamiento de la hipotética proteína.

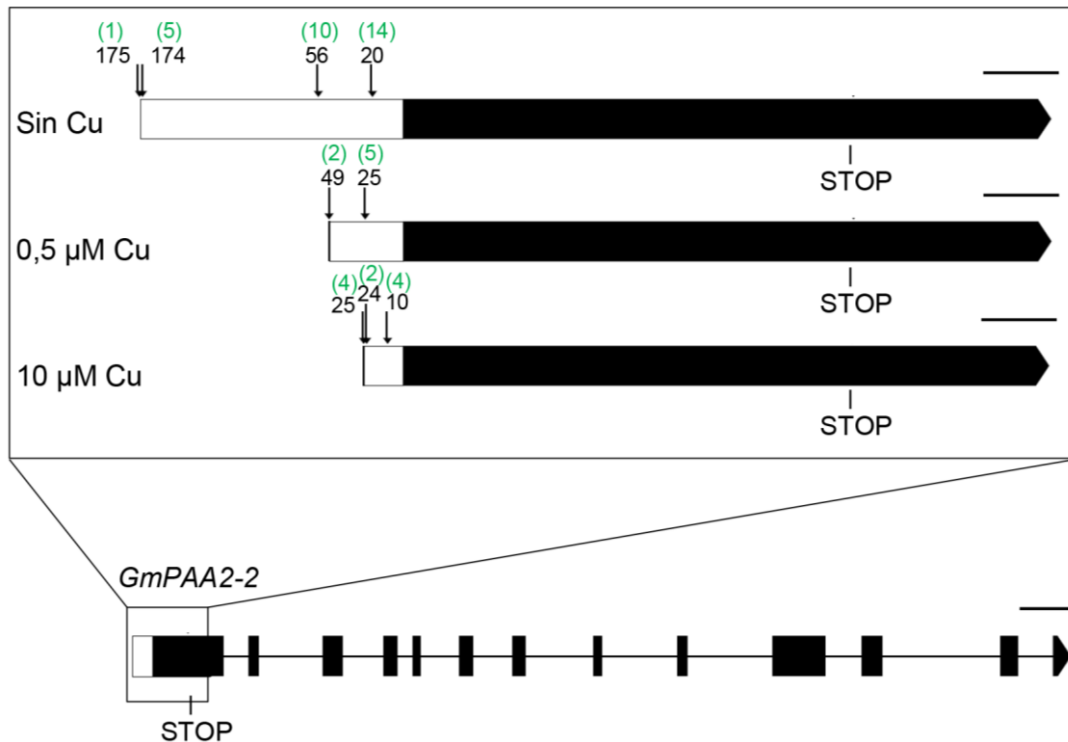


Figura 30. Representación esquemática del gen *GmPAA2-2*. Los recuadros negros corresponden con los exones, los recuadros blancos corresponden con las regiones 5' UTR y las líneas con los intrones. En el cuadro interior se observa una magnificación de la región 5' del gen amplificada por 5' RACE de las plantas de *G. max* crecidas en solución Hoagland II sin Cu añadido (sin Cu), con 0,5 µM CuSO₄ (0,5 µM Cu) y con 10 µM CuSO₄ (10 µM Cu). Los números en negro corresponden con la distancia en nucleótidos hasta el codón de inicio de la traducción ATG, los números entre paréntesis en verde corresponden con el número de eventos correspondientes a cada inicio de la transcripción. Los codones STOP están marcados. Las barras de escala corresponden con 500 pb y 50 pb en el cuadro interior.

Como controles para esta técnica, se utilizaron los genes *GmPAA2-1* y *GmPAA1*, que se amplificaron en una primera ronda de PCR con el cebador GeneRacer_5' y los cebadores específicos *GmPAA2-1_3'RACE* y *GmPAA1_3'RACE*, respectivamente (Tabla 8 en Materiales y Métodos) (Figura 31). En este caso se utilizaron las plantas cultivadas en solución Hoagland II sin Cu añadido y con 10 µM CuSO₄.

Seguidamente, se utilizaron las reacciones de PCR como molde para una segunda amplificación. En este caso, se utilizó el cebador GeneRacer_5'Anidado, y cebadores específicos anidados *GmPAA2-1_3'Anidado* para amplificar *GmPAA2-1* y *GmPAA1_3'Anidado* para amplificar *GmPAA1* (Tabla 8 en Material y Métodos) (Figura 32).

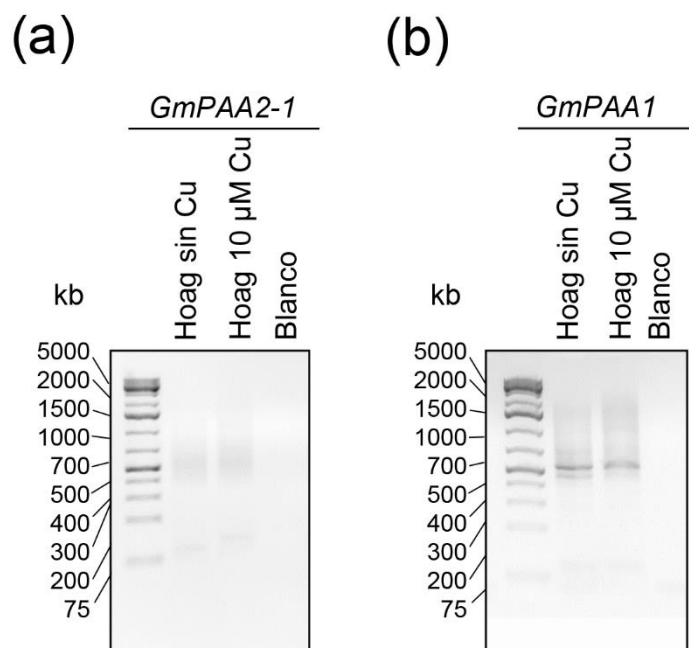


Figura 31. Electroforesis en gel de agarosa de la amplificación por PCR de los fragmentos de la zona 5' de los genes (a) *GmPAA2-1* y (b) *GmPAA1*. El molde utilizado fue ADNc de plantas crecidas en solución Hoagland II sin Cu añadido (Hoag sin Cu) y con 10 μM CuSO_4 (Hoag 10 μM Cu).

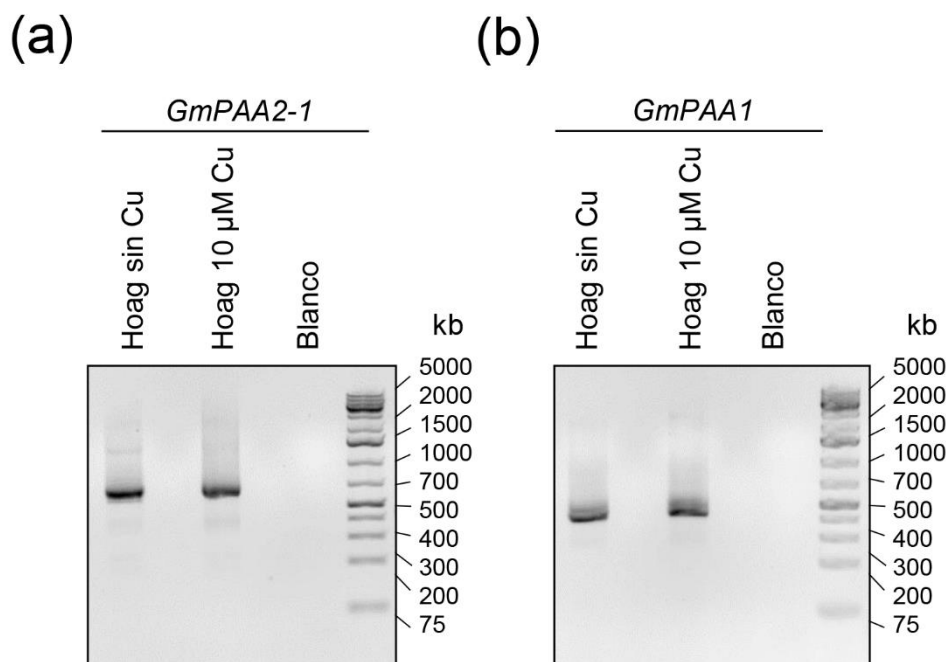


Figura 32. Electroforesis en gel de agarosa de la amplificación por PCR de las regiones 5' de los genes (a) *GmPAA2-1* y (b) *GmPAA1* con cebadores anidados usando como molde los productos de PCR de la Figura 31, provenientes de plantas crecidas en solución Hoagland II sin Cu añadido (Hoag sin Cu) y con 10 μM CuSO_4 (Hoag 10 μM Cu).

Las bandas de las regiones 5' de los genes *GmPAA2-1* y *GmPAA1* de plantas crecidas en solución Hoagland II sin Cu añadido y con 10 μM CuSO_4 (Figura 32) se clonaron en el vector pCR4 TOPO y se secuenciaron. En el caso del gen *GmPAA2-1*, el inicio de la transcripción se encontró a -51 nt previos al codón de inicio de la traducción ATG en las plantas crecidas en medio sin Cu añadido, y a -22 nt en las plantas crecidas con 10 μM CuSO_4 . El gen *GmPAA1* mostró dos inicios de la transcripción próximos, uno de ellos a -57 nt desde el codón de inicio en las plantas crecidas en medio sin Cu añadido y otro a -60 nt en las plantas crecidas con 10 μM CuSO_4 (Figura 33).

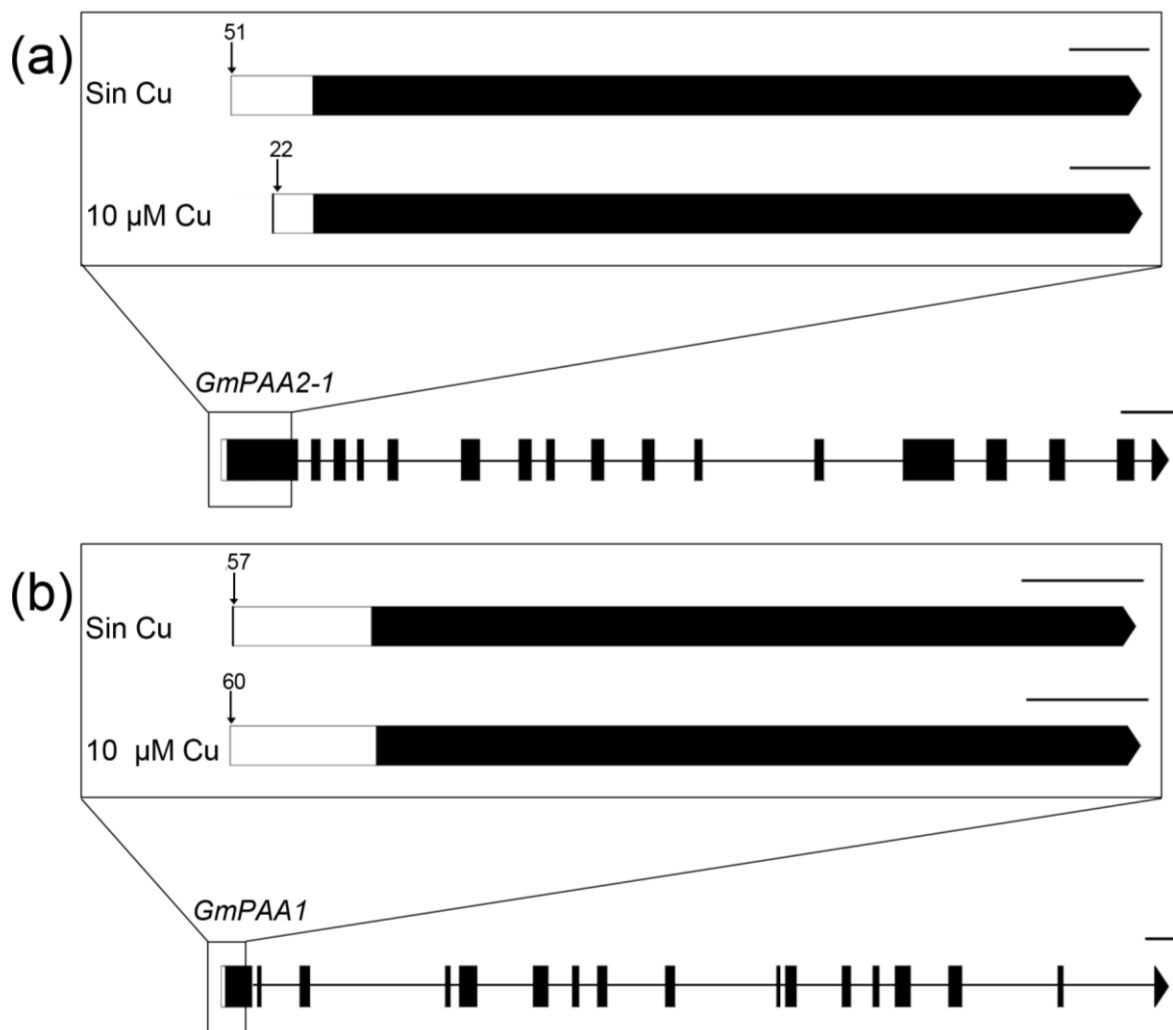


Figura 33. Representación esquemática de los genes (a) *GmPAA2-1* y (b) *GmPAA1*. Los recuadros negros corresponden con los exones, los recuadros blancos corresponden con las regiones 5' UTR y las líneas con los intrones. En los cuadros interiores se observa una magnificación de la región 5' de los genes amplificada por 5' RACE de las plantas de *G. max* crecidas en solución Hoagland II sin Cu añadido (sin Cu) y con 10 μM CuSO_4 (10 μM Cu). Los números en negro corresponden con la distancia en nucleótidos hasta el codón de inicio de la traducción ATG. Las barras de escala corresponden con 500 pb y 50 pb en los cuadros interiores.

1.3.3. Regulación transcripcional de *GmPAA2-1* y *GmPAA2-2*

Las plantas de *G. max* se germinaron durante una semana en vermiculita y se transfirieron a cultivo hidropónico durante dos semanas con solución Hoagland I con diferentes concentraciones de Cu: sin Cu añadido al medio, con $0,5 \mu\text{M}$ CuSO_4 y con $10 \mu\text{M}$ CuSO_4 (ver apartado 1.3.7 de Materiales y Métodos). Las plantas cultivadas con diferentes concentraciones de Cu mostraron rasgos fenotípicos (Figura 34). Las plantas crecidas en solución Hoagland I sin Cu añadido tenían los tallos más largos y delgados que las plantas crecidas en solución con $0,5 \mu\text{M}$ CuSO_4 ; y las plantas cultivadas en solución Hoagland I con $10 \mu\text{M}$ CuSO_4 tenían la parte aérea y, particularmente, la radicular reducidas con respecto a las plantas crecidas con $0,5 \mu\text{M}$ CuSO_4 .

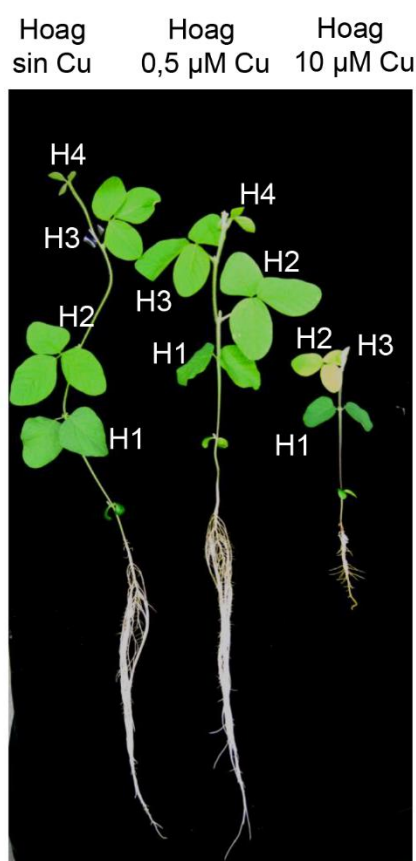


Figura 34. Plantas de *G. max* cultivadas en solución Hoagland I sin Cu añadido (Hoag sin Cu), con $0,5 \mu\text{M}$ CuSO_4 (Hoag $0,5 \mu\text{M}$ Cu) y con $10 \mu\text{M}$ CuSO_4 (Hoag $10 \mu\text{M}$ Cu). H1-H4, hojas numeradas en función de su momento de aparición, desde la más madura a la más joven.

Se midió el peso fresco de los diferentes tejidos de las plantas (hojas, tallo, raíz) (Figura 35), que reflejó un peso similar entre las plantas crecidas en medio Hoagland I sin Cu añadido

y con 0,5 μM CuSO_4 . En cambio, las plantas crecidas con 10 μM CuSO_4 mostraron una reducción muy significativa del peso en todos los tejidos estudiados.

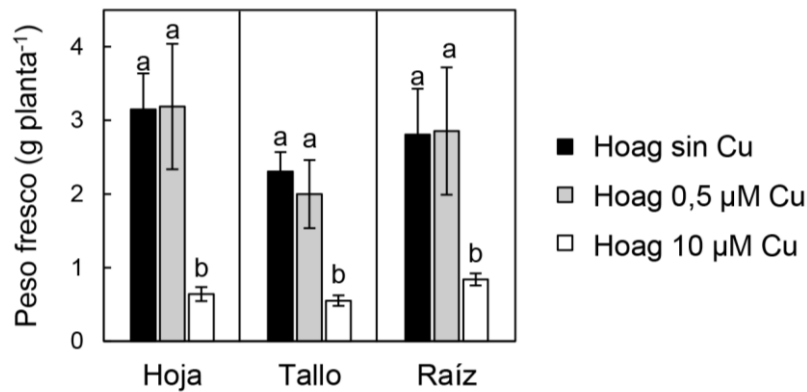


Figura 35. Peso fresco de las hojas, tallos y raíces de las plantas de *G. max* cultivadas en solución Hoagland I sin Cu añadido (Hoag sin Cu), con 0,5 μM CuSO_4 (Hoag 0,5 μM Cu) y con 10 μM CuSO_4 (Hoag 10 μM Cu). Se muestran las medias de 10 replicados biológicos \pm la desviación estándar. Las letras distintas indican diferencias significativas en el peso de los tejidos en los diferentes tratamientos ($p < 0,05$)

Se realizó un análisis de las concentraciones de nutrientes en los diferentes tejidos de las plantas, diferenciándose en hojas H1-H4 y raíz (Figura 36,37), utilizando la técnica de ICP-AES. Las plantas crecidas en solución Hoagland I con 10 μM CuSO_4 no presentaban la hoja 4 (H4), debido al retraso en el desarrollo, siendo la hoja 3 (H3) la más joven.

Las plantas crecidas en solución Hoagland I sin Cu añadido, mostraron una disminución significativa de la cantidad de Cu en las hojas respecto de las plantas en solución con 0,5 μM CuSO_4 ; y las plantas cultivadas en solución con 10 μM CuSO_4 , mostraron un aumento significativo del Cu en las hojas y raíces respecto de las plantas en solución con 0,5 μM CuSO_4 . Por otra parte, las hojas más maduras mostraron una acumulación significativamente mayor en relación con las hojas más jóvenes en todas las condiciones testadas (Figura 36).

Las raíces de las plantas crecidas en solución Hoagland I con 10 μM CuSO_4 mostraron una disminución significativa de los elementos Mn, Zn, Mo, K, Mg, P y S. Por otra parte, algunas de las hojas de estas plantas tenían un contenido significativamente menor de Fe, B, Mn, Zn, Mo, K, Ca, Mg, P y S (Figura 36,37).

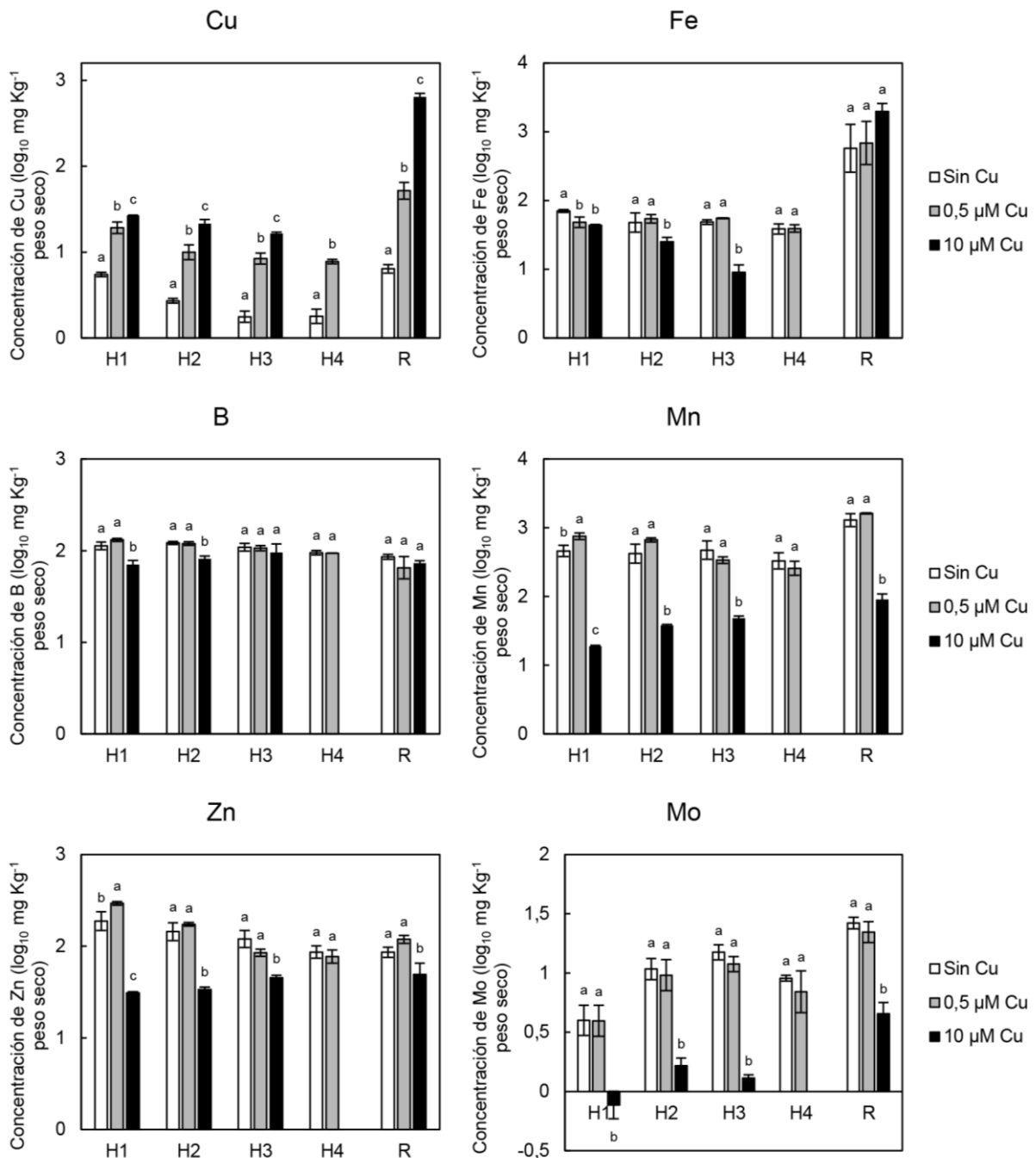


Figura 36. Contenido de micronutrientes en las plantas de *G. max* crecidas en solución Hoagland I sin Cu añadido (sin Cu), con 0,5 μM CuSO₄ (0,5 μM Cu) y con 10 μM CuSO₄ (10 μM Cu). H1-H4, hojas en orden de aparición temporal, desde las más maduras a las más jóvenes; R, raíz. Las letras diferentes indican diferencias significativas en la cantidad de elementos entre los diferentes tejidos (H1-4, R) en cada tratamiento de Cu (p < 0,05).

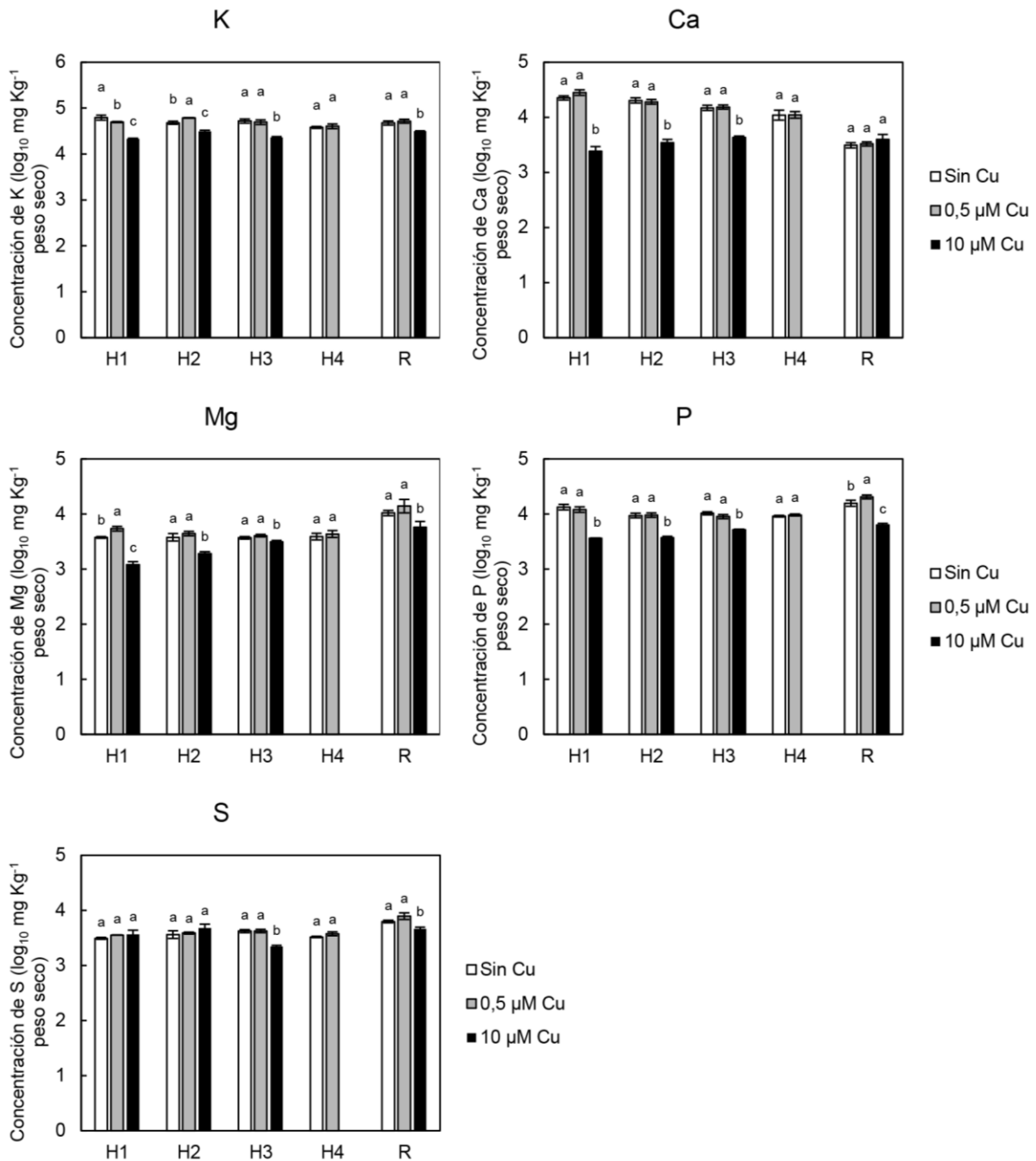


Figura 37. Contenido de macronutrientes en las plantas de *G. max* crecidas en solución Hoagland I sin Cu añadido (sin Cu), con 0,5 μM CuSO_4 (0,5 μM Cu) y con 10 μM CuSO_4 (10 μM Cu). H1-H4, hojas en orden de aparición temporal, desde las más maduras a las más jóvenes; R, raíz. Las letras diferentes indican diferencias significativas en la cantidad de elementos entre los diferentes tejidos (H1-4, R) en cada tratamiento de Cu ($p < 0,05$).

A continuación se realizó un ensayo de actividad SOD en las hojas de las plantas de *G. max* (Figura 38). Los resultados indicaron una mayor actividad de FeSOD en las hojas de las plantas crecidas en medio Hoagland I sin Cu añadido, especialmente en las hojas más

jóvenes, y una mayor actividad de Cu/ZnSOD en las plantas crecidas con 0,5 μM CuSO_4 y, especialmente, en las crecidas con 10 μM CuSO_4 (Figura 38).

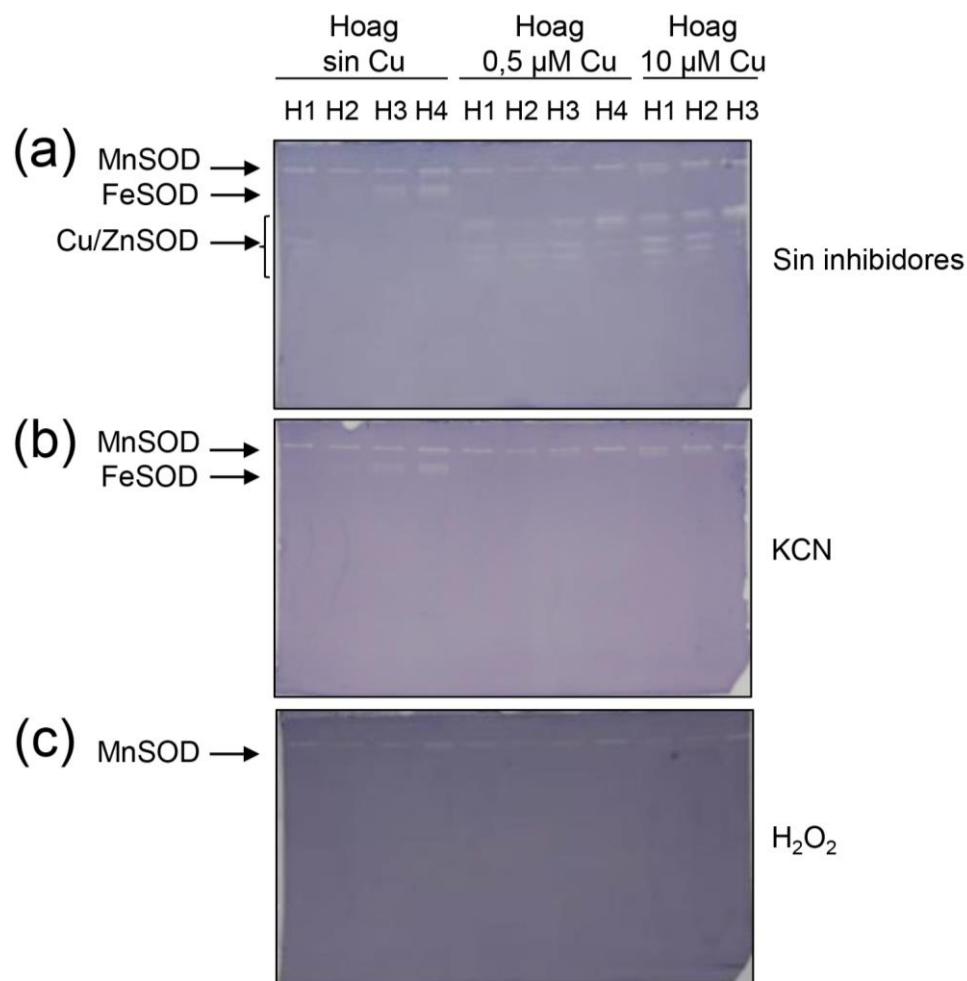


Figura 38. Ensayo de actividad SOD en las hojas de las plantas de *G. max* cultivadas en solución Hoagland I sin Cu añadido (Hoag sin Cu), con 0,5 μM CuSO_4 (Hoag 0,5 μM Cu) y con 10 μM CuSO_4 (Hoag 10 μM Cu): (a) sin inhibidores, (b) con KCN, inhibidor de la Cu/ZnSOD, y (c) con H_2O_2 , inhibidor de la FeSOD y Cu/ZnSOD. H1-H4, hojas numeradas desde las más maduras a las más jóvenes.

Paralelamente se realizó un análisis por PCR cuantitativa a tiempo real de la expresión de las SOD cloroplásticas *GmFSD1* y *GmCSD2* y se compararon con los datos de actividad (Figura 38,39). Los resultados de expresión mostraron una buena correlación con los datos de actividad, viéndose una mayor expresión de *GmCSD2* en las hojas de las plantas cultivadas en medio Hoagland I con 0,5 μM CuSO_4 y 10 μM CuSO_4 , en comparación con las plantas crecidas sin Cu añadido; y una mayor expresión de *GmFSD1* en las hojas de las plantas cultivadas sin Cu añadido, especialmente en las hojas H2-H4 (Figura 39).

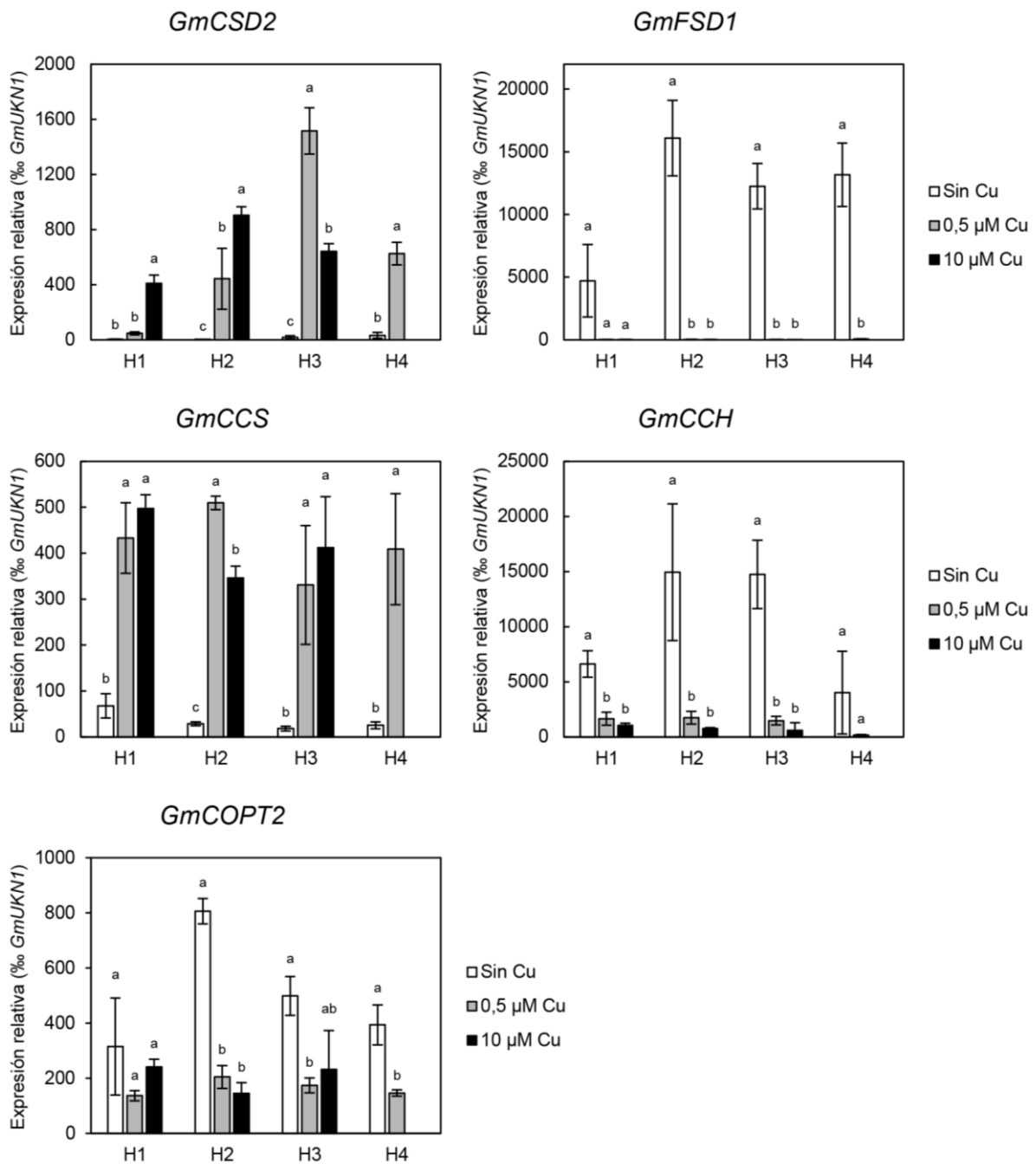


Figura 39. Expresión de los genes regulados por Cu: *GmCSD2*, *GmFSD1*, *GmCCS*, *GmCCH* y *GmCOPT2* en las diferentes hojas (H1-H4, numeradas desde las más maduras a las más jóvenes) de *G. max* cultivadas en solución Hoagland I sin Cu añadido (sin Cu), con 0,5 μM CuSO₄ (0,5 μM Cu) y con 10 μM CuSO₄ (10 μM Cu). Se muestran las medias de tres replicados biológicos ± la desviación estándar. Las letras diferentes indican diferencias significativas en la expresión de los genes entre las diferentes hojas H1-H4 en cada tratamiento de Cu ($p < 0,05$).

La expresión relativa de otros marcadores del estado nutricional de Cu, como son las chaperonas de Cu, CCS y CCH, y el transportador de Cu, COPT2, también se cuantificó

mediante esta técnica. Los resultados de expresión de *GmCCS* mostraron una inducción en las plantas crecidas con $0,5 \mu\text{M CuSO}_4$ y $10 \mu\text{M CuSO}_4$, mientras que la expresión de *GmCCH* se ve inducida en las plantas crecidas sin Cu añadido. El transportador de Cu *GmCOPT2* se ve inducido, a su vez, en las plantas cultivadas sin Cu añadido (Figura 39).

Una vez estudiadas las condiciones nutricionales de Cu en las que se encontraban las plantas, se realizó un estudio de la expresión de los genes *GmPAA2-1* y *GmPAA2-2* por PCR cuantitativa a tiempo real en las diferentes hojas de las plantas (Figura 40). Parece existir una tendencia de aumento en la expresión de *GmPAA2-1* conforme al aporte de Cu en las plantas, significativo en las hojas más maduras (H1) de las plantas crecidas con $10 \mu\text{M CuSO}_4$ y en las hojas jóvenes e intermedias (H2-H4) de las plantas crecidas sin Cu añadido. En el caso de *GmPAA2-2*, la expresión se detectó en todos los tejidos analizados, aunque la expresión parece ser mucho menor que en el caso de *GmPAA2-1*, y no parece haber una regulación por Cu.

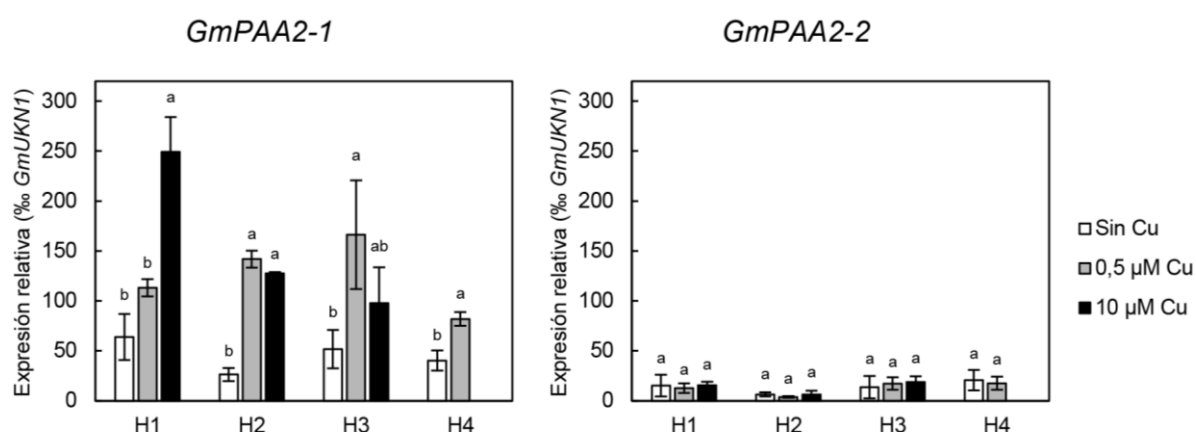


Figura 40. Expresión de los genes *GmPAA2-1* y *GmPAA2-2* en las diferentes hojas (H1-H4, numeradas desde las más maduras a las más jóvenes) de *G. max* cultivadas en solución Hoagland I sin Cu añadido (sin Cu), con $0,5 \mu\text{M CuSO}_4$ ($0,5 \mu\text{M Cu}$) y con $10 \mu\text{M CuSO}_4$ ($10 \mu\text{M Cu}$). Se muestran las medias de tres replicados biológicos \pm la desviación estándar. Las letras diferentes indican diferencias significativas en la expresión de los genes entre las diferentes hojas H1-H4 en cada tratamiento de Cu ($p < 0,05$).

1.3.4. Identificación de proteínas *GmPAA2* en fracciones subcelulares de *G. max*

Se estudiaron las diferentes proteínas de soja *GmPAA2* a través de su análisis por SDS-PAGE y western blot. Para ello, se utilizaron anticuerpos desarrollados contra el péptido sintético LQDRREAKDSP, que se encuentra en la región N-terminal de la proteína *GmPAA2-2*. A su vez, este anticuerpo podría reconocer también tanto a la proteína *GmPAA2-1* como

GmPAA2-1T, ya que la secuencia de aminoácidos en esa región difiere tan solo en un residuo. Se utilizaron plantas de soja crecidas durante una semana en vermiculita y dos semanas adicionales en medio Hoagland I sin Cu y con 0,5 μM CuSO_4 , y se llevó a cabo un fraccionamiento subcelular de las hojas, en el que se aislaron cloroplastos, tilacoides y estroma (apartados 1.3.7 y 3.5.2 de Materiales y Métodos). A continuación, las proteínas se analizaron por SDS-PAGE en 10% (p/v) y 20% (p/v) acrilamida (Figura 41). Los resultados mostraron una banda superior en cloroplastos, tilacoides y, algo menor, en estroma que podría corresponder con la proteína *GmPAA2-1*, dos bandas alrededor de 35 kDa que podrían corresponder con *GmPAA2-1T*, y no se observó ninguna banda de peso molecular concordante con el esperado para *GmPAA2-2* (6,6 kDa sin péptido señal). Un estudio más detallado será necesario para determinar la identidad de las bandas detectadas inmunológicamente con los anticuerpos anti *GmPAA2-2*. Para ello sería conveniente el análisis de la secuencia N-terminal de aminoácidos de las bandas inmunorreactivas o su identificación por espectrometría de masas.

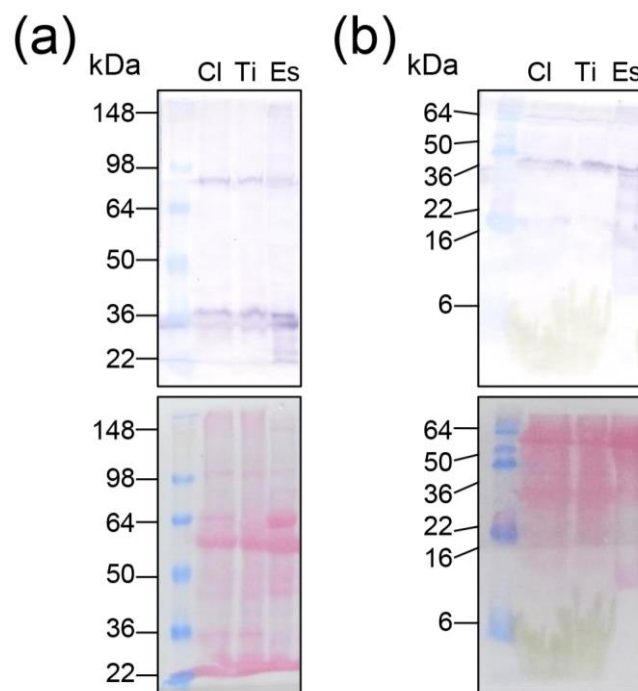


Figura 41. Análisis de fracciones subcelulares de *G. max* por (a) 10% (p/v) y (b) 20% (p/v) acrilamida en SDS-PAGE y western blot con anticuerpos anti *GmPAA2-2* (superior) o tinción Ponceau (inferior). CI, cloroplastos; Ti, tilacoides; Es, estroma.

2. ESTUDIO DEL ESTADO OLIGOMÉRICO DE LA CHAPERONA *GmCCS* E INTERACCIÓN CON SU LIGANDO METÁLICO

2.1. SOBREENPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE *GmCCS* RECOMBINANTE

La región codificante sin el péptido señal de tránsito al cloroplasto del gen *GmCCS* de *G. max* se clonó en el vector pBAD TOPO, que contiene el promotor P_{BAD} inducible por L-arabinosa y una cola de 6xHis para facilitar la purificación de la proteína. Las bacterias *E. coli* cepa LMG194 se transformaron con la construcción y se realizaron ensayos a escala piloto con diferentes concentraciones de inductor con el fin de optimizar la sobreexpresión.

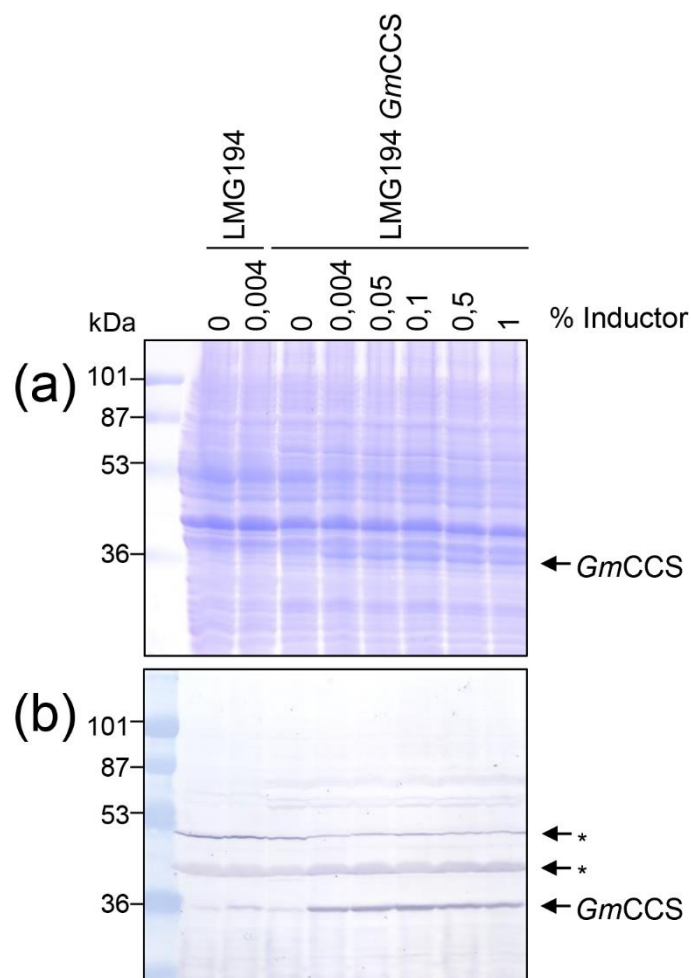


Figura 42. Análisis de la sobreexpresión en bacterias LMG194 de la proteína recombinante *GmCCS* por SDS-PAGE. (a) Tinción azul Coomassie; (b) western blot con anticuerpos anti-*GmCCS*. LMG194, bacterias *E. coli* cepa LMG194; LMG194 *GmCCS*, bacterias LMG194 transformadas con la construcción con *GmCCS*; *, bandas inespecíficas.

A pesar de ello, la sobreexpresión de la proteína parecía ser baja en todas las condiciones testadas como indicaron los análisis por SDS-PAGE y tinción azul Coomassie o western blot con anticuerpos anti-*GmCCS* (Figura 42). Como control negativo se utilizaron las bacterias de la cepa LMG194 sin o con la adición del inductor, así como las bacterias LMG194 transformadas con la construcción con *GmCCS* sin la adición de inductor.

Una vez optimizadas las condiciones de sobreexpresión, se procedió al escalado del experimento. Las condiciones elegidas para la sobreexpresión fueron una concentración de inductor de 0,1% L-arabinosa, 37 °C y 4 h. Tras la sobreexpresión, las células se recogieron por centrifugación y se rompieron por ultrasonificación. Se clarificó el extracto resultante y se cargó en una columna IMAC-Co²⁺. En este caso se obtuvieron mejores resultados utilizando columnas IMAC con Co²⁺ que en columnas con Ni²⁺, más comúnmente utilizadas. Las proteínas se eluyeron mediante un gradiente lineal de 50-450 mM imidazol. Se tomaron alícuotas de las distintas fracciones obtenidas y se analizaron por SDS-PAGE (Figura 43a). Los resultados mostraron que la mayoría de las fracciones de elución eran de alta pureza. Las fracciones que contenían la proteína *GmCCS* recombinante se juntaron y la preparación resultante se analizó por SDS-PAGE y western blot con anticuerpos anti-*GmCCS* (Figura 43b,c). El rendimiento de la purificación fue alrededor de 2,3 mg de proteína purificada por litro de cultivo bacteriano. Aunque la muestra purificada obtenida presentaba un contaminante minoritario de tamaño inferior a nuestra *GmCCS*, decidimos continuar con la preparación, así obtenida, ya que trabajos previos de nuestro laboratorio habían demostrado que esta proteína era bastante inestable y que el rendimiento de la purificación disminuía significativamente con pasos adicionales de purificación.

La proteína *GmCCS*, tal como se obtuvo mediante la purificación descrita, se analizó para conocer si se encontraba en forma de holoproteína (con Cu) o de apoproteína (sin Cu). Para ello, se midió la cantidad de Cu presente en la preparación de *GmCCS* mediante el método con BCA (apartado 3.3.4 de Materiales y Métodos). Se utilizaron concentraciones conocidas de CuSO₄ para realizar una recta patrón. Los resultados mostraron una relación de aproximadamente 0,05 átomos de Cu por proteína, lo que indica que la proteína se encuentra esencialmente en forma de apoproteína (Figura 44).

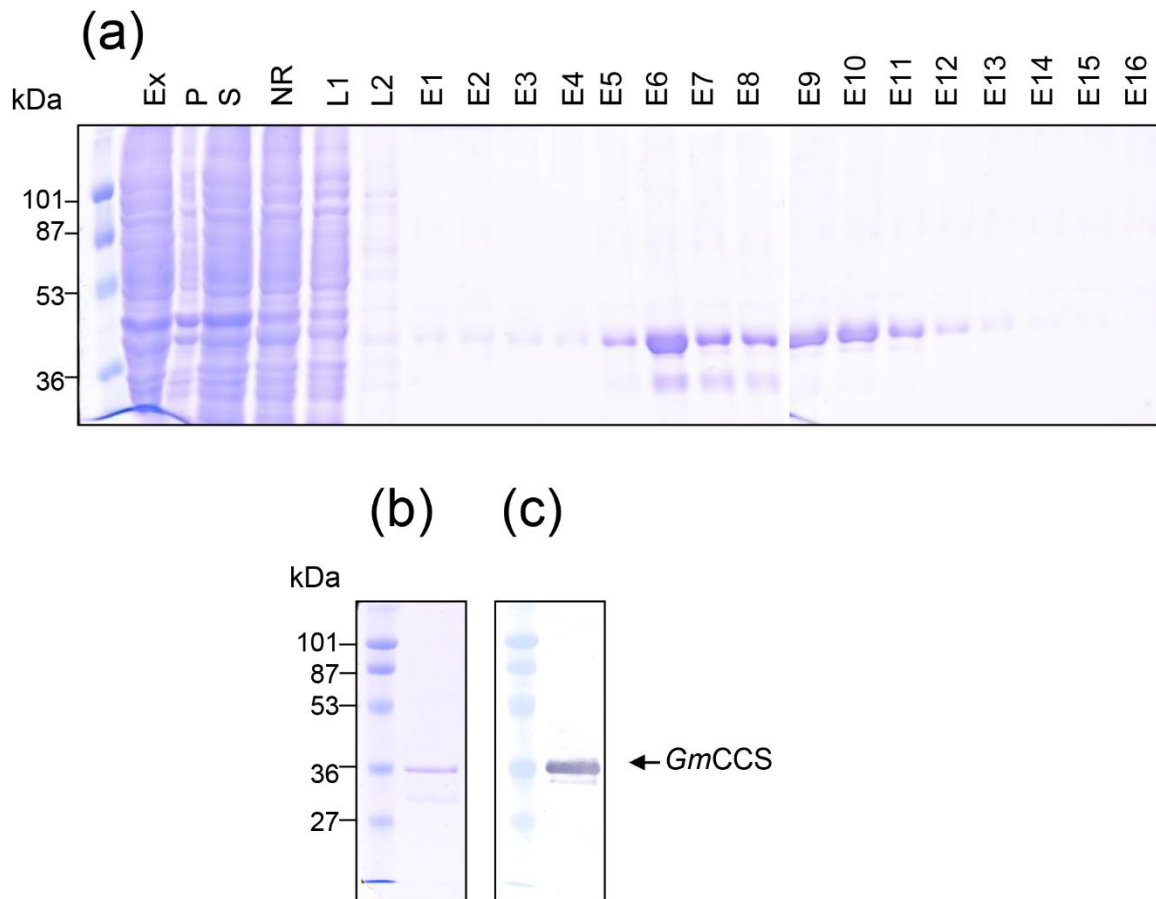


Figura 43. Purificación por IMAC- Co^{2+} de la proteína recombinante *GmCCS* expresada en bacterias LMG194. (a) Análisis por SDS-PAGE y tinción azul Coomassie de los diferentes pasos de la purificación. Ex, extracto; P, precipitado; S, sobrenadante cargado en la columna; NR, no retenido en la columna; L1-L2, lavados 1-2; E1-E16, fracciones de elución mediante un gradiente de 50-450 mM imidazol. Análisis de las fracciones agrupadas de *GmCCS* purificada por (b) tinción Coomassie y (c) western blot.

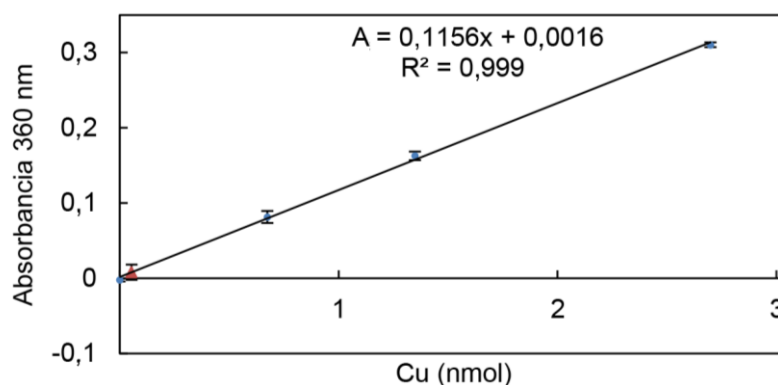


Figura 44. Estimación de la cantidad de Cu presente en la preparación de *GmCCS* recombinante purificada. Recta patrón con cuatro cantidades diferentes de Cu (triángulos azules) (tres réplicas \pm desviación estándar). Cantidad de Cu en la preparación de *GmCCS* marcada en la recta (triángulo marrón). La ecuación de la recta y el coeficiente de determinación se muestran en la gráfica.

2.2. ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN DE *GmCCS* CON COBRE POR CALORIMETRÍA ISOTÉRMICA DE TITULACIÓN

La calorimetría isotérmica de titulación (ITC) es uno de los métodos más adecuados y comunes de estudio de la interacción ligando-proteína (Jelesarov y Bosshard, 1999; Freire y col., 2009). Esta técnica permite la determinación del número de ligandos por proteína y las características termodinámicas de los procesos de interacción ligando-proteína (afinidad, energía libre de Gibbs, entalpía, entropía y capacidad calorífica). Los termogramas (Figura 45) muestran las titulaciones calorimétricas correspondientes a la unión del Cu^+ con *GmCCS* a dos temperaturas diferentes, 25 y 30 °C.

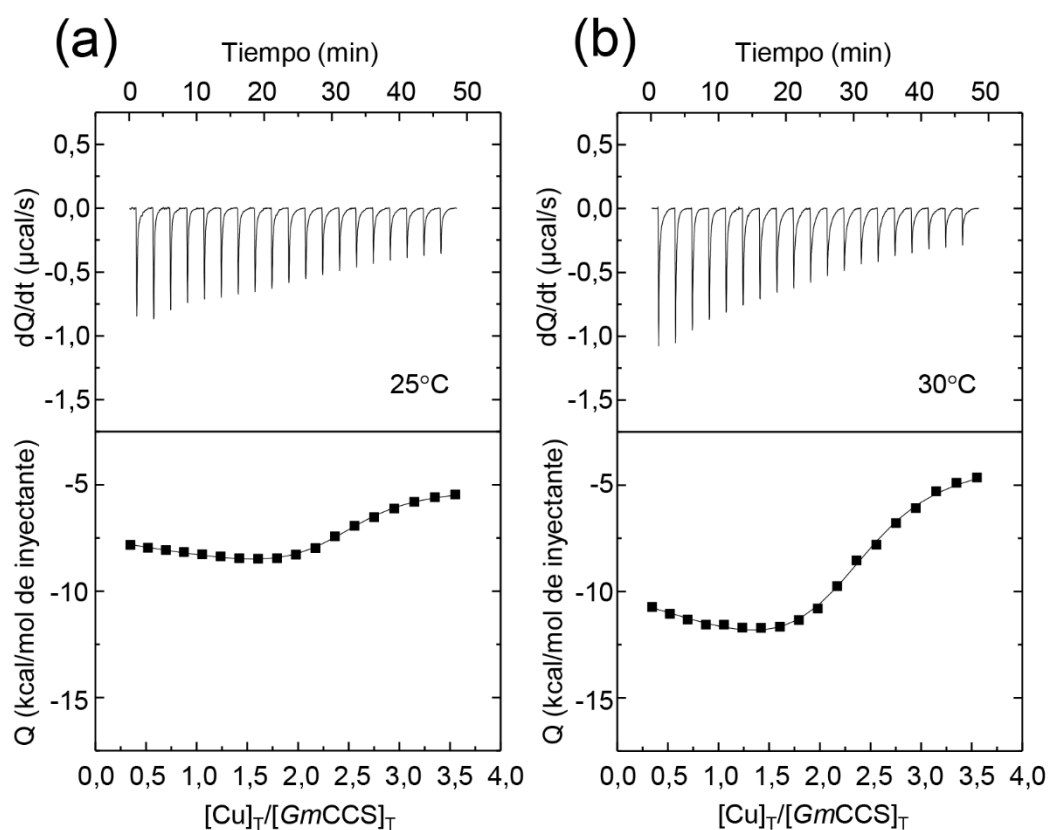


Figura 45. Titulación calorimétrica de la unión de Cu^+ a *GmCCS*. Los paneles superiores muestran los termogramas (energía térmica en función del tiempo) y los paneles inferiores muestran las correspondientes isothermas (calor normalizado en función de la fracción molar). Los experimentos se llevaron a cabo a (a) 25 °C y (b) 30 °C para determinar el cambio de capacidad calorífica por la unión del ligando.

El mejor ajuste a los resultados se obtuvo con un modelo que consideraba dos sitios de unión a ligando por monómero de proteína. Debido a que el coeficiente de Hill era menor que 1, los resultados eran consistentes con dos escenarios posibles: 1) dos sitios de unión a metal diferentes e independientes y 2) dos sitios de unión a metal idénticos con cooperatividad

negativa. Debido a las características estructurales de la proteína (con dos posibles sitios de unión a metal diferentes, MXCXXC en el dominio I y CXC en el dominio III de la proteína), el caso más probable es el de los dos sitios de unión diferentes e independientes. Las constantes de afinidad específicas de cada sitio son $1,5 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ y $2,7 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ a $25 \text{ }^\circ\text{C}$ y $5,8 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ y $2,6 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ a $30 \text{ }^\circ\text{C}$ para el sitio 1 y el sitio 2, respectivamente (Tabla 1). A pesar de que las constantes de afinidad de los dos sitios no son muy diferentes (dentro de un factor de 5), las entalpías de unión intrínsecas específicas de cada sitio son bastante diferentes, reflejando las diferencias estructurales de los dos sitios de unión a metal (Tabla 1; Figura 3 de Introducción). Además, la capacidad calorífica es muy diferente, siendo mucho mayor la del sitio 2 que la del sitio 1. Con estos datos, se puede concluir que el sitio 1 corresponde, muy probablemente, con MXCXXC del dominio I, más estructurado, y el sitio 2 con CXC del dominio III, mucho menos estructurado.

Tabla 1. Parámetros termodinámicos de la unión de Cu^+ a la proteína *GmCCS*. k_1 y k_2 , constantes de asociación de cada sitio de unión; Δh_1 y Δh_2 , entalpías de unión de cada sitio de unión; n_{Hill} , coeficiente de Hill; Δc_{p1} and Δc_{p2} , variaciones de capacidad calorífica de cada sitio de unión. El error relativo a las constantes de asociación es 15% y el error absoluto en las entalpías de unión es de $0,3 \text{ kcal mol}^{-1}$.

Temp. ($^\circ\text{C}$)	k_1 (M^{-1})	k_2 (M^{-1})	Δh_1 (kcal mol^{-1})	Δh_2 (kcal mol^{-1})	n_{Hill}	Δc_{p1} ($\text{kcal K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$)	Δc_{p2} ($\text{kcal K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$)
25	$1,5 \times 10^6$	$2,7 \times 10^5$	-2,5	-5,3	0,82	-0,18	-2,1
30	$5,8 \times 10^5$	$2,6 \times 10^5$	-3,4	-15,8	0,96		

2.3. ESTUDIO DE LA ESTABILIDAD TÉRMICA DE *GmCCS*

La estabilidad térmica de la proteína *GmCCS* en presencia o ausencia de Cu^+ se estudió mediante la técnica de calorimetría diferencial de barrido (DSC). La proteína *GmCCS* recombinante purificada en forma de apoproteína mostró una curva de desplegamiento con una temperatura de fusión de $60,5 \text{ }^\circ\text{C}$, agregándose a mayor temperatura (Figura 46). Debido a dicha agregación, no se pudieron calcular ni la entalpía ni la capacidad calorífica de desplegamiento. La presencia de Cu en la suspensión, originó una curva de fusión muy compleja y a temperaturas más tempranas (interacciones débiles) que podría indicar la destrucción de algún estado oligomérico formado en presencia de Cu (Figura 46).

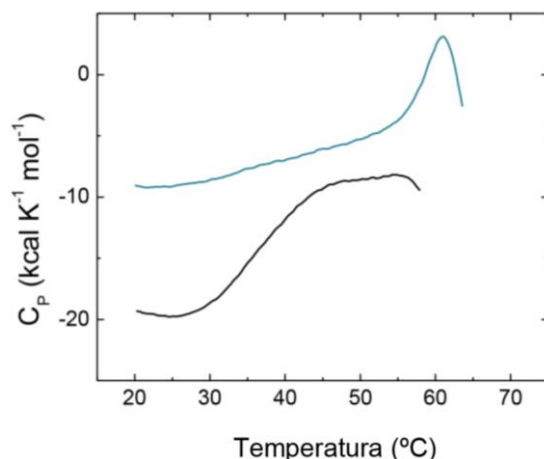


Figura 46. Termogramas de calorimetría diferencial de barrido de 20 μM *GmCCS* recombinante (azul) y 20 μM *GmCCS* recombinante cargada con 120 μM Cu^+ (negro). Se representa la capacidad calorífica en función de la temperatura.

2.4. ESTUDIO DEL ESTADO OLIGOMÉRICO DE *GmCCS*

El estado oligomérico de la proteína *GmCCS* obtenida se analizó por cromatografía de exclusión molecular en un sistema FPLC. El cromatograma (Figura 47) muestra la absorbancia normalizada a 280 nm de la proteína *GmCCS* en forma de apoproteína y en forma de holoproteína (con Cu). La proteína *GmCCS*, tal como se obtuvo mediante la purificación por IMAC- Co^{2+} , presenta dos formas de asociación diferentes, una correspondiente con un monómero, eluido alrededor de 7 ml, y otra como un dímero, eluido alrededor de 6 ml (Figura 47a). Ambos picos cromatográficos corresponden con *GmCCS*, como se vio por SDS-PAGE y tinción azul Coomassie (Figura 47, panel interior). La forma monomérica fue la predominante en estas condiciones. En cambio, cuando la proteína *GmCCS* se carga con Cu^+ , una parte muy significativa de los monómeros se convierten en dímeros, como se observa por la importante disminución de la intensidad de la banda que migra más lentamente y el aumento de la banda más rápida en el perfil cromatográfico (Figura 47b). El pico menor en el cromatograma alrededor de 7,75 ml podría corresponder con el contaminante minoritario descrito anteriormente (Figura 43), que no parece verse afectado por la presencia de Cu.

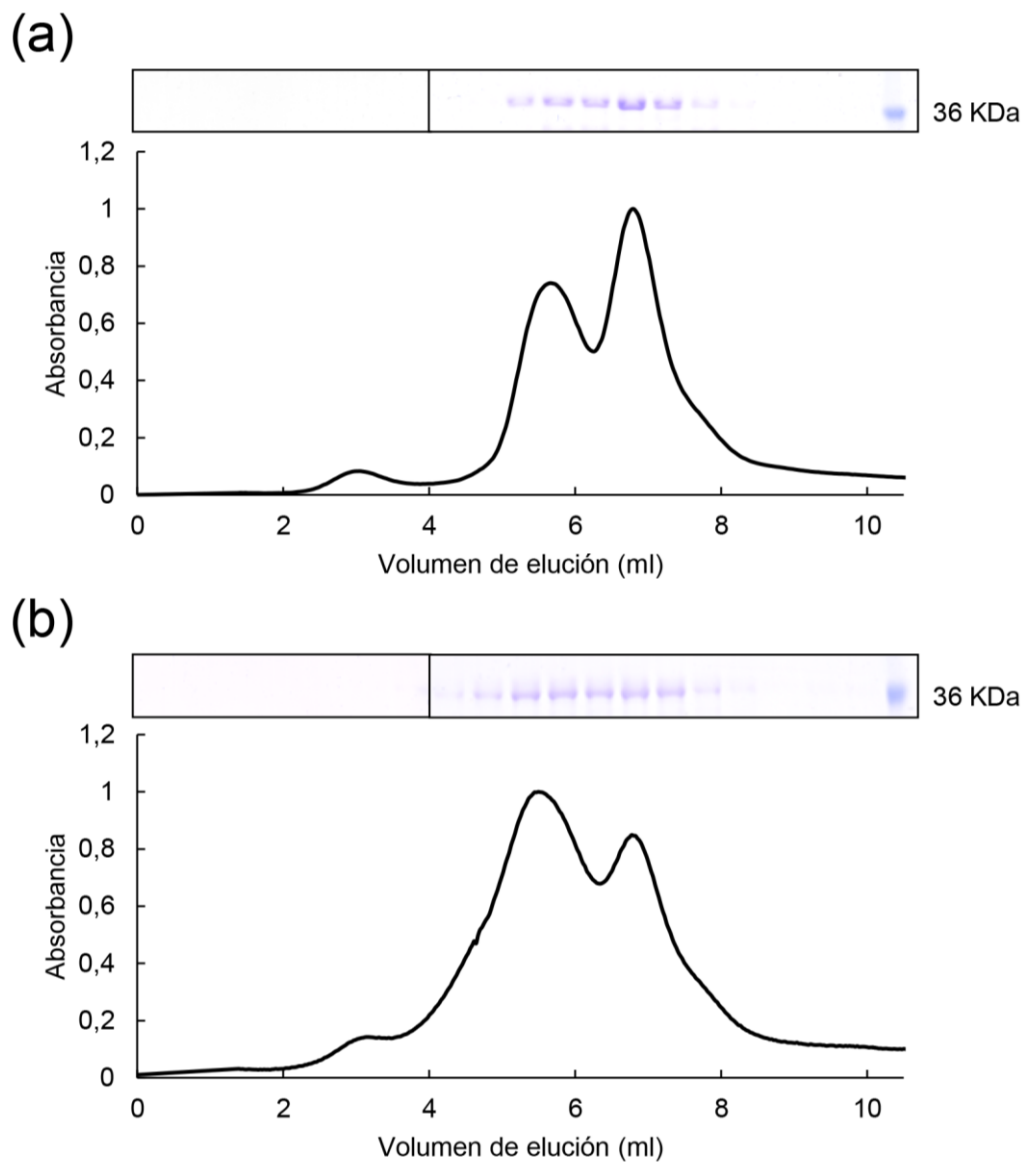


Figura 47. Cromatogramas de exclusión molecular en FPLC y perfil de elución de proteínas. Absorbancia a 280 nm normalizada de la cromatografía de exclusión molecular de (a) 30 μ M apo-*GmCCS* y (b) 30 μ M Cu⁺-*GmCCS*. Los paneles interiores corresponden con el análisis proteico por SDS-PAGE y tinción azul Coomassie de las fracciones eluidas.

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

1. CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL, LOCALIZACIÓN Y REGULACIÓN DE PAA2

La ATPasa de tipo P_{1B} PAA2 está involucrada en el transporte de Cu a través de la membrana tilacoidal (Abdel-Ghany y col., 2005b). En *A. thaliana* solo existe un gen que codifica para esta proteína (At5g21930), mientras que en *G. max* se han identificado dos genes diferentes (Bernal, 2006) en los cromosomas 6 (Glyma06g05890) y 4 (Glyma06g05900), que hemos denominado *GmPAA2-1* y *GmPAA2-2*, respectivamente. El genoma de *G. max* ha sufrido dos rondas de duplicación completa hace alrededor de 59 y 13 millones de años, lo que produjo una alta tasa de duplicación génica, donde alrededor del 75% de los genes están presentes en múltiples copias. Los dos eventos de duplicación fueron seguidos de diversificación y pérdida génica, así como de reorganizaciones cromosómicas (Schmutz y col., 2010). Todas las especies con genomas conocidos (plataforma Phytozome, Universidad de California, EEUU) que se analizaron cuentan con una secuencia que podría codificar para el transportador PAA2. El mantenimiento de los genes *PAA2* en las diferentes especies indica que PAA2 tiene una importante función en las plantas. A su vez, las especies *P. trichocarpa* y *M. truncatula* podrían contar con dos genes diferentes para *PAA2*, como ocurre en *G. max*. En cambio, la función de las isoformas adicionales de PAA2 no se conoce todavía.

Ambos genes de *G. max*, *GmPAA2-1* y *GmPAA2-2*, tienen una gran similitud en su secuencia, compartiendo un 77,73% de identidad entre ellos. En comparación con el gen *AtPAA2* de *A. thaliana*, el que muestra una mayor homología es *GmPAA2-1*, con un 69,02% de identidad, mientras que la identidad con *GmPAA2-2* es del 56,88%.

La secuencia codificante *GmPAA2-1*, obtenida experimentalmente, coincide con la publicada en la plataforma Phytozome (Universidad de California, EEUU), a excepción de una transversión C → T en la posición 2063. Esta mutación con cambio de sentido produce el reemplazo del aa Ala por Val en la posición 688 situada entre las hélices transmembrana 6 y 7 que no afecta a ninguno de los dominios funcionales, lo que indica que este cambio de base conservativo podría no tener relevancia en la funcionalidad de la proteína. A nivel de proteína, *AtPAA2* y *GmPAA2-1* comparten un 68,47% de identidad. Ambas proteínas tienen los dominios funcionales de las ATPasas de tipo P_{1B}, lo que indicaría que ambas proteínas podrían realizar funciones similares.

El gen *GmPAA2-1* está sujeto a un mecanismo de procesamiento alternativo (Bernal, 2006). El estudio de las secuencias codificantes de este gen reveló la existencia de una forma de procesamiento alternativo de *GmPAA2-1*, denominada *GmPAA2-1T* (*GmPAA2-1* truncado). *GmPAA2-1T* retiene 7 pb de la parte final del intrón 4. Esta inserción produce un cambio en el marco de lectura y, por tanto, un codón de STOP prematuro que produciría el truncamiento de la proteína. La traducción de este ARNm daría lugar a una proteína truncada que solo conservaría la región de unión a metal y las cuatro primeras zonas transmembrana, lo que parece indicar que esta proteína no sería capaz de realizar la función de transporte de Cu^+ a través de la membrana tilacoidal.

La región codificante del gen *GmPAA2-2* retiene un primer intrón teórico, lo que produce la aparición de un codón de STOP prematuro y, por tanto, conduciría al truncamiento de la hipotética proteína. Esta proteína solo conservaría la zona de unión a metal del extremo N-terminal.

En muchas especies de plantas se ha visto que una forma de procesamiento alternativo de *PAA1*, el transportador de Cu de la envuelta del cloroplasto, puede producir una proteína truncada (denominada PCH1) que conserva únicamente la región N-terminal de *PAA1* y podría actuar como chaperona de Cu para la misma *PAA1*. En otras especies, en cambio, se han identificado dos genes diferentes que codifican para el transportador *PAA1* y la chaperona de Cu^+ PCH1, respectivamente. En la especie *G. max* se han encontrado dos genes diferentes, además de eventos de procesamiento alternativo (Blaby-Haas y col., 2014). Este es un claro ejemplo de la diversificación funcional producida por eventos de procesamiento alternativo y duplicación génica, que pueden dar lugar a proteínas con diferentes funciones.

1.1. EXPRESIÓN HETERÓLOGA DE *GmPAA2-1* Y *GmPAA2-2* EN *E. COLI*

Se han llevado a cabo estudios bioquímicos de las ATPasas de tipo $\text{P}_{1\text{B}}$ como *AtPAA2* (Sautron y col., 2015), *AtPAA1* (Catty y col., 2011; Blaby-Haas y col., 2014), *AtHMA2*, *AtHMA4*, *AtHMA7* (Zimmermann y col., 2009) o *LpCopA* (Gourdon y col., 2011). Para ello, los dominios o las proteínas completas fueron sobreexpresados en bacterias, purificados y analizados. Uno de los objetivos de esta Tesis Doctoral fue la caracterización bioquímica del transportador *GmPAA2-1*. Para ello, la secuencia codificante del gen se clonó en el vector de expresión pBAD TOPO TA, que se utilizó para transformar las bacterias *E. coli* LMG194 haciendo diversas pruebas de sobreexpresión. Mediante SDS-PAGE y tinción Coomassie o western blot con anticuerpos diseñados contra un péptido sintético de la región N-terminal

(anti-*GmPAA2*_N-terminal) o en la zona del bucle soluble mayor (anti-*GmPAA2*_bucle) no fue posible la identificación de las proteínas, por lo que no se pudieron purificar para proceder a la subsecuente caracterización. En estudios recientes de otro laboratorio, se ha conseguido sobreexpresar la proteína *AtPAA2* en *L. lactis*. En este escenario se detectó una expresión muy baja, lo que los autores atribuyeron a las características intrínsecas del gen *AtPAA2* (Sautron y col., 2015). Es posible que estas características interfirieran aún más en el caso de la sobreexpresión en *E. coli*, lo que explicaría nuestros resultados negativos.

La secuencia codificante de *GmPAA2-2*, sin incluir la zona del péptido señal de tránsito al cloroplasto ni el codón de STOP, se clonó en el vector pBAD TOPO TA y se llevó a cabo un ensayo de sobreexpresión a escala piloto. Los extractos crudos bacterianos se analizaron por SDS-PAGE y western blot con anticuerpos anti-6xHis. Mediante estas técnicas no se detectó la proteína *GmPAA2-2*, por lo que no fue posible su posterior purificación. La finalidad principal de la obtención de la proteína *GmPAA2-2* recombinante purificada sería su caracterización bioquímica y funcional, además de la obtención de anticuerpos policlonales contra toda la proteína con el fin de detectar la presencia de esta nueva hipotética proteína en las plantas de soja. Debido a que la sobreexpresión en *E. coli* no fue detectada, se siguió otro enfoque para la obtención de los anticuerpos anti-*GmPAA2-2*. Los anticuerpos fueron diseñados contra un péptido sintético localizado en la secuencia de *GmPAA2-2* (apartado 1.5.3).

1.2. EXPRESIÓN DE *GmPAA2* EN *S. CEREVISIAE*

Las levaduras constituyen un sistema de expresión heteróloga en organismos eucariotas ampliamente utilizado. Se trata de un sistema muy versátil, de rápido crecimiento y fácil manipulación, que ofrece numerosas posibilidades (Cereghino y Cregg, 1999). Para el estudio de expresión heteróloga de las proteínas de *G. max* se utilizaron las levaduras mutantes *ccc2* (Gaxiola y col., 1998) y su correspondiente cepa silvestre BY4741. Las levaduras *ccc2* carecen de la proteína CCC2, una ATPasa de tipo P_{1B} que transporta Cu²⁺ (Fu y col., 1995) en el aparato de Golgi y que está involucrada en la carga de Cu de FET3 (Yuan y col., 1997), una multicobre oxidasa necesaria para el transporte de Fe de alta afinidad (Askwith y col., 1994). Las levaduras carecen de cloroplastos, por lo que el transportador de Cu de un sistema membranoso como es el aparato de Golgi ha sido previamente utilizado para el estudio del transportador de Cu del cloroplasto PAA1 (Catty y col., 2011), HMA1 (Mikkelsen y col., 2012), además del transportador de Cu⁺ de plantas localizado en el retículo endoplásmico, HMA7 (Hirayama y col., 1999).

Para el estudio de las proteínas PAA2 de *G. max*, las levaduras *ccc2* se transformaron con las construcciones con las secuencias codificantes sin incluir los péptidos señal de tránsito al cloroplasto de *GmPAA2-1*, *GmPAA2-1T* y *GmPAA2-2* en el vector pFL383 (Talke y col., 2006), que añade el epítipo de la hemaglutinina (HA) en el extremo N-terminal de la proteína. Mediante western blot con anticuerpos anti-HA se pudieron detectar las proteínas *GmPAA2-1* y *GmPAA2-1T* en los extractos proteicos de levaduras, siendo no detectable la proteína *GmPAA2-2*. Como controles negativos se utilizaron las levaduras mutantes *ccc2* y silvestres transformadas con el vector vacío.

En nuestro laboratorio contamos con dos anticuerpos contra diferentes péptidos sintéticos contenidos en la secuencia de *GmPAA2-1*, uno de ellos diseñado contra la región N-terminal y el otro contra el bucle de mayor tamaño expuesto al estroma. Ambos anticuerpos se utilizaron para la detección inmunológica de las proteínas en las muestras de levaduras sometidas previamente a western blot con anticuerpos anti-HA, como se describe anteriormente. Ambos anticuerpos anti-*GmPAA2* (anti-*GmPAA2*_N-terminal y anti-*GmPAA2*_bucle) no mostraron señal en las muestras analizadas, lo que parece indicar que estos anticuerpos podrían no reconocer a las proteínas contra las que fueron diseñados o la concentración de antígeno es insuficiente para ser detectados por estos anticuerpos. Hay que recordar que el anticuerpo monoclonal comercial anti-HA es mucho mejor (dilución 1:10000) que los obtenidos en nuestro laboratorio contra los dos péptidos sintéticos (dilución 1:200). Debido a estas indicaciones, el uso de estos anticuerpos contra péptidos sintéticos se sustituyó en posteriores experimentos por otros métodos de análisis.

Las levaduras mutantes *ccc2* se utilizaron para realizar un ensayo de complementación en levaduras con las proteínas *GmPAA2-1*, *GmPAA2-1T* y *GmPAA2-2*. Para ello, las secuencias codificantes de *GmPAA2-1*, *GmPAA2-1T* y *GmPAA2-2* se clonaron en el vector pFL61 (Minet y col., 1992). A pesar de que la proteína *GmPAA2-2* no se había detectado por western blot con anticuerpos anti-HA en las levaduras transformadas con la construcción de *GmPAA2-2* en el vector pFL383, como se ha descrito anteriormente, se decidió incluir esta construcción en el vector pFL61 en los análisis. Las levaduras *ccc2* mostraron un crecimiento limitado en medio SD-Ura suplementado con 20 μ M BCS y 20 μ M BPS en comparación con las levaduras silvestres. En el caso de las levaduras *ccc2* transformadas con las construcciones con *GmPAA2-1*, *GmPAA2-1T* o *GmPAA2-2*, todas mostraron un fenotipo similar a las levaduras *ccc2*, indicativo de que las proteínas de soja *GmPAA2-1*, *GmPAA2-1T* y *GmPAA2-2* no son capaces de revertir el fenotipo mutante y, por tanto, no pueden transportar Cu en la manera en la que lo hace la proteína CCC2 nativa. Como control del crecimiento de las levaduras, se sembraron diferentes diluciones de los

microorganismos en placas con medio SD-Ura, donde todas las cepas utilizadas fueron capaces de crecer de manera similar. Estos resultados podrían deberse a que las proteínas *GmPAA2* podrían insertarse en el retículo endoplásmico, como se ha visto en estudios en levaduras expresando *AtPAA2* (Sautron y col., 2015), u otros compartimentos diferentes al aparato de Golgi, o a que no tienen el plegamiento adecuado que les permita ser funcionales.

Con el fin de conocer la posible funcionalidad de las proteínas *GmPAA2-1*, *GmPAA2-1T* y *GmPAA2-2* en levaduras silvestres, éstas se transformaron con las construcciones citadas anteriormente y se evaluó el fenotipo de las levaduras con diferentes concentraciones de Cu añadidas al medio. En estudios previos, se ha visto que *AtPAA2* produce hipersensibilidad a Cu en las levaduras silvestres, debido probablemente a un exceso de Cu en el retículo endoplásmico transportado por *AtPAA2* (Sautron y col., 2015). En cambio, en las diferentes condiciones de Cu testadas con las levaduras silvestres expresando *GmPAA2-1*, *GmPAA2-1T* y *GmPAA2-2* no se observó el fenotipo de hipersensibilidad a Cu. Esto podría responder a múltiples cuestiones de localización o conformación, que podrían producir que la proteína no se encontrase en su forma activa funcional.

1.3. COMPLEMENTACIÓN FUNCIONAL DE LOS MUTANTES DE *A. THALIANA* *paa1-1* Y *paa2-1* CON *GmPAA2-1* Y *GmPAA2-2*

Los mutantes de *A. thaliana paa1-1* y *paa2-1* carecen de los transportadores de Cu⁺ *AtPAA1* y *AtPAA2*, respectivamente. Estos mutantes fueron generados en ecotipo Ler (*paa1-1*) y Col-3 (*paa2-1*) (Shikanai y col., 2003; Abdel-Ghany y col., 2005b). La caracterización genotípica de los mutantes se realizó mediante la amplificación y secuenciación de las zonas del genoma en las que se encontraban las mutaciones puntuales *paa1-1* y *paa2-1*. Se confirmó la presencia en homocigosis de los alelos mutantes en las plantas *paa1-1* y *paa2-1* de los genes *AtPAA1* y *AtPAA2*, respectivamente; así como la presencia de los alelos silvestres del transportador contrario en ambos mutantes.

Se realizó un ensayo de complementación en plantas *paa1-1* con las proteínas *GmPAA2-1* y *GmPAA2-2*, para lo cual se utilizaron plantas silvestres Ler, dos líneas transgénicas homocigotas independientes Ler con el vector vacío pMDC32 (Curtis y Grossniklaus, 2003), plantas mutantes *paa1-1*, dos líneas transgénicas heterocigotas independientes de plantas *paa1-1* expresando *GmPAA2-1* bajo el control del promotor CaMV 35S y una línea transgénica heterocigota de plantas *paa1-1* expresando *GmPAA2-2* bajo el control del promotor CaMV 35S. Las plantas *paa1-1* expresando tanto *GmPAA2-1* como *GmPAA2-2* correspondían con la segunda generación de plantas transgénicas (T2), lo que

implica que alrededor de un 75% de las semillas darían lugar a plantas transgénicas y un 25% de las semillas generarán plantas no transgénicas *paa1-1*. La identificación de ambos grupos de plantas se realizó mediante la caracterización genotípica de los individuos.

Las plantas utilizadas en el ensayo de complementación de *paa1-1* se sembraron en placas de plástico con medio ½ MS con 1% (p/v) sacarosa con o sin 10 µM CuSO₄ añadido al medio. El medio ½ MS se considera deficiente de Cu, ya que contiene una concentración subóptima de Cu para las plantas de *A. thaliana* (Abdel-Ghany y col., 2005b; Andrés-Colás y col., 2013). Las plantas también se crecieron directamente en tierra y se regaron con agua corriente o agua corriente con 1 mM CuSO₄. Se eligieron ambas condiciones nutricionales de Cu con el fin de poder discriminar de manera efectiva el fenotipo mutante *paa1-1* en las condiciones con menor concentración de Cu, y poder rescatarlo con la adición de Cu al cultivo (Shikanai y col., 2003). Por otra parte, se utilizaron estos dos métodos de cultivo diferentes (en placa y en tierra) para evaluar el fenotipo de las plantas, que se mostró más evidente en uno u otro sistema de cultivo según la característica fenotípica analizada.

Para evaluar la complementación funcional de *paa1-1*, se analizaron varios rasgos fenotípicos de las plantas, como son el peso fresco, el contenido de PC, el patrón de actividad SOD y la fluorescencia de la clorofila (Shikanai y col., 2003). Las diferencias en el peso fresco y el contenido en PC entre las plantas *paa1-1* y silvestres *Ler* se mostraron más evidentes en las plantas crecidas en tierra, mientras que las diferencias en la actividad SOD y fluorescencia de la clorofila fueron más evidentes en las plantas crecidas en placa. Por el contrario, en las plantas crecidas en placa no se observaron diferencias significativas en el peso de las plantas o el contenido en PC; y en las plantas crecidas en tierra, se observó de manera más sutil las diferencias en la actividad SOD o la fluorescencia de la clorofila.

Las plantas crecidas en tierra y regadas con agua corriente de ecotipo *Ler* y *Ler* con el vector vacío tenían un peso significativamente mayor que las plantas *paa1-1*, *paa1-1* expresando *GmPAA2-1* o *GmPAA2-2*. A su vez, las plantas *paa1-1* expresando *GmPAA2-1* o *GmPAA2-2* tenían un peso fresco similar a las plantas mutantes *paa1-1*. Estos resultados sugieren que las proteínas *GmPAA2-1* o *GmPAA2-2* no restablecen el fenotipo mutante *paa1-1*.

Se analizó el contenido de PC de las plantas mediante SDS-PAGE y western blot con anticuerpos anti-PC. En las plantas crecidas en tierra, pudo observarse una mayor cantidad de PC en las plantas de ecotipo *Ler* y *Ler* con el vector vacío en comparación con las plantas *paa1-1*, que mostraron una menor cantidad de PC. Las plantas *paa1-1* expresando *GmPAA2-*

1 o *GmPAA2-2* contenían una cantidad de PC similar a la de los mutantes *paa1-1*, e inferior a la de las plantas *Ler* y *Ler* con el vector vacío. Estos resultados parecen indicar de nuevo la no complementación de los mutantes *paa1-1* con las proteínas de soja *GmPAA2-1* y *GmPAA2-2*.

El análisis de la actividad SOD reveló diferencias entre los mutantes *paa1-1* y las plantas silvestres *Ler*. En las plantas *paa1-1* crecidas en placa con medio ½ MS con 1% (p/v) sacarosa, se observó una mayor actividad Cu/ZnSOD y menor actividad FeSOD en comparación con las plantas *Ler* o *Ler* con el vector vacío. Esta observación está en concordancia con estudios previos, en los que se ha descrito que la actividad CSD1 se ve aumentada, mientras que la actividad FeSOD se ve disminuida en las plantas *paa1-1* en comparación con las plantas silvestres (Shikanai y col., 2003). Por otra parte, las plantas *paa1-1* expresando *GmPAA2-1* o *GmPAA2-2* mostraron un patrón de actividad SOD comparable al de las plantas mutantes *paa1-1*, lo que parece indicar de nuevo que *GmPAA2-1* o *GmPAA2-2* no complementan al mutante *paa1-1*.

Se realizó un estudio de la fotosíntesis en las plantas mediante el análisis de la fluorescencia de la clorofila. Las plantas *paa1-1* mostraron una eficiencia fotoquímica del PSII significativamente menor y una cantidad de centros de reacción de PSII cerrados (lado aceptor de electrones reducido del PSII) significativamente mayor en comparación con las plantas *Ler* y *Ler* con el vector vacío. Estas diferencias se deben a que las plantas *paa1-1* tienen el transporte electrónico fotosintético afectado, debido al cual muestran un fenotipo de alta fluorescencia (Shikanai y col., 2003), ya que la reducción en la función de la PC produce una disminución en la eficiencia del transporte electrónico fotosintético (Abdel-Ghany y Pilon, 2008). El análisis de la fluorescencia en las plantas *paa1-1* expresando *GmPAA2-1* o *GmPAA2-2*, reveló unos resultados similares a las plantas mutantes *paa1-1*, sugiriendo, de nuevo, la no complementación de los mutantes *paa1-1*.

Tomando estos datos en su conjunto, las características fenotípicas analizadas coincidieron en que las proteínas *GmPAA2-1* y *GmPAA2-2* no parecen ser capaces de complementar el fenotipo mutante *paa1-1*, lo que indica que *GmPAA2-1* y *GmPAA2-2* no pueden realizar la función de *AtPAA1*. Esta observación concuerda con el hecho de que las plantas *paa1-1* tienen un mayor contenido de *AtPAA2* que las plantas silvestres (Tapken y col., 2012) y, a pesar de ello, siguen teniendo defectos fenotípicos (Shikanai y col., 2003). Este aumento de *AtPAA2* podría deberse a un menor contenido de Cu en el cloroplasto que hace que la proteína PAA2 sea más estable, y pueda intensificarse el tráfico de Cu hacia la proteína esencial PC (Tapken y col., 2015). De esta forma, parece que las proteínas PAA2 y

PAA1 tienen su propia función específica, por lo que sus papeles en la homeostasis del Cu no se solaparían.

A continuación se realizó la complementación del mutante *paa2-1* de *A. thaliana* con *GmPAA2-1* y *GmPAA2-2*. Debido a que las plantas *paa2-1* no tienen un fenotipo apreciable en condiciones de crecimiento normales, se testaron diversos medios de cultivo para encontrar diferencias entre estos mutantes y las plantas silvestres. En estos ensayos se utilizaron plantas crecidas en placas de cristal lavadas con HCl, agar lavado con EDTA y medio Hoagland I sin Cu añadido (ver apartado 1.3.2 de Materiales y Métodos), o con 0,5 μM CuSO_4 . Estas plantas se utilizaron para medir el peso fresco, expresión semicuantitativa de los transgenes, contenido de PC y actividad SOD. Además, se utilizaron plantas crecidas en placas de plástico con medio $\frac{1}{2}$ MS con 0,1% (p/v) sacarosa que se utilizaron para medir el peso fresco. También, se utilizaron plantas crecidas directamente en tierra y regadas con agua corriente, las cuales se utilizaron para hacer el estudio de la fotosíntesis por fluorescencia de la clorofila.

Las líneas de plantas utilizadas para este estudio fueron de ecotipo silvestre Col-3, mutante *paa2-1*, 3 líneas transgénicas homocigotas independientes de plantas *paa2-1* expresando *GmPAA2-1-YFP*, 2 líneas transgénicas homocigotas independientes de plantas *paa2-1* expresando *GmPAA2-1*, 3 líneas transgénicas homocigotas independientes de plantas *paa2-1* expresando *GmPAA2-2-YFP* y 2 líneas transgénicas homocigotas independientes de plantas *paa2-1* expresando *GmPAA2-2*, todas ellas bajo el control del promotor constitutivo CaMV 35S. En este experimento, al ser homocigotas todas las líneas transgénicas utilizadas, no fue necesaria la caracterización genética posterior de las plantas, dado que el 100% de las semillas generaron una progenie homocigota.

Las plantas cultivadas en las diferentes condiciones citadas anteriormente no mostraron diferencias fenotípicas visibles apreciables. El análisis del peso fresco de las plantas cultivadas en placas con medio Hoagland I sin Cu añadido no mostró diferencias significativas entre las plantas silvestres y las mutantes. En el caso de las plantas en placas de plástico con medio $\frac{1}{2}$ MS y 0,1% (p/v) sacarosa, se vio una reducción significativa del peso en las plantas *paa2-1* respecto de las silvestres Col-3. En estas condiciones, las plantas *paa2-1* expresando *GmPAA2-1-YFP* y *GmPAA2-2-YFP* mostraron un aumento significativo del peso respecto de *paa2-1*, aunque significativamente inferior al silvestre. Las plantas *paa2-1* expresando *GmPAA2-1* mostraron un peso similar al del silvestre. Esto indica que la proteína *GmPAA2-1* podría complementar el fenotipo silvestre y realizar la función de *AtPAA2* en las

plantas. A su vez, la proteína *GmPAA2-2*, aun no siendo un transportador de membrana, podría tener una función que constituyera una ventaja para las plantas.

Con el fin de confirmar la expresión de los transgenes introducidos en las diferentes líneas de plantas, se analizó la expresión mediante PCR semicuantitativa, y se vio que todas las líneas transgénicas expresaban los transgenes tanto en medio Hoagland I sin Cu añadido como con 0,5 μM CuSO_4 .

En los mutantes *paa2-1*, la PC se encuentra mayoritariamente en forma de apoproteína sin su cofactor Cu, lo que es debido a un transporte insuficiente de Cu hacia el lumen tilacoidal. En cambio, en las plantas silvestres, la PC se encuentra principalmente en forma de holoproteína con Cu (Abdel-Ghany y col., 2005b). El contenido en holo- y apo-PC se estudió mediante western blot con anticuerpos anti-PC. En las plantas crecidas en placa con medio Hoagland I sin Cu añadido se observó una mayor cantidad de apo-PC en todas las líneas analizadas, debido, probablemente, a la limitada cantidad de Cu en el medio de cultivo. A pesar de ello, en las plantas Col-3 puede detectarse una pequeña fracción de holo-PC, así como en las plantas *paa2-1* expresando *GmPAA2-1* y algunas líneas de plantas *paa2-1* expresando *GmPAA2-1-YFP*. En las condiciones de cultivo en placa con medio Hoagland I con 0,5 μM CuSO_4 , se observó una mayor cantidad de holo-PC en las plantas silvestres Col-3 y una acumulación de apo-PC en las plantas *paa2-1*, de acuerdo con datos publicados anteriormente (Abdel-Ghany y col., 2005b). En algunas de las líneas de plantas *paa2-1* expresando *GmPAA2-1-YFP*, se observó también una mayor cantidad de holo-PC, especialmente en la línea 2, aunque menor respecto de las plantas silvestres. Esto podría indicar una complementación parcial de los mutantes, debido, probablemente, a la fusión con la proteína YFP, que podría dificultar el plegamiento o correcto funcionamiento del transportador, disminuyendo así su funcionalidad. Las plantas *paa2-1* expresando *GmPAA2-1* tienen un contenido de holo-PC similar al silvestre, lo que indica una restitución de la función PAA2 en las plantas y un correcto transporte del Cu hacia el lumen tilacoidal. Las plantas *paa2-1* expresando *GmPAA2-2-YFP* muestran un alto contenido de apo-PC, similar a las plantas *paa2-1*. Esto parece indicar que la proteína *GmPAA2-2-YFP* no es capaz de realizar la función del transportador *AtPAA2*. A pesar de ello, el hecho de que las plantas *paa2-1* expresando *GmPAA2-2* tengan un peso superior al de las plantas *paa2-1* podría indicar que *GmPAA2-2* tiene otra función diferente que supondría una característica favorable para las plantas en las condiciones testadas.

Adicionalmente, se realizó un ensayo de actividad SOD en las plantas crecidas en placas con medio Hoagland I sin Cu añadido o con 0,5 μM CuSO_4 . En medio sin Cu añadido

no se observaron diferencias en el patrón de actividad SOD de las plantas silvestres Col-3 y mutantes *paa2-1*. En cambio, en medio con 0,5 μM CuSO_4 se observó una ligera diferencia entre las plantas silvestres Col-3, que parecían tener menor actividad Cu/ZnSOD que las mutantes *paa2-1*. Las plantas *paa2-1* expresando tanto *GmPAA2-1-YFP* como *GmPAA2-2-YFP* parecen ser similares a *paa2-1*, mientras que las plantas *paa2-1* expresando *GmPAA2-1* parecen tener un patrón de actividad SOD semejante a las plantas silvestres. Todo esto estaría de acuerdo con una mayor o menor concentración de Cu en el estroma cloroplástico como consecuencia de la ausencia o presencia de *GmPAA2-1* funcional en el tilacoide. No obstante, las diferencias en la actividad SOD observadas en este ensayo fueron muy ligeras.

Los mutantes *paa2-1* tienen un fenotipo de alta fluorescencia de la clorofila, debida al defecto en el transporte electrónico fotosintético (Abdel-Ghany y col., 2005b). Mediante el análisis de la fluorescencia de la clorofila se detectaron diferencias en el rendimiento cuántico del PSII y la proporción de centros de reacción cerrados entre las plantas silvestres Col-3 y mutantes *paa2-1*. Algunas de las líneas *paa2-1* expresando *GmPAA2-1-YFP* parecen tener un fenotipo intermedio que podría indicar la complementación parcial de *paa2-1*, especialmente en la línea 2. Mientras que las líneas *paa2-1* expresando *GmPAA2-1* tienen un fenotipo similar al silvestre, por lo que parecen complementar al mutante *paa2-1*. Las líneas *paa2-1* expresando *GmPAA2-2-YFP* y *GmPAA2-2* parecen ser similares al mutante *paa2-1*, por lo que no serían capaces de complementar el fenotipo *paa2-1*.

Los resultados en conjunto parecen indicar que la proteína de soja *GmPAA2-1* es capaz de realizar la función del transportador de *A. thaliana* *AtPAA2*. Lo que es concordante con la alta identidad entre ambas proteínas y la presencia de dominios funcionales homólogos en su estructura. La construcción de la proteína *GmPAA2-1* fusionada a la YFP produjo una complementación parcial de los mutantes *paa2-1*, lo que indica que esta proteína es capaz de realizar la función del transportador de *A. thaliana* *AtPAA2*, aunque posibles interferencias de la proteína YFP podrían disminuir la actividad transportadora. En el caso de *GmPAA2-2* y *GmPAA2-2-YFP*, estas proteínas parecen no ser capaces de complementar los mutantes *paa2-1*, que sería concordante con que *GmPAA2-2*, que no está presente en *A. thaliana*, es una proteína troncada que contiene únicamente el dominio N-terminal con el dominio de unión a metal HMB. Al carecer del resto de los dominios estructurales del transportador PAA2, no podría realizar la función del transportador *AtPAA2*. A pesar de ello, *GmPAA2-2* podría tener una función alternativa en la homeostasis del Cu en el cloroplasto.

1.4. LOCALIZACIÓN DE *GmPAA2-1* Y *GmPAA2-2*

Estudios previos determinaron la localización de la proteína de *A. thaliana AtPAA2* en la membrana tilacoidal mediante técnicas de transformación transitoria en protoplastos de *A. thaliana* (Abdel-Ghany y col., 2005b). Similares resultados se obtuvieron en plantas de *G. max*, donde se vio que *GmPAA2-1* se localiza en la membrana tilacoidal utilizando técnicas inmunológicas (Bernal y col., 2007). Estas observaciones concordaban con la hipótesis de que *GmPAA2-1* realizara la función de su homóloga en *A. thaliana*, *AtPAA2*. A través de la expresión transitoria en protoplastos y la generación de líneas transgénicas estables de *A. thaliana*, se estudió la localización de las proteínas *GmPAA2-1* y *GmPAA2-2*. Se utilizaron construcciones para generar proteínas de fusión con la proteína YFP en posición C-terminal. Se eligió este tipo de construcción debido a que las proteínas *GmPAA2-1* y *GmPAA2-2* tendrían en el extremo N-terminal las secuencias de tránsito al cloroplasto.

Tanto los protoplastos transformados transitoriamente como las plantas transgénicas estables se analizaron mediante microscopía láser confocal. Como control se utilizaron protoplastos transformados con el vector vacío o plantas transgénicas homocigotas con el vector vacío. Ambos métodos de transformación, transitoria y estable, produjeron resultados comparables. La proteína *GmPAA2-1*-YFP mostró señal de fluorescencia en los cloroplastos, posiblemente en los tilacoides, en concordancia con los estudios realizados anteriormente en *G. max* (Bernal y col., 2007) y *A. thaliana* (Abdel-Ghany y col., 2005b). La proteína *GmPAA2-2*-YFP también mostró una fuerte fluorescencia en los cloroplastos, especialmente en las células guarda de los estomas.

Como se ha descrito anteriormente, las plantas *paa2-1* expresando *GmPAA2-1*-YFP parecen ser capaces de complementar de manera parcial el fenotipo *paa2-1* (apartado 1.3), esto indicaría que la proteína de fusión es capaz de realizar la función de transporte de Cu a través de la membrana del tilacoide, aunque de manera menos eficiente que la proteína sin la fusión con la YFP. Esto daría más validez a la localización de las proteínas *in vivo* por microscopía láser confocal, debido al hecho de que si éstas son capaces de realizar su función en la planta, lo más probable es que la localización subcelular se haya producido de manera correcta.

1.5. ANÁLISIS Y REGULACIÓN DE PAA2

1.5.1. Análisis del patrón de expresión del promotor de *AtPAA2*.

El promotor del gen *AtPAA2* contiene motivos reguladores comunes en los promotores de plantas (Figura 25). Estos incluyen elementos de respuesta a la luz (Giuliano y col., 1988; Lam y Chua, 1989; Terzaghi y Cashmore, 1995; Martínez-García y col., 2000; Chan y col., 2001; Hudson y Quail, 2003). La luz es un estímulo que regula gran cantidad de genes en las plantas, implicados en múltiples funciones como la germinación de semillas, fotomorfogénesis, fototropismos, movimiento de los cloroplastos, evasión de la sombra, ritmos circadianos e inducción floral (Jiao y col., 2007). A su vez, las hormonas son moléculas que organizan muchos procesos fisiológicos a través de una interacción orquestada (Chapman y Estelle, 2009). Además de elementos de respuesta a la luz, el promotor de *AtPAA2* cuenta con elementos de respuesta a hormonas como el ácido abscísico (ABA), citoquininas (CK), auxinas, giberelinas (GA) y ácido salicílico (SA). Esto sugiere una expresión altamente regulada para asegurar la expresión génica en el punto espacio-temporal adecuado.

Dentro de los elementos reguladores encontrados en el promotor de *AtPAA2*, los motivos relacionados con el ABA son los que se encuentran más representados. En los transportadores de Cu^+ de la familia COPT, tanto en la especie *A. thaliana* como *O. sativa*, también se encuentran abundantes elementos reguladores relacionados con el ABA (Peñarrubia y col., 2015). El ABA es un sesquiterpenoide derivado del isopentenil pirofosfato (Nambara y Marion-Poll, 2005). Es una de las principales hormonas vegetales con importantes funciones en el crecimiento de las plantas y el desarrollo (Leung y Giraudat, 1998). Controla varios procesos fisiológicos durante el desarrollo y germinación de las semillas. Durante el crecimiento vegetativo, el ABA media la respuesta a diferentes condiciones ambientales adversas, como son la exposición a drogas, elevada salinidad y frío (Zhang y col., 2015). Las citoquininas son hormonas que controlan una amplia variedad de procesos cruciales en el desarrollo de las plantas (Zwack y Rashotte, 2015), se identificaron como inductores de la división celular (Miller y col., 1955) y, actualmente, se conoce como un regulador clave del ciclo celular (Kieber y Schaller, 2014). Las auxinas son reguladores esenciales del crecimiento de la planta, con importancia en la elongación y división celular. Entre las auxinas, la más activa es el ácido indolacético (AIA) (Hardtke, 2007). Las giberelinas son fitohormonas esenciales que controlan varios aspectos del desarrollo de las plantas, incluyendo la germinación de semillas, expansión de las hojas, elongación de los tallos, floración y desarrollo de las semillas. Las giberelinas muestran una relación con otras hormonas como el ABA, las auxinas y las citoquininas (Gantait y col., 2015).

La luz y las hormonas integran importantes señales ambientales con los programas de desarrollo intrínseco de las plantas, son importantes elementos responsables de la organización de la expresión génica en las plantas (Zdarska y col., 2015). En el gen *AtPAA2*, se han encontrado elementos regulados por diferentes componentes, lo que sugiere una elevada coordinación de la integración de los estímulos por parte de la planta, así como el estado de desarrollo y comunicación entre los diferentes tejidos.

Debido a la presencia de diferentes motivos de regulación por luz en el promotor de *AtPAA2*, se llevó a cabo un estudio de la expresión de dicho gen en condiciones de elevada y baja luz. En las condiciones testadas, parece que la expresión de dicho gen no varía de forma apreciable, por lo que parece que el efecto de la luz podría producirse por otros mecanismos que no fueran la intensidad de la luz, como podría ser la calidad de la luz (longitud de onda) o duración.

Por otra parte, se ha visto que la regulación de *AtPAA2* se produce a nivel de proteína por un mecanismo dependiente de la cantidad de Cu (Tapken y col., 2015), mientras que a nivel transcripcional, la expresión de *AtPAA2* parece que muestra una leve reducción en las plantas en función de la adición de Cu (Tapken, 2012). Por lo que se estudió si la adición de Cu al medio tiene, a su vez, un efecto en la expresión génica a nivel de la actividad del promotor. En las plantas crecidas en medio $\frac{1}{2}$ MS con 1% (p/v) sacarosa y 10 μ M CuSO_4 se observó una ligera disminución en la actividad del promotor de *AtPAA2* respecto de las plantas control, por lo que parece que el Cu podría tener un efecto menor en la regulación de *AtPAA2* a nivel de promotor.

En todas las condiciones testadas, los tejidos en los que se detectaba una mayor actividad del promotor de *AtPAA2* parecían ser los mismos, lo que sugiere un fuerte control de la regulación espacial. Las plantas mostraron la elevada actividad del promotor en las hojas, observándose también actividad en los haces vasculares y peciolo, mientras que la actividad era reducida en las hojas más jóvenes y raíces. Estos datos parecen coincidir con estudios previos realizados por PCR semicuantitativa, donde se comprobó que la expresión de *AtPAA2* era predominante en la parte aérea de la planta en comparación con la parte radicular (Abdel-Ghany y col., 2005b). Por otra parte, la distribución espacial de la actividad del promotor de *AtPAA2* se superpone parcialmente con la observada en el promotor *AtPAA1*, en los márgenes de las hojas y vasculatura (Lee y col., 2012).

1.5.2. Estudio de la región 5' del gen *GmPAA2-2*

Las secuencias del gen *GmPAA2-2*, obtenidas experimentalmente (apartado 1), contenían un primer intrón hipotético que conducía, por tanto, al truncamiento de la proteína por la aparición de un codón de STOP prematuro. Por esta razón, se analizó el inicio de la transcripción de este gen en busca de un posible inicio alternativo que pudiera dar lugar a una proteína completamente procesada. Este análisis se llevó a cabo por la técnica de 5' RACE.

Se obtuvieron un total de 47 secuencias positivas para el inicio de la transcripción del gen *GmPAA2-2*. Treinta de las secuencias provenían de plantas crecidas en medio sin Cu añadido. En estas condiciones, se encontraron diferentes puntos de inicio de la transcripción. Se localizó una secuencia que se iniciaba en la posición -175, tomando como 1 el inicio de la traducción; 5 secuencias que se iniciaban en la posición -174; 10 secuencias en -56 y 14 secuencias en -20. En las plantas crecidas con 0,5 μM CuSO_4 , se encontraron diferentes inicios de la transcripción, localizándose 2 secuencias con inicio en -49 y 5 secuencias en -25. En las plantas crecidas con 10 μM CuSO_4 , se encontraron 4 secuencias iniciadas en -25; 2 secuencias en -24; y 4 secuencias en -10. En conjunto, se encontraron secuencias más largas en las plantas crecidas sin Cu añadido que en las crecidas con mayores concentraciones de Cu, donde se encontraron secuencias más cortas en el extremo 5'.

Como se detalló anteriormente, en las tres condiciones nutricionales de Cu diferentes testadas se detectaron transcritos del gen *GmPAA2-2*. A su vez, todas las secuencias encontradas retenían un primer intrón teórico, que produciría el truncamiento de la hipotética proteína, que solo mantendría la región de unión a metal en el extremo N-terminal. El análisis de las secuencias no mostró otro inicio de la transcripción que pudiera dar lugar a una proteína completamente procesada que por traducción produjera un transportador completo.

Como control de la técnica se analizó el inicio de la transcripción de los genes *GmPAA2-1* y *GmPAA1*. En el análisis del gen *GmPAA2-1*, se encontraron dos puntos de inicio de la transcripción diferentes: uno en la posición -55 en las plantas crecidas en medio sin Cu añadido y otro en la posición -22 en plantas crecidas con 10 μM CuSO_4 . Estos resultados de nuevo muestran una secuencia 5' UTR (región 5' no traducida) más larga en el caso de plantas crecidas en medio sin Cu añadido y más corta en plantas crecidas con 10 μM CuSO_4 .

En el gen *GmPAA1* se encontraron dos inicios de la transcripción próximos, uno de ellos en la posición -57 en plantas crecidas en medio sin Cu añadido y el otro en la posición -60 en plantas crecidas con 10 μM CuSO_4 .

En conjunto, los resultados indican la retención de un intrón teórico en la secuencia del gen *GmPAA2-2*, no detectándose ninguna forma de procesamiento alternativo de *GmPAA2-2* que pudiera dar lugar a una proteína completa. Las plantas cultivadas con diferentes regímenes nutricionales de Cu mostraron diferentes inicios de la transcripción del gen *GmPAA2-2*, lo que podría tener algún papel funcional o regulatorio. En diferentes genes se ha descrito que el uso de múltiples inicios de la transcripción puede aumentar la flexibilidad en la regulación génica, afectar a la eficiencia de traducción, producir una diferente especificidad o conducir a la producción de isoformas de proteínas que difieren en su extremo N-terminal (Navarro-Avino y col., 1999; Morere-Le Paven y col., 2007; Thatcher y col., 2007; Daras y col., 2014).

1.5.3. Regulación transcripcional de *GmPAA2-1* y *GmPAA2-2*

Las semillas de *G. max* se germinaron en oscuridad durante tres días y se mantuvieron durante otros 4 días adicionales en vermiculita. A continuación se transfirieron las plantas a cultivo hidropónico en solución Hoagland II con tres concentraciones de Cu diferentes: sin Cu añadido, 0,5 μM CuSO_4 y 10 μM CuSO_4 , donde crecieron durante dos semanas (ver apartado 1.3.7 de Materiales y Métodos).

Las plantas, cultivadas según se detalla anteriormente, mostraron características fenotípicas asociadas a los diferentes tratamientos de Cu. Las plantas crecidas en medio Hoagland II sin Cu añadido tenían los tallos más largos que las plantas crecidas con 0,5 μM CuSO_4 , mientras que las plantas cultivadas con 10 μM CuSO_4 tenían un peso fresco estadísticamente menor en tallo, hoja y raíz; y mostraban un retraso en el crecimiento, por lo que solo tenían 3 hojas diferenciadas, mientras que las plantas cultivadas sin Cu añadido y con 0,5 μM CuSO_4 tenían 4 hojas.

La cantidad de Cu en las plantas respondía al aporte en el medio, conteniendo una cantidad de Cu significativamente menor las plantas crecidas sin Cu añadido que las plantas con 0,5 μM CuSO_4 , así como una cantidad significativamente mayor las plantas crecidas con 10 μM CuSO_4 , en concordancia con otros estudios (Bouazizi y col., 2010; Lequeux y col., 2010; Leng y col., 2015). A su vez, las raíces fueron los órganos donde el Cu se acumulaba en mayor cantidad en todos los tratamientos, respuesta que también se ha observado en *A. thaliana* (Wojcik y Tukiendorf, 2003). Esto podría deberse a un mecanismo de tolerancia desarrollado por las plantas para reducir el efecto del estrés por Cu (Yurekli y Porgali, 2006). En la distribución del Cu por la planta se ha visto que las hojas maduras tienen una acumulación de Cu significativamente mayor que las hojas jóvenes, similar a los resultados

encontrados en otros estudios en *G. max* (Sagasti y col., 2014), lo que puede deberse a que el Cu no tiene una elevada movilidad en las plantas y, por eso, los síntomas de deficiencia suelen presentarse en las hojas jóvenes en primer lugar (Marschner, 1995).

Las plantas crecidas en exceso de Cu mostraron una disminución significativa de los elementos Mn, Zn, Mo, K, Mg, P y S en raíces y hojas; y de Fe, B y Ca en hojas. En otras plantas como *A. thaliana*, se ha visto un aumento del Zn en plantas tratadas con exceso de Cu, así como un aumento del Fe conforme al aumento de Cu (Andrés-Colás y col., 2013). En *Phaseolus vulgaris* también se ha descrito una disminución del Zn, K y Ca en las hojas de plantas tratadas con alto Cu (Bouazizi y col., 2010), y en *Brassica napus* un aumento de la toma de Mo y una disminución de B, Mg y Na en las hojas de plantas sometidas a deficiencia de Cu (Billard y col., 2014). Esto sugiere un desequilibrio en el metabolismo de otros nutrientes debido a un efecto de los tratamientos de Cu en las plantas.

El estado nutricional de Cu en la planta afecta la expresión de las SOD en plantas, ya que están regulada por este metal y, por tanto, se trata de un indicativo del estado de las plantas en las condiciones testadas (Cohu y Pilon, 2007). En las plantas crecidas sin Cu añadido, se observó una mayor actividad FeSOD, mientras que la actividad de las isoformas Cu/ZnSOD era mucho menor que en las plantas crecidas con 0,5 μM CuSO_4 . También se observaron diferencias entre las diferentes hojas de la planta, encontrándose una mayor actividad FeSOD y menor actividad Cu/ZnSOD en las hojas más jóvenes en comparación con las hojas más maduras. Esto podría deberse a la mayor acumulación del Cu en las hojas maduras. En las plantas cultivadas con 10 μM CuSO_4 se apreció una mayor actividad de las isoformas Cu/ZnSOD respecto de las crecidas con 0,5 μM CuSO_4 , lo que concuerda con un mayor contenido de Cu en las plantas tratadas con 10 μM CuSO_4 .

Los resultados de actividad SOD se complementaron con un análisis por PCR cuantitativa a tiempo real de las isoformas cloroplásticas *GmCSD2* y *GmFSD1*. Este análisis confirmó la expresión de *GmCSD2* principalmente en las hojas de las plantas crecidas con 0,5 y 10 μM CuSO_4 , mientras que *GmFSD1* se expresaba principalmente en las hojas de las plantas crecidas sin Cu añadido, especialmente en las hojas más jóvenes. Estos resultados guardan una buena relación con el contenido de Cu en las hojas de las plantas y el estudio de la actividad de las diferentes isoformas de las SOD.

Paralelamente se evaluó la expresión de otros genes de respuesta a Cu, como son los genes que codifican para las chaperonas de Cu *GmCCS* y *GmCCH*. Se vio que el gen de *GmCCS* se expresaba principalmente en las hojas de las plantas crecidas con 0,5 μM CuSO_4

y 10 μM CuSO_4 , mientras que *GmCCH* se expresaba en las plantas crecidas sin Cu añadido (Mira y col., 2001a; Ravet y col., 2011). Otro de los genes de respuesta a Cu estudiados fue el transportador de Cu *GmCOPT2*. Este transportador se expresa principalmente en las hojas de las plantas crecidas sin Cu añadido, concordante con estudios previos (Yamasaki y col., 2009; Perea-García y col., 2013; Billard y col., 2014). Por otra parte, en las hojas de plantas crecidas sin Cu añadido se puede diferenciar entre las hojas más maduras, que poseen más Cu, y las más jóvenes. En las hojas más maduras se observa una menor expresión de los genes *GmFSD1*, *GmCCH* y *GmCOPT2*, y una mayor expresión de *GmCCS* respecto de las hojas más jóvenes. De esta forma, se ponen de manifiesto de nuevo las diferencias entre las hojas más maduras y jóvenes debido a la diferente cantidad de Cu en los tejidos.

La regulación transcripcional de *GmPAA2-1* y *GmPAA2-2* se estudió por PCR cuantitativa a tiempo real. Los resultados indicaron una disminución en la expresión del gen *GmPAA2-1* en las hojas de las plantas crecidas en medio sin Cu añadido respecto de las plantas crecidas con 0,5 μM CuSO_4 , significativa en las hojas H2, H3 y H4; y un aumento en la expresión en las plantas crecidas con 10 μM CuSO_4 respecto de las plantas crecidas con 0,5 μM CuSO_4 , significativo en las hojas H1, que corresponden con las más maduras. Esto revela diferencias respecto de la especie *A. thaliana*, donde la regulación de *AtPAA2* por Cu no se produce a nivel transcripcional sino postranscripcional (Tapken y col., 2012; Tapken y col., 2015). El gen *GmPAA2-2* se detectó en todos los tejidos y condiciones analizados aunque su expresión parecía mucho menor a la de *GmPAA2-1*. A diferencia de *GmPAA2-1*, el gen *GmPAA2-2* no parece tener una regulación transcripcional por Cu.

1.5.4. Identificación de proteínas *GmPAA2* en *G. max*

La identificación de las diferentes proteínas *GmPAA2* en la planta *G. max* se ha llevado a cabo mediante western blot con anticuerpos diseñados contra un péptido sintético (LQDRREAKDSP) del N-terminal. Mediante este enfoque se pretendía identificar las diferentes proteínas *GmPAA2* en la planta de soja para poder determinar su presencia *in vivo*. Utilizando este anticuerpo se identificó una banda de alrededor de 90 kDa de peso molecular aparente que podría corresponder con el transportador *GmPAA2-1* completo en los cloroplastos, tilacoides y, en menor cantidad, en estroma. Estos resultados parecen corresponder con estudios previos (Bernal y col., 2007). También se observaron dos bandas de alrededor de 35 kDa, las cuales podrían corresponder con la isoforma *GmPAA2-1T*, que también se localizan en cloroplastos, tilacoides y estroma. La identidad de las bandas obtenidas se confirmará por métodos de secuenciación e identificación, que permitiría la confirmación de la existencia de las diferentes isoformas de *GmPAA2 in vivo*, así como la

utilización de este anticuerpo en futuros estudios. En cambio, no se detectó ninguna banda cuyo peso molecular pudiera corresponder con *GmPAA2-2*. Esto podría ser debido a diversos motivos. Uno de ellos podría ser que la expresión de *GmPAA2-2* es muy baja en comparación de *GmPAA2-1* (apartado 1.5.3), lo que podría conllevar la imposibilidad de su detección con este anticuerpo en las condiciones testadas.

2. ESTUDIO DEL ESTADO OLIGOMÉRICO DE LA CHAPERONA DE COBRE CCS E INTERACCIÓN CON SU LIGANDO

2.1. SOBREENPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE *GmCCS* RECOMBINANTE

La chaperona de Cu *GmCCS* se encarga de entregar el cofactor Cu a su diana, la Cu/ZnSOD en el cloroplasto y citosol (Puig y Thiele, 2002). Para el estudio de la chaperona, la secuencia codificante de *GmCCS* sin el péptido señal de tránsito al cloroplasto se clonó en el vector de expresión en bacterias pBAD TOPO TA, que cuenta con el promotor inducible por L-arabinosa P_{BAD} y añade una cola de seis His en el extremo C-terminal, que facilita la posterior purificación de la proteína. Las bacterias se transformaron con la construcción, se indujo la expresión de la proteína de fusión mediante la adición de L-arabinosa y se purificó mediante un único paso de cromatografía Co^{2+} -IMAC. La proteína purificada, según se obtuvo, se encontraba predominantemente en forma de apoproteína, por lo que no fue necesaria la introducción de nuevos tratamientos para extraer el Cu, que de no haber sido así, hubieran sido necesarios para llevar a cabo los estudios de la interacción metal-proteína.

2.2. ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN DE *GmCCS* CON COBRE POR CALORIMETRÍA ISOTÉRMICA DE TITULACIÓN (ITC)

La ITC es una técnica muy adecuada para determinar los parámetros termodinámicos de la interacción ligando-proteína. La determinación de dos sitios de unión a metal en la proteína *GmCCS* concuerda con la presencia de dos sitios de unión a metal en la secuencia primaria de la proteína, los sitios MXCXXC y CXC, en los dominios I y III, respectivamente. De acuerdo con la estructura tridimensional simulada de la proteína *GmCCS* (Sagasti y col., 2011) y los parámetros termodinámicos presentados en este trabajo, el sitio de unión a metal MXCXXC podría corresponder con el sitio 1, el que tiene mayor afinidad y menor capacidad calorífica, debido a que el dominio I es una región muy estructurada. El sitio 2, con menor afinidad y mayor capacidad calorífica podría corresponder con CXC del dominio III, de estructura desordenada. El mayor cambio en la capacidad calorífica por la unión de Cu^{+} en el dominio III podría reflejar importantes cambios en la conformación y oligomerización derivados de la unión a metal (Schmidt y col., 1999a; Lamb y col., 2001). Utilizando los mutantes *ccs* y

formas quiméricas, se demostró que el dominio I no es absolutamente necesario para la maduración de la Cu/ZnSOD, pero podría funcionar para extraer Cu en condiciones de disponibilidad de metales restrictivas (Schmidt y col., 1999a). No obstante, todavía no se conoce si el dominio I puede transferir Cu^+ al dominio III. Esto concuerda con nuestro modelo donde el sitio MXCXXC en el dominio I corresponde con el sitio de mayor afinidad y CXC en el dominio III con el de menor afinidad.

2.3. ESTUDIO DE LA ESTABILIDAD TÉRMICA DE *GmCCS*

La desnaturalización térmica de la proteína *GmCCS* recombinante en ausencia y presencia de Cu^+ se midió mediante la técnica de DSC. Debido a la precipitación de la proteína *GmCCS* sin Cu por encima de 65 °C, y de *GmCCS* con Cu^+ por encima de 60 °C, los resultados son menos informativos. La proteína sin Cu, como se obtuvo por purificación, muestra una T_m de desnaturalización de 60,5 °C. En presencia de Cu, la proteína presenta una fase de desnaturalización a menor temperatura que podría estar relacionada con la destrucción del estado oligomérico inducido por la presencia de Cu. Esto es esperable ya que en la oligomerización intervienen interacciones más débiles que en el plegamiento de las estructuras secundaria y terciaria. La fase correspondiente a la desnaturalización de la proteína no se ha podido estudiar convenientemente por la formación de agregados al aumentar la temperatura, muy probablemente por la presencia de iones metálicos.

2.4. ESTADO OLIGOMÉRICO DE *GmCCS*

Publicaciones anteriores de otros grupos han descrito el efecto de la presencia del Cu y el Zn en el estado de agregación de CCS y la interacción con su proteína diana, Cu/ZnSOD (Schmidt y col., 1999a; Lamb y col., 2000; Banci y col., 2012b). A pesar de que en la mayoría de los casos la presencia de estos iones metálicos afecta la distribución de homo- y heterodímeros, no se ha llegado a una conclusión clara debido, probablemente, a las diferentes condiciones experimentales utilizadas en los distintos laboratorios. Nuestros datos usando cromatografía de exclusión molecular en FPLC mostraron que la proteína *GmCCS* recombinante obtenida como apoproteína puede estar en forma de monómero y dímero, siendo más abundante la forma monomérica. Sin embargo, tras la adición de Cu^+ a la suspensión de proteína, una parte muy significativa de los monómeros se convierten en dímeros. Hasta el momento no se conoce el significado fisiológico de los diferentes estados de oligomerización encontrados, debido a que el estado de oligomerización funcional en que se produce la transferencia del Cu desde CCS a Cu/ZnSOD es desconocido. Se podría asumir que ambas formas de *GmCCS*, dímeros y monómeros, podrían estar presentes en

condiciones fisiológicas, debido a que la proteína diana de esta chaperona es preferencialmente dimérica, a pesar de que un cierto equilibrio entre monómeros y dímeros de Cu/ZnSOD es la situación más probable en la célula. Los resultados de la cromatografía de exclusión molecular sugieren la presencia de cierto equilibrio entre monómeros y dímeros de *GmCCS*, y parece que la presencia de Cu favorecería el desplazamiento de ese equilibrio hacia las formas diméricas.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. La duplicación génica y los eventos de procesamiento alternativo pueden constituir un escenario favorable para la especiación, adaptación y evolución de las especies. En la especie *G. max* se han encontrado dos genes *PAA2*, con procesamiento alternativo en al menos uno de ellos, que podrían producir proteínas con funciones diferentes. Esto podría traducirse en una característica diferencial y, posiblemente, favorable para las plantas de esta especie.
2. Homólogos del gen *PAA2* se han encontrado en todas las especies analizadas, lo que sugiere que su función es de gran importancia para las plantas. En soja, la proteína *GmPAA2-1* parece realizar la función de transporte de Cu^+ a través del tilacoide de manera similar a la proteína *AtPAA2*. A su vez, *GmPAA2-1* tiene una función específica que no se superpone con la de *PAA1* a pesar de compartir una gran similitud estructural con ésta.
3. La función de las proteínas adicionales *GmPAA2* que podrían existir en la especie *G. max* es desconocida todavía. Es posible que realicen funciones alternativas al transporte de Cu^+ a través de la membrana tilacoidal, pudiendo representar una característica positiva para las plantas que cuentan con ellas. Sin embargo, es necesaria más investigación para determinar estas cuestiones.
4. El mecanismo de actuación de la proteína CCS, así como su función de transferencia de Cu a su diana, Cu/ZnSOD, todavía cuentan con múltiples cuestiones por resolver. La proteína *GmCCS* parece encontrarse en dos estados oligoméricos diferentes (monómero y dímero), viéndose el dímero favorecido por la presencia de su ligando, Cu^+ . Esto podría tener una implicación en la interacción con la Cu/ZnSOD, mayoritariamente dimérica, en la que la transferencia del Cu podría producirse desde el sitio de unión a metal en el dominio III de *GmCCS*, con menor afinidad y mayor capacidad calorífica que el sitio de unión a metal en el dominio I.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- Abdel-Ghany SE (2009) Contribution of plastocyanin isoforms to photosynthesis and copper homeostasis in *Arabidopsis thaliana* grown at different copper regimes. *Planta* 229 (4):767-779.
- Abdel-Ghany SE, Burkhead JL, Gogolin KA, Andrés-Colás N, Bodecker JR, Puig S, Peñarrubia L, Pilon M (2005a) *AtCCS* is a functional homolog of the yeast copper chaperone Ccs1/Lys7. *FEBS Lett* 579 (11):2307-2312.
- Abdel-Ghany SE, Muller-Moule P, Niyogi KK, Pilon M, Shikanai T (2005b) Two P-type ATPases are required for copper delivery in *Arabidopsis thaliana* chloroplasts. *Plant Cell* 17 (4):1233-1251.
- Abdel-Ghany SE, Pilon M (2008) MicroRNA-mediated systemic down-regulation of copper protein expression in response to low copper availability in *Arabidopsis*. *J Biol Chem* 283 (23):15932-15945.
- Abe H, Urao T, Ito T, Seki M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2003) *AtMYC2* (bHLH) and *AtMYB2* (MYB) function as transcriptional activators in abscisic acid signaling. *Plant Cell* 15 (1):63-78.
- Adrees M, Ali S, Rizwan M, Ibrahim M, Abbas F, Farid M, Zia-Ur-Rehman M, Irshad MK, Bharwana SA (2015) The effect of excess copper on growth and physiology of important food crops: a review. *Environ Sci Pollut Res Int* 2015 (22):8148-8162.
- Aguado-Santacruz GA, Moreno-Gómez B, Jiménez-Francisco B, García-Moya E, Preciado-Ortiz RE (2012) Impact of the microbial siderophores and phytosiderophores on the iron assimilation by plants: a synthesis. *Rev Fitotec Mex* 35:9-21.
- Aki T, Shigyo M, Nakano R, Yoneyama T, Yanagisawa S (2008) Nano scale proteomics revealed the presence of regulatory proteins including three FT-Like proteins in phloem and xylem saps from rice. *Plant Cell Physiol* 49 (5):767-790.

- Alam S, Kamei S, Kawai S (2001) Effect of iron deficiency on the chemical composition of the xylem sap of barley. *Soil Sci Plant Nutr* 47 (3):643-649.
- Alberts B, Bray D, Hopkin K, Johnson A (2014) *Essential cell biology*, pp 864. Garland Science/Taylor & Francis Group, New York.
- Alfonso M (1994) El fotosistema II de plantas superiores. Caracterización bioquímica y espectroscópica de sus componentes y de los mecanismos moleculares de la resistencia a herbicidas, pp 257. Tesis Doctoral, Estación Experimental de Aula Dei, Zaragoza.
- Álvarez-Fernández A, Díaz-Benito P, Abadía A, López-Millán AF, Abadía J (2014) Metal species involved in long distance metal transport in plants. *Front Plant Sci* 5 (105):1-20.
- Andersson M, Mattle D, Sitsel O, Klymchuk T, Nielsen AM, Moller LB, White SH, Nissen P, Gourdon P (2014) Copper-transporting P-type ATPases use a unique ion-release pathway. *Nat Struct Mol Biol* 21 (1):43-48.
- Ando Y, Nagata S, Yanagisawa S, Yoneyama T (2013) Copper in xylem and phloem saps from rice (*Oryza sativa*): the effect of moderate copper concentrations in the growth medium on the accumulation of five essential metals and a speciation analysis of copper-containing compounds. *Funct Plant Biol* 40 (1):89-100.
- Andrés-Colás N, Perea-García A, Mayo de Andrés S, García-Molina A, Dorcey E, Rodríguez-Navarro S, Pérez-Amador MA, Puig S, Peñarrubia L (2013) Comparison of global responses to mild deficiency and excess copper levels in *Arabidopsis* seedlings. *Metallomics* 5 (9):1234-1246.
- Andrés-Colás N, Perea-García A, Puig S, Peñarrubia L (2010) Deregulated copper transport affects *Arabidopsis* development especially in the absence of environmental cycles. *Plant Physiol* 153 (1):170-184.

- Andrés-Colés N, Sancenón V, Rodríguez-Navarro S, Mayo S, Thiele DJ, Ecker JR, Puig S, Peñarrubia L (2006) The *Arabidopsis* heavy metal P-type ATPase HMA5 interacts with metallochaperones and functions in copper detoxification of roots. *Plant J* 45 (2):225-236.
- Apel K, Hirt H (2004) Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu Rev Plant Biol* 55:373-399.
- Arrivault S, Senger T, Krämer U (2006) The *Arabidopsis* metal tolerance protein AtMTP3 maintains metal homeostasis by mediating Zn exclusion from the shoot under Fe deficiency and Zn oversupply. *Plant J* 46 (5):861-879.
- Asada K (2006) Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. *Plant Physiol* 141 (2):391-396.
- Askwith C, Eide D, Van Ho A, Bernard PS, Li L, Davis-Kaplan S, Sipe DM, Kaplan J (1994) The *FET3* gene of *S. cerevisiae* encodes a multicopper oxidase required for ferrous iron uptake. *Cell* 76 (2):403-410.
- Axelsen KB, Palmgren MG (2001) Inventory of the superfamily of P-type ion pumps in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 126 (2):696-706.
- Balandin T, Castresana C (2002) AtCOX17, an *Arabidopsis* homolog of the yeast copper chaperone COX17. *Plant Physiol* 129 (4):1852-1857.
- Banci L, Bertini I, Cantini F, Kozyreva T, Massagni C, Palumaa P, Rubino JT, Zovo K (2012a) Human superoxide dismutase 1 (hSOD1) maturation through interaction with human copper chaperone for SOD1 (hCCS). *Proc Natl Acad Sci USA* 109 (34):13555-13560.
- Copper(I) loaded form of the first domain of the human copper chaperone for SOD1, CCS (2012b)
<http://www.rcsb.org/pdb/explore/literature.do?structureId=2RSQ&bionumber=1>.
Acceso 25-02-2015

- Banci L, Bertini I, McGreevy KS, Rosato A (2010) Molecular recognition in copper trafficking. *Nat Prod Rep* 27 (5):695-710.
- Banci L, Cantini F, Kozyreva T, Rubino JT (2013) Mechanistic aspects of hSOD1 maturation from the solution structure of Cu(I) -loaded hCCS domain 1 and analysis of disulfide-free hSOD1 mutants. *Chembiochem* 14 (14):1839-1844.
- Barceló J, Nicolás G, Sabater B, Sánchez R (2001) *Fisiología vegetal*, pp 566. Ediciones Pirámide, Madrid.
- Beauchamp C, Fridovich I (1971) Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal Biochem* 44 (1):276-287.
- Beauclair L, Yu A, Bouche N (2010) microRNA-directed cleavage and translational repression of the copper chaperone for superoxide dismutase mRNA in *Arabidopsis*. *Plant J* 62 (3):454-462.
- Benatti MR, Yookongkaew N, Meenam M, Guo WJ, Punyasuk N, AbuQamar S, Goldsbrough P (2014) Metallothionein deficiency impacts copper accumulation and redistribution in leaves and seeds of *Arabidopsis*. *New Phytol* 202 (3):940-951.
- Berman HM, Westbrook J, Feng Z, Gilliland G, Bhat TN, Weissig H, Shindyalov IN, Bourne PE (2000) The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res* 28 (1):235-242.
- Bernal M (2006) Mecanismos de tolerancia al exceso de cobre en suspensiones celulares de soja. Caracterización del transportador de cobre HMA8, pp 229. Tesis Doctoral, Estación Experimental de Aula Dei, Zaragoza.
- Bernal M, Casero D, Singh V, Wilson GT, Grande A, Yang H, Dodani SC, Pellegrini M, Huijser P, Connolly EL, Merchant SS, Krämer U (2012) Transcriptome sequencing identifies SPL7-regulated copper acquisition genes FRO4/FRO5 and the copper dependence of iron homeostasis in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 24 (2):738-761.

- Bernal M, Testillano PS, Alfonso M, Risueño MC, Picorel R, Yruela I (2007) Identification and subcellular localization of the soybean copper P1B-ATPase GmHMA8 transporter. *J Struc Biol* 158 (1):46-58.
- Bertani G (1951) Studies on lysogeny. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 62 (3):293-300.
- Billard V, Ourry A, Maillard A, Garnica M, Coquet L, Jouenne T, Cruz F, García-Mina JM, Yvin JC, Etienne P (2014) Copper-deficiency in *Brassica napus* induces copper remobilization, molybdenum accumulation and modification of the expression of chloroplastic proteins. *PLoS One* 9 (10):e109889.
- Binder BM, Rodríguez FI, Bleecker AB (2010) The copper transporter RAN1 is essential for biogenesis of ethylene receptors in *Arabidopsis*. *J Biol Chem* 285 (48):37263-37270.
- Blaby-Haas CE, Merchant SS (2014) Lysosome-related organelles as mediators of metal homeostasis. *J Biol Chem* 289 (41):28129-28136.
- Blaby-Haas CE, Padilla-Benavides T, Stube R, Argüello JM, Merchant SS (2014) Evolution of a plant-specific copper chaperone family for chloroplast copper homeostasis. *Proc Natl Acad Sci USA* 111 (50):5480-5487.
- Bonnet E, Wuyts J, Rouze P, Van de Peer Y (2004) Detection of 91 potential conserved plant microRNAs in *Arabidopsis thaliana* and *Oryza sativa* identifies important target genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 101 (31):11511-11516.
- Bouazizi H, Jouili H, Geitmann A, El Ferjani E (2010) Copper toxicity in expanding leaves of *Phaseolus vulgaris* L.: antioxidant enzyme response and nutrient element uptake. *Ecotoxicol Environ Saf* 73 (6):1304-1308.
- Boutigny S, Sautron E, Finazzi G, Rivasseau C, Frelet-Barrand A, Pilon M, Rolland N, Seigneurin-Berny D (2014) HMA1 and PAA1, two chloroplast-envelope PIB-ATPases, play distinct roles in chloroplast copper homeostasis. *J Exp Bot* 65 (6):1529-1540.

- Bowler C, Alliotte T, De Loose M, Van Montagu M, Inze D (1989) The induction of manganese superoxide dismutase in response to stress in *Nicotiana plumbaginifolia*. EMBO J 8 (1):31-38.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 72:248-254.
- Bradl HB (2004) Adsorption of heavy metal ions on soils and soils constituents. J Colloid Interface Sci 277 (1):1-18.
- Braun S, Matuschewski K, Rape M, Thoms S, Jentsch S (2002) Role of the ubiquitin-selective CDC48(UFD1/NPL4) chaperone (segregase) in ERAD of OLE1 and other substrates. EMBO J 21 (4):615-621.
- Brenner AJ, Harris ED (1995) A quantitative test for copper using bicinchoninic acid. Anal Biochem 226 (1):80-84.
- Burkhead JL, Abdel-Ghany SE, Morrill JM, Pilon-Smits EA, Pilon M (2003) The *Arabidopsis thaliana* CUTA gene encodes an evolutionarily conserved copper binding chloroplast protein. Plant J 34 (6):856-867.
- Burkhead JL, Gogolin Reynolds KA, Abdel-Ghany SE, Cohu CM, Pilon M (2009) Copper homeostasis. New Phytol 182 (4):799-816.
- Cailliatte R, Schikora A, Briat JF, Mari S, Curie C (2010) High-affinity manganese uptake by the metal transporter NRAMP1 is essential for *Arabidopsis* growth in low manganese conditions. Plant Cell 22 (3):904-917.
- Carrió-Seguí Á, García-Molina A, Sanz A, Peñarrubia L (2014) Defective copper transport in the *copt5* mutant affects cadmium tolerance. Plant Cell Physiol 56 (3):442-454.
- Carroll MC, Girouard JB, Ulloa JL, Subramaniam JR, Wong PC, Valentine JS, Culotta VC (2004) Mechanisms for activating Cu- and Zn-containing superoxide dismutase in the absence of the CCS Cu chaperone. Proc Natl Acad Sci USA 101 (16):5964-5969.

- Catty P, Boutigny S, Miras R, Joyard J, Rolland N, Seigneurin-Berny D (2011) Biochemical characterization of *AthHMA6/PAA1*, a chloroplast envelope Cu(I)-ATPase. *J Biol Chem* 286 (42):36188-36197.
- Cereghino GPL, Cregg JM (1999) Applications of yeast in biotechnology: protein production and genetic analysis. *Curr Opin Biotech* 10 (5):422-427.
- Chaffai R, Koyama H (2011) Heavy metal tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Adv Bot Res* 60:1-49.
- Chan CS, Guo L, Shih MC (2001) Promoter analysis of the nuclear gene encoding the chloroplast glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase B subunit of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol* 46 (2):131-141.
- Chandrasekharan MB, Bishop KJ, Hall TC (2003) Module-specific regulation of the beta-phaseolin promoter during embryogenesis. *Plant J* 33 (5):853-866.
- Chang C, Shockey JA (1999) The ethylene-response pathway: signal perception to gene regulation. *Curr Opin Plant Biol* 2 (5):352-358.
- Chang WC, Lee TY, Huang HD, Huang HY, Pan RL (2008) PlantPAN: Plant promoter analysis navigator, for identifying combinatorial cis-regulatory elements with distance constraint in plant gene groups. *BMC Genomics* 9 (561):1-9.
- Chao DY, Silva A, Baxter I, Huang YS, Nordborg M, Danku J, Lahner B, Yakubova E, Salt DE (2012) Genome-wide association studies identify heavy metal ATPase3 as the primary determinant of natural variation in leaf cadmium in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Genet* 8 (9):e1002923.
- Chapman EJ, Estelle M (2009) Mechanism of auxin-regulated gene expression in plants. *Annu Rev Genet* 43:265-285.

- Chen X, Zhang Z, Liu D, Zhang K, Li A, Mao L (2010) SQUAMOSA promoter-binding protein-like transcription factors: star players for plant growth and development. *J Integr Plant Biol* 52 (11):946-951.
- Chen YF, Randlett MD, Findell JL, Schaller GE (2002) Localization of the ethylene receptor ETR1 to the endoplasmic reticulum of *Arabidopsis*. *J Biol Chem* 277 (22):19861-19866.
- Choi H, Hong J, Ha J, Kang J, Kim SY (2000) ABFs, a family of ABA-responsive element binding factors. *J Biol Chem* 275 (3):1723-1730.
- Chu CC, Lee WC, Guo WY, Pan SM, Chen LJ, Li HM, Jinn TL (2005) A copper chaperone for superoxide dismutase that confers three types of copper/zinc superoxide dismutase activity in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 139 (1):425-436.
- Clemens S (2001) Molecular mechanisms of plant metal tolerance and homeostasis. *Planta* 212 (4):475-486.
- Clough SJ, Bent AF (1998) Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 16 (6):735-743.
- Cohu CM, Abdel-Ghany SE, Gogolin Reynolds KA, Onofrio AM, Bodecker JR, Kimbrel JA, Niyogi KK, Pilon M (2009) Copper delivery by the copper chaperone for chloroplast and cytosolic copper/zinc-superoxide dismutases: regulation and unexpected phenotypes in an *Arabidopsis* mutant. *Mol Plant* 2 (6):1336-1350.
- Cohu CM, Pilon M (2007) Regulation of superoxide dismutase expression by copper availability. *Physiol Plantarum* 129 (4):747-755.
- Colangelo EP, Guerinot ML (2006) Put the metal to the petal: metal uptake and transport throughout plants. *Curr Opin Plant Biol* 9 (3):322-330.
- Cona A, Rea G, Angelini R, Federico R, Tavladoraki P (2006) Functions of amine oxidases in plant development and defence. *Trends Plant Sci* 11 (2):80-88.

- Culotta VC, Klomp LWJ, Strain J, Casareno RLB, Krems B, Gitlin JD (1997) The copper chaperone for superoxide dismutase. *J Biol Chem* 272 (38):23469-23472.
- Curie C, Cassin G, Couch D, Divol F, Higuchi K, Le Jean M, Misson J, Schikora A, Czernic P, Mari S (2009) Metal movement within the plant: contribution of nicotianamine and yellow stripe 1-like transporters. *Ann Bot* 103 (1):1-11.
- Curtis MD, Grossniklaus U (2003) A gateway cloning vector set for high-throughput functional analysis of genes in planta. *Plant Physiol* 133 (2):462-469.
- Daras G, Rigas S, Tsitsekian D, Zur H, Tuller T, Hatzopoulos P (2014) Alternative transcription initiation and the AUG context configuration control dual-organellar targeting and functional competence of Arabidopsis Lon1 protease. *Mol Plant* 7 (6):989-1005.
- del Pozo T, Cambiazo V, González M (2010) Gene expression profiling analysis of copper homeostasis in *Arabidopsis thaliana*. *Biochem Bioph Res Co* 393 (2):248-252.
- Delis C, Dimou M, Fliemetakis E, Aivalakis G, Katinakis P (2006) A root- and hypocotyl-specific gene coding for copper-containing amine oxidase is related to cell expansion in soybean seedlings. *J Exp Bot* 57 (1):101-111.
- Dell B (1981) Male sterility and anther wall structure in copper-deficient plants. *Ann Bot* 48 (5):599-608.
- Deng F, Yamaji N, Xia J, Ma JF (2013) A member of the heavy metal P-type ATPase OsHMA5 is involved in xylem loading of copper in rice. *Plant Physiol* 163 (3):1353-1362.
- Diaz-Quintana A, Navarro JA, Hervas M, Molina-Heredia FP, De la Cerda B, De la Rosa MA (2003) A comparative structural and functional analysis of cyanobacterial plastocyanin and cytochrome c (6) as alternative electron donors to Photosystem I. *Photosynth Res* 75 (2):97-110.

- DiDonato RJ, Jr., Roberts LA, Sanderson T, Easley RB, Walker EL (2004) *Arabidopsis* Yellow Stripe-Like2 (YSL2): a metal-regulated gene encoding a plasma membrane transporter of nicotianamine-metal complexes. *Plant J* 39 (3):403-414.
- Ding YF, Zhu C (2009) The role of microRNAs in copper and cadmium homeostasis. *Biochem Bioph Res Co* 386 (1):6-10.
- Dong J, Kim ST, Lord EM (2005) Plantacyanin plays a role in reproduction in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 138 (2):778-789.
- Drazkiewicz M, Skorzynska-Polit E, Krupa Z (2004) Copper-induced oxidative stress and antioxidant defence in *Arabidopsis thaliana*. *Biometals* 17 (4):379-387.
- Earley KW, Haag JR, Pontes O, Opper K, Juehne T, Song K, Pikaard CS (2006) Gateway-compatible vectors for plant functional genomics and proteomics. *Plant J* 45 (4):616-629.
- Edwards K, Johnstone C, Thompson C (1991) A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucleic Acids Res* 19 (6):1349.
- Eisses JF, Kaplan JH (2002) Molecular characterization of hCTR1, the human copper uptake protein. *J Biol Chem* 277 (32):29162-29171.
- Ellingsen DG, Horn N, Aaseth J (2007) Copper, pp 529-546. *Handbook on the Toxicology of Metals* Academic Press, Burlington.
- Eren E, Argüello JM (2004) *Arabidopsis* HMA2, a divalent heavy metal-transporting P(1B)-type ATPase, is involved in cytoplasmic Zn²⁺ homeostasis. *Plant Physiol* 136 (3):3712-3723.
- Fernandes JC, Henriques FS (1991) Biochemical, physiological, and structural effects of excess copper in plants. *Bot Rev* 57 (3):246-273.
- Festa RA, Thiele DJ (2011) Copper: an essential metal in biology. *Curr Biol* 21 (21):877-883.

- Finazzi G, Petroutsos D, Tomizioli M, Flori S, Sautron E, Villanova V, Rolland N, Seigneurin-Berny D (2015) Ions channels/transporters and chloroplast regulation. *Cell Calcium* 58 (1):86-97.
- Freire E, Schon A, Velázquez-Campoy A (2009) Isothermal titration calorimetry: general formalism using binding polynomials. *Methods Enzymol* 455:127-155.
- Fu D, Beeler TJ, Dunn TM (1995) Sequence, mapping and disruption of CCC2, a gene that cross-complements the Ca²⁺-sensitive phenotype of *csg1* mutants and encodes a P-type ATPase belonging to the Cu²⁺-ATPase subfamily. *Yeast* 11 (3):283-292.
- Furukawa Y, Torres AS, O'Halloran TV (2004) Oxygen-induced maturation of SOD1: a key role for disulfide formation by the copper chaperone CCS. *EMBO J* 23 (14):2872-2881.
- Gantait S, Sinniah UR, Ali MN, Sahu NC (2015) Gibberellins - a multifaceted hormone in plant growth regulatory network. *Curr Protein Pept Sci* 16 (5):406-412.
- García-Molina A, Andrés-Colás N, Perea-García A, Del Valle-Tascon S, Peñarrubia L, Puig S (2011) The intracellular *Arabidopsis* COPT5 transport protein is required for photosynthetic electron transport under severe copper deficiency. *Plant J* 65 (6):848-860.
- García-Molina A, Andrés-Colés N, Perea-García A, Neumann U, Dodani SC, Huijser P, Peñarrubia L, Puig S (2013) The *Arabidopsis* COPT6 transport protein functions in copper distribution under copper-deficient conditions. *Plant Cell Physiol* 54 (8):1378-1390.
- García-Molina A, Xing S, Huijser P (2014) A conserved KIN17 curved DNA-binding domain protein assembles with SQUAMOSA PROMOTER-BINDING PROTEIN-LIKE7 to adapt *Arabidopsis* growth and development to limiting copper availability. *Plant Physiol* 164 (2):828-840.
- García L, Welchen E, González DH (2014) Mitochondria and copper homeostasis in plants. *Mitochondrion* 19 (2014):269-274.

- Gavnholt B, Larsen K (2002) Molecular biology of plant laccases in relation to lignin formation. *Physiol Plantarum* 116 (3):273-280.
- Gaxiola RA, Yuan DS, Klausner RD, Fink GR (1998) The yeast CLC chloride channel functions in cation homeostasis. *Proc Natl Acad Sci USA* 95 (7):4046-4050.
- Gayomba SR, Jung HI, Yan J, Danku J, Rutzke MA, Bernal M, Krämer U, Kochian LV, Salt DE, Vatamaniuk OK (2013) The CTR/COPT-dependent copper uptake and SPL7-dependent copper deficiency responses are required for basal cadmium tolerance in *A. thaliana*. *Metallomics* 5 (9):1262-1275.
- Genty B, Briantais J-M, Baker NR (1989) The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochim Biophys Acta* 990 (1):87-92.
- Giuliano G, Pichersky E, Malik VS, Timko MP, Scolnik PA, Cashmore AR (1988) An evolutionarily conserved protein binding sequence upstream of a plant light-regulated gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 85 (19):7089-7093.
- González-Guerrero M, Matthiadis A, Saez AN, Long TA (2014) Fixating on metals: new insights into the role of metals in nodulation and symbiotic nitrogen fixation. *Front Plant Sci* 5 (45):1-6.
- Gorman DS, Levine RP (1965) Cytochrome f and plastocyanin: their sequence in the photosynthetic electron transport chain of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc Natl Acad Sci USA* 54 (6):1665-1669.
- Gourdon P, Liu XY, Skjorringe T, Morth JP, Moller LB, Pedersen BP, Nissen P (2011) Crystal structure of a copper-transporting PIB-type ATPase. *Nature* 475 (7354):59-64.
- Gravot A, Lieutaud A, Verret F, Auroy P, Vavasseur A, Richaud P (2004) AtHMA3, a plant P1B-ATPase, functions as a Cd/Pb transporter in yeast. *FEBS Lett* 561 (1-3):22-28.

- Grotz N, Guerinot ML (2006) Molecular aspects of Cu, Fe and Zn homeostasis in plants. *Biochim Biophys Acta* 1763 (7):595-608.
- Gultinan MJ, Marcotte WR, Jr., Quatrano RS (1990) A plant leucine zipper protein that recognizes an abscisic acid response element. *Science* 250 (4978):267-271.
- Guo W-J, Bundithya W, Goldsbrough PB (2003) Characterization of the *Arabidopsis* metallothionein gene family: tissue-specific expression and induction during senescence and in response to copper. *New Phytol* 159 (2):369-381.
- Gupta R, He Z, Luan S (2002) Functional relationship of cytochrome c_6 and plastocyanin in *Arabidopsis*. *Nature* 417 (6888):567-571.
- Hanikenne M, Bernal M, Urzica E-I (2014) Ion homeostasis in the chloroplast, pp 17. *Plastid Biology*, Springer New York.
- Hänsch R, Mendel RR (2009) Physiological functions of mineral micronutrients (Cu, Zn, Mn, Fe, Ni, Mo, B, Cl). *Curr Opin Plant Biol* 12 (3):259-266.
- Hardtke CS (2007) Transcriptional auxin-brassinosteroid crosstalk: who's talking? *Bioessays* 29 (11):1115-1123.
- Harrison MD, Jones CE, Solioz M, Dameron CT (2000) Intracellular copper routing: the role of copper chaperones. *Trends Biochem Sci* 25 (1):29-32.
- Hartley JL, Temple GF, Brasch MA (2000) DNA cloning using in vitro site-specific recombination. *Genome Res* 10 (11):1788-1795.
- Hartman G, West E, Herman T (2011) Crops that feed the World 2. Soybean worldwide production, use, and constraints caused by pathogens and pests. *Food Security* 3 (1):5-17.

- Hattori T, Totsuka M, Hobo T, Kagaya Y, Yamamoto-Toyoda A (2002) Experimentally determined sequence requirement of ACGT-containing abscisic acid response element. *Plant Cell Physiol* 43 (1):136-140.
- Haydon MJ, Cobbett CS (2007) Transporters of ligands for essential metal ions in plants. *New Phytol* 174 (3):499-506.
- Heijerick DG, Van Sprang PA, Van Hyfte AD (2006) Ambient copper concentrations in agricultural and natural European soils: An overview. *Environ Toxicol Chem* 25 (3):858-864.
- Henriques FS (1989) Effects of copper deficiency on the photosynthetic apparatus of sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *J Plant Physiol* 135 (4):453-458.
- Herbik A, Giritch A, Horstmann C, Becker R, Balzer HJ, Baumlein H, Stephan UW (1996) Iron and copper nutrition-dependent changes in protein expression in a tomato wild type and the nicotianamine-free mutant *chloronerva*. *Plant Physiol* 111 (2):533-540.
- Himmelblau E, Mira H, Lin SJ, Culotta VC, Peñarrubia L, Amasino RM (1998) Identification of a functional homolog of the yeast copper homeostasis gene ATX1 from *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 117 (4):1227-1234.
- Hirayama T, Kieber JJ, Hirayama N, Kogan M, Guzman P, Nourizadeh S, Alonso JM, Dailey WP, Dancis A, Ecker JR (1999) RESPONSIVE-TO-ANTAGONIST1, a Menkes/Wilson disease-related copper transporter, is required for ethylene signaling in *Arabidopsis*. *Cell* 97 (3):383-393.
- Hirayama T, Shinozaki K (1996) A cdc5+ homolog of a higher plant, *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA* 93 (23):13371-13376.
- Hirumura M, Chino H, Sonoda T, Sakurai H (2000) Molecular cloning and characterization of a copper chaperone for copper/zinc superoxide dismutase from the rat. *Biochem Biophys Res Commun* 275 (2):394-400.

- Ho KK, Krogmann DW (1984) Electron donors to P700 in cyanobacteria and algae. *Biochim Biophys Acta* 766 (2):310-316.
- Hoagland DR, Arnon DI (1950) The water-culture method for growing plants without soil. *Circular California Agricultural Experiment Station* 347:1-32.
- Hocking PJ (1980) The composition of phloem exudate and xylem sap from tree tobacco (*Nicotiana glauca* Grah.). *Ann Bot* 45 (6):633-643.
- Hocking PJ (1983) The dynamics of growth and nutrient accumulation by fruits of *Grevillea leucopteris* Meissn., a proteaceous shrub, with special reference to the composition of xylem and phloem sap. *New Phytol* 93 (4):511-529.
- Holl C, Heynhold G (1842) *Flora von Sachsen*. Vol. 1. Verlag von Justus Naumann, Dresden.
- Holmes DS, Quigley M (1981) A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal Biochem* 114 (1):193-197.
- Hong-Hermesdorf A, Miethke M, Gallaher SD, Kropat J, Dodani SC, Chan J, Barupala D, Domaille DW, Shirasaki DI, Loo JA, Weber PK, Pett-Ridge J, Stemmler TL, Chang CJ, Merchant SS (2014) Subcellular metal imaging identifies dynamic sites of Cu accumulation in *Chlamydomonas*. *Nat Chem Biol* 10 (12):1034-1042.
- Hu R, Fan C, Li H, Zhang Q, Fu YF (2009) Evaluation of putative reference genes for gene expression normalization in soybean by quantitative real-time RT-PCR. *BMC Mol Biol* 10 (93):1-12.
- Huang CH, Kuo WY, Jinn TL (2012a) Models for the mechanism for activating copper-zinc superoxide dismutase in the absence of the CCS Cu chaperone in *Arabidopsis*. *Plant Signal Behav* 7 (3):428-430.
- Huang CH, Kuo WY, Weiss C, Jinn TL (2012b) Copper chaperone-dependent and -independent activation of three copper-zinc superoxide dismutase homologs localized in different cellular compartments in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 158 (2):737-746.

- Huang H, Mizukami Y, Hu Y, Ma H (1993) Isolation and characterization of the binding sequences for the product of the *Arabidopsis* floral homeotic gene AGAMOUS. *Nucleic Acids Res* 21 (20):4769-4776.
- Huang H, Tudor M, Weiss CA, Hu Y, Ma H (1995) The *Arabidopsis* MADS-box gene AGL3 is widely expressed and encodes a sequence-specific DNA-binding protein. *Plant Mol Biol* 28 (3):549-567.
- Hudson ME, Quail PH (2003) Identification of promoter motifs involved in the network of phytochrome A-regulated gene expression by combined analysis of genomic sequence and microarray data. *Plant Physiol* 133 (4):1605-1616.
- Hussain D, Haydon MJ, Wang Y, Wong E, Sherson SM, Young J, Camakaris J, Harper JF, Cobbett CS (2004) P-type ATPase heavy metal transporters with roles in essential zinc homeostasis in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 16 (5):1327-1339.
- Inoue K, Keegstra K (2003) A polyglycine stretch is necessary for proper targeting of the protein translocation channel precursor to the outer envelope membrane of chloroplasts. *Plant J* 34 (5):661-669.
- Irtelli B, Petrucci WA, Navari-Izzo F (2009) Nicotianamine and histidine/proline are, respectively, the most important copper chelators in xylem sap of *Brassica carinata* under conditions of copper deficiency and excess. *J Exp Bot* 60 (1):269-277.
- Iwasaki T, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (1995) Identification of a cis-regulatory region of a gene in *Arabidopsis thaliana* whose induction by dehydration is mediated by abscisic acid and requires protein synthesis. *Mol Gen Genet* 247 (4):391-398.
- Jain A, Wilson GT, Connolly EL (2014) The diverse roles of FRO family metalloreductases in iron and copper homeostasis. *Front Plant Sci* 5 (100):1-5.
- Jelesarov I, Bosshard HR (1999) Isothermal titration calorimetry and differential scanning calorimetry as complementary tools to investigate the energetics of biomolecular recognition. *J Mol Recognit* 12 (1):3-18.

- Jiao Y, Lau OS, Deng XW (2007) Light-regulated transcriptional networks in higher plants. *Nat Rev Genet* 8 (3):217-230.
- Jones-Rhoades MW, Bartel DP (2004) Computational identification of plant microRNAs and their targets, including a stress-induced miRNA. *Mol Cell* 14 (6):787-799.
- Jouvin D, Weiss DJ, Mason TF, Bravin MN, Louvat P, Zhao F, Ferec F, Hinsinger P, Benedetti MF (2012) Stable isotopes of Cu and Zn in higher plants: evidence for Cu reduction at the root surface and two conceptual models for isotopic fractionation processes. *Environ Sci Technol* 46 (5):2652-2660.
- Jung HI, Gayomba SR, Rutzke MA, Craft E, Kochian LV, Vatamaniuk OK (2012) COPT6 is a plasma membrane transporter that functions in copper homeostasis in *Arabidopsis* and is a novel target of SQUAMOSA promoter-binding protein-like 7. *J Biol Chem* 287 (40):33252-33267.
- Kagaya Y, Ohmiya K, Hattori T (1999) RAV1, a novel DNA-binding protein, binds to bipartite recognition sequence through two distinct DNA-binding domains uniquely found in higher plants. *Nucleic Acids Res* 27 (2):470-478.
- Kaplan B, Davydov O, Knight H, Galon Y, Knight MR, Fluhr R, Fromm H (2006) Rapid transcriptome changes induced by cytosolic Ca²⁺ transients reveal ABRE-related sequences as Ca²⁺-responsive cis elements in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 18 (10):2733-2748.
- Kato S (1960) A new copper protein from *Chlorella ellipsoidea*. *Nature* 186 (4724):533-534.
- Kehr J (2013) Systemic regulation of mineral homeostasis by micro RNAs. *Front Plant Sci* 4 (145):1-6.
- Kieber JJ, Schaller GE (2014) Cytokinins. *Arabidopsis Book* 12:1-35.

- Kim SY, Chung HJ, Thomas TL (1997) Isolation of a novel class of bZIP transcription factors that interact with ABA-responsive and embryo-specification elements in the Dc3 promoter using a modified yeast one-hybrid system. *Plant J* 11 (6):1237-1251.
- Kim YY, Choi H, Segami S, Cho HT, Martinoia E, Maeshima M, Lee Y (2009) AtHMA1 contributes to the detoxification of excess Zn(II) in *Arabidopsis*. *Plant J* 58 (5):737-753.
- Klaumann S, Nickolaus SD, Furst SH, Starck S, Schneider S, Ekkehard Neuhaus H, Trentmann O (2011) The tonoplast copper transporter COPT5 acts as an exporter and is required for interorgan allocation of copper in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytol* 192 (2):393-404.
- Kliebenstein DJ, Monde R-A, Last RL (1998) Superoxide dismutase in *Arabidopsis*: an eclectic enzyme family with disparate regulation and protein localization. *Plant Physiol* 118 (2):637-650.
- Klomp AE, Juijn JA, van der Gun LT, van den Berg IE, Berger R, Klomp LW (2003) The N-terminus of the human copper transporter 1 (hCTR1) is localized extracellularly, and interacts with itself. *Biochem J* 370 (3):881-889.
- Kobayashi Y, Kuroda K, Kimura K, Southron-Francis JL, Furuzawa A, Kimura K, Iuchi S, Kobayashi M, Taylor GJ, Koyama H (2008) Amino acid polymorphisms in strictly conserved domains of a P-type ATPase HMA5 are involved in the mechanism of copper tolerance variation in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 148 (2):969-980.
- Koster J, Shi R, von Wiren N, Weber G (2011) Evaluation of different column types for the hydrophilic interaction chromatographic separation of iron-citrate and copper-histidine species from plants. *J Chromatogr A* 1218 (30):4934-4943.
- Kropat J, Gallaher SD, Urzica EI, Nakamoto SS, Strenkert D, Tottey S, Mason AZ, Merchant SS (2015) Copper economy in *Chlamydomonas*: prioritized allocation and reallocation of copper to respiration vs. photosynthesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 112 (9):2644-2651.

- Kropat J, Tottey S, Birkenbihl RP, Depège N, Huijser P, 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. *Proc Natl Acad Sci USA* 102 (51):18730-18735.
- Kuhlbrandt W (2004) Biology, structure and mechanism of P-type ATPases. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5 (4):282-295.
- Kurepa J, Li Y, Smalle JA (2014) Cytokinin signaling stabilizes the response activator ARR1. *Plant J* 78 (1):157-168.
- Ladomersky E, Petris MJ (2015) Copper tolerance and virulence in bacteria. *Metallomics* 7 (6):957-964.
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227 (5259):680-685.
- Lam E, Chua NH (1989) ASF-2: a factor that binds to the cauliflower mosaic virus 35S promoter and a conserved GATA motif in Cab promoters. *Plant Cell* 1 (12):1147-1156.
- Lamb AL, Torres AS, O'Halloran TV, Rosenzweig AC (2000) Heterodimer formation between superoxide dismutase and its copper chaperone. *Biochemistry* 39 (48):14720-14727.
- Lamb AL, Torres AS, O'Halloran TV, Rosenzweig AC (2001) Heterodimeric structure of superoxide dismutase in complex with its metallochaperone. *Nat Struct Biol* 8 (9):751-755.
- Lamb AL, Wernimont AK, Pufahl RA, Culotta VC, O'Halloran TV, Rosenzweig AC (1999) Crystal structure of the copper chaperone for superoxide dismutase. *Nat Struct Biol* 6 (8):724-729.
- Landy A (1989) Dynamic, structural, and regulatory aspects of lambda site-specific recombination. *Annu Rev Biochem* 58:913-949.

- Lattanzio G, Andaluz S, Matros A, Calvete JJ, Kehr J, Abadía A, Abadía J, López-Millán AF (2013) Protein profile of *Lupinus texensis* phloem sap exudates: searching for Fe- and Zn-containing proteins. *Proteomics* 13 (15):2283-2296.
- Lee N, Francklyn C, Hamilton EP (1987) Arabinose-induced binding of AraC protein to *araI2* activates the *araBAD* operon promoter. *Proc Natl Acad Sci USA* 84 (24):8814-8818.
- Lee SA, Yoon EK, Heo JO, Lee MH, Hwang I, Cheong H, Lee WS, Hwang YS, Lim J (2012) Analysis of *Arabidopsis* glucose insensitive growth mutants reveals the involvement of the plastidial copper transporter PAA1 in glucose-induced intracellular signaling. *Plant Physiol* 159 (3):1001-1012.
- Leitch JM, Jensen LT, Bouldin SD, Outten CE, Hart PJ, Culotta VC (2009a) Activation of Cu,Zn-superoxide dismutase in the absence of oxygen and the copper chaperone CCS. *J Biol Chem* 284 (33):21863-21871.
- Leitch JM, Yick PJ, Culotta VC (2009b) The right to choose: multiple pathways for activating copper,zinc superoxide dismutase. *J Biol Chem* 284 (37):24679-24683.
- Leng X, Mu Q, Wang X, Li X, Zhu X, Shanguan L, Fang J (2015) Transporters, chaperones, and P-type ATPases controlling grapevine copper homeostasis. *Funct Integr Genomics* 15 (6):673-684.
- Lequeux H, Hermans C, Lutts S, Verbruggen N (2010) Response to copper excess in *Arabidopsis thaliana*: Impact on the root system architecture, hormone distribution, lignin accumulation and mineral profile. *Plant Physiol Biochem* 48 (8):673-682.
- Leszczyszyn OI, Imam HT, Blindauer CA (2013) Diversity and distribution of plant metallothioneins: a review of structure, properties and functions. *Metallomics* 5 (9):1146-1169.
- Leung J, Giraudat J (1998) Abscisic acid signal transduction. *Annu Rev Plant Phys* 49:199-222.

- Li H, Fan R, Li L, Wei B, Li G, Gu L, Wang X, Zhang X (2014) Identification and characterization of a novel copper transporter gene family *TaCT1* in common wheat. *Plant Cell Environ* 37 (7):1561-1573.
- Li HH, Merchant S (1995) Degradation of plastocyanin in copper-deficient *Chlamydomonas reinhardtii*. Evidence for a protease-susceptible conformation of the apoprotein and regulated proteolysis. *J Biol Chem* 270 (40):23504-23510.
- Liao MT, Hedley MJ, Woolley DJ, Brooks RR, Nichols MA (2000) Copper uptake and translocation in chicory (*Cichorium intybus* L. cv Grasslands Puna) and tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill. cv Rony) plants grown in NFT system. II. The role of nicotianamine and histidine in xylem sap copper transport. *Plant Soil* 223 (1-2):245-254.
- Lin C-C, Chen L-M, Liu Z-H (2005) Rapid effect of copper on lignin biosynthesis in soybean roots. *Plant Sci* 168 (3):855-861.
- Liu J, Shi X, Qian M, Zheng L, Lian C, Xia Y, Shen Z (2015a) Copper-induced hydrogen peroxide upregulation of a metallothionein gene, *OsMT2c*, from *Oryza sativa* L. confers copper tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *J Hazard Mater* 294:99-108.
- Liu Z, Yan JP, Li DK, Luo Q, Yan Q, Liu ZB, Ye LM, Wang JM, Li XF, Yang Y (2015b) UDP-glucosyltransferase71c5, a major glucosyltransferase, mediates abscisic acid homeostasis in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 167 (4):1659-1670.
- López-Maury L, Giner-Lamia J, Florencio FJ (2012) Redox control of copper homeostasis in cyanobacteria. *Plant Signal Behav* 7 (12):1712-1714.
- Lu S, Yang C, Chiang VL (2011) Conservation and diversity of microRNA-associated copper-regulatory networks in *Populus trichocarpa*. *J Integr Plant Biol* 53 (11):879-891.
- Marschner H (1995) Mineral nutrition of higher plants, pp 889. Academic Press, London.

- Martínez-García JF, Huq E, Quail PH (2000) Direct targeting of light signals to a promoter element-bound transcription factor. *Science* 288 (5467):859-863.
- Martins V, Bassil E, Hanana M, Blumwald E, Geros H (2014) Copper homeostasis in grapevine: functional characterization of the *Vitis vinifera* copper transporter 1. *Planta* 240 (1):91-101.
- Martins V, Hanana M, Blumwald E, Geros H (2012) Copper transport and compartmentation in grape cells. *Plant Cell Physiol* 53 (11):1866-1880.
- Marusek CM, Trobaugh NM, Flurkey WH, Inlow JK (2006) Comparative analysis of polyphenol oxidase from plant and fungal species. *J Inorg Biochem* 100 (1):108-123.
- Maruyama-Nakashita A, Nakamura Y, Watanabe-Takahashi A, Inoue E, Yamaya T, Takahashi H (2005) Identification of a novel cis-acting element conferring sulfur deficiency response in *Arabidopsis* roots. *Plant J* 42 (3):305-314.
- Maunoury N, Vaucheret H (2011) AGO1 and AGO2 act redundantly in miR408-mediated Plantacyanin regulation. *PLoS One* 6 (12):e28729.
- Mayer AM (2006) Polyphenol oxidases in plants and fungi: going places? A review. *Phytochemistry* 67 (21):2318-2331.
- Mendel RR (2013) The molybdenum cofactor. *J Biol Chem* 288 (19):13165-13172.
- Mendoza-Soto AB, Sánchez F, Hernández G (2012) MicroRNAs as regulators in plant metal toxicity response. *Front Plant Sci* 3 (105):1-6.
- Merchant S, Bogorad L (1986) Regulation by copper of the expression of plastocyanin and cytochrome c552 in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Mol Cell Biol* 6 (2):462-469.

- Metzner R, Schneider HU, Breuer U, Thorpe MR, Schurr U, Schroeder WH (2010) Tracing cationic nutrients from xylem into stem tissue of French bean by stable isotope tracers and cryo-secondary ion mass spectrometry. *Plant Physiol* 152 (2):1030-1043.
- Migocka M, Papierniak A, Maciaszczyk-Dziubinska E, Posyniak E, Kosieradzka A (2015a) Molecular and biochemical properties of two P1B2-ATPases, CsHMA3 and CsHMA4, from cucumber. *Plant Cell Environ* 38 (6):1127-1141.
- Migocka M, Posyniak E, Maciaszczyk-Dziubinska E, Papierniak A, Kosieradzka A (2015b) Functional and biochemical characterization of cucumber genes encoding two copper ATPases CsHMA5.1 and CsHMA5.2. *J Biol Chem* 290 (25):15717-15729.
- Mikkelsen MD, Pedas P, Schiller M, Vincze E, Mills RF, Borg S, Moller A, Schjoerring JK, Williams LE, Baekgaard L, Holm PB, Palmgren MG (2012) Barley *HvHMA1* is a heavy metal pump involved in mobilizing organellar Zn and Cu and plays a role in metal loading into grains. *PLoS One* 7 (11):e49027.
- Miller CO, Skoog F, Von Saltza MH, Strong FM (1955) Kinetin, a cell division factor from deoxyribonucleic acid1. *J Am Chem Soc* 77 (5):1392-1392.
- Mills RF, Francini A, Ferreira da Rocha PS, Baccharini PJ, Aylett M, Krijger GC, Williams LE (2005) The plant P1B-type ATPase *AtHMA4* transports Zn and Cd and plays a role in detoxification of transition metals supplied at elevated levels. *FEBS Lett* 579 (3):783-791.
- Minet M, Dufour ME, Lacroute F (1992) Complementation of *Saccharomyces cerevisiae* auxotrophic mutants by *Arabidopsis thaliana* cDNAs. *Plant J* 2 (3):417-422.
- Mira H, Martínez-García F, Peñarrubia L (2001a) Evidence for the plant-specific intercellular transport of the *Arabidopsis* copper chaperone CCH. *Plant J* 25 (5):521-528.
- Mira H, Vilar M, Pérez-Paya E, Peñarrubia L (2001b) Functional and conformational properties of the exclusive C-domain from the *Arabidopsis* copper chaperone (CCH). *Biochem J* 357 (2):545-549.

- Mittler R (2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci* 7 (9):405-410.
- Molina-Heredia FP, Wastl J, Navarro JA, Bendall DS, Hervas M, Howe CJ, De La Rosa MA (2003) Photosynthesis: a new function for an old cytochrome? *Nature* 424 (6944):33-34.
- Morel M, Cruzet J, Gravot A, Auroy P, Leonhardt N, Vavasseur A, Richaud P (2009) *AtHMA3*, a P1B-ATPase allowing Cd/Zn/Co/Pb vacuolar storage in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 149 (2):894-904.
- Moreno I, Norambuena L, Maturana D, Toro M, Vergara C, Orellana A, Zurita-Silva A, Ordenes VR (2008) *AtHMA1* is a thapsigargin-sensitive Ca^{2+} /heavy metal pump. *J Biol Chem* 283 (15):9633-9641.
- Morere-Le Paven MC, Anzala F, Rector A, Limami AM (2007) Differential transcription initiation and alternative RNA splicing of *Knox7*, a class 2 homeobox gene of maize. *Gene* 401 (1-2):71-79.
- Mu C, Zhang S, Yu G, Chen N, Li X, Liu H (2013) Overexpression of small heat shock protein *LimHSP16.45* in *Arabidopsis* enhances tolerance to abiotic stresses. *PLoS One* 8 (12):e82264.
- Mukherjee I, Campbell N, Ash J, Connolly E (2006) Expression profiling of the *Arabidopsis* ferric chelate reductase (FRO) gene family reveals differential regulation by iron and copper. *Planta* 223 (6):1178-1190.
- Murakami M, Ae N (2009) Potential for phytoextraction of copper, lead, and zinc by rice (*Oryza sativa* L.), soybean (*Glycine max* [L.] Merr.), and maize (*Zea mays* L.). *J Hazard Mater* 162 (2-3):1185-1192.
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plantarum* 15 (3):473-497.

- Nagae M, Nakata M, Takahashi Y (2008) Identification of negative cis-acting elements in response to copper in the chloroplastic iron superoxide dismutase gene of the moss *Barbula unguiculata*. *Plant Physiol* 146 (4):1687-1696.
- Nakamura S-i, Akiyama C, Sasaki T, Hattori H, Chino M (2008) Effect of cadmium on the chemical composition of xylem exudate from oilseed rape plants (*Brassica napus* L.). *Soil Sci Plant Nutr* 54 (1):118-127.
- Nambara E, Marion-Poll A (2005) Abscisic acid biosynthesis and catabolism. *Annu Rev Plant Biol* 56:165-185.
- Navarro-Avino JP, Hentzen AE, Bennett AB (1999) Alternative transcription initiation sites generate two LCA1 Ca²⁺-ATPase mRNA transcripts in tomato roots. *Plant Mol Biol* 40 (1):133-140.
- Naya L, Paul S, Valdés-López O, Mendoza-Soto AB, Nova-Franco B, Sosa-Valencia G, Reyes JL, Hernández G (2014) Regulation of copper homeostasis and biotic interactions by microRNA 398b in common bean. *PLoS One* 9 (1):e84116.
- Nouet C, Motte P, Hanikenne M (2011) Chloroplastic and mitochondrial metal homeostasis. *Trends Plant Sci* 16 (7):395-404.
- O'Quin JB, Bourassa L, Zhang D, Shockey JM, Gidda SK, Fosnot S, Chapman KD, Mullen RT, Dyer JM (2010) Temperature-sensitive post-translational regulation of plant omega-3 fatty-acid desaturases is mediated by the endoplasmic reticulum-associated degradation pathway. *J Biol Chem* 285 (28):21781-21796.
- Odell JT, Nagy F, Chua NH (1985) Identification of DNA sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter. *Nature* 313 (6005):810-812.
- Ogawa M, Hanada A, Yamauchi Y, Kuwahara A, Kamiya Y, Yamaguchi S (2003) Gibberellin biosynthesis and response during *Arabidopsis* seed germination. *Plant Cell* 15 (7):1591-1604.

- Olinares PD, Kim J, van Wijk KJ (2011) The Clp protease system; a central component of the chloroplast protease network. *Biochim Biophys Acta* 1807 (8):999-1011.
- Palmer CM, Guerinot ML (2009) Facing the challenges of Cu, Fe and Zn homeostasis in plants. *Nat Chem Biol* 5 (5):333-340.
- Peñarrubia L, Andrés-Colás N, Moreno J, Puig S (2010) Regulation of copper transport in *Arabidopsis thaliana*: a biochemical oscillator? *J Biol Inorg Chem* 15 (1):29-36.
- Peñarrubia L, Romero P, Carrió-Seguí A, Andrés-Bordería A, Moreno J, Sanz A (2015) Temporal aspects of copper homeostasis and its crosstalk with hormones. *Front Plant Sci* 6 (225):1-18.
- Perea-García A, Andrés-Colás N, Peñarrubia L (2010) Copper homeostasis influences the circadian clock in *Arabidopsis*. *Plant Signal Behav* 5 (10):1237-1240.
- Perea-García A, García-Molina A, Andrés-Colás N, Vera-Sirera F, Pérez-Amador MA, Puig S, Peñarrubia L (2013) *Arabidopsis* copper transport protein COPT2 participates in the cross talk between iron deficiency responses and low-phosphate signaling. *Plant Physiol* 162 (1):180-194.
- Pesaresi P, Scharfenberg M, Weigel M, Granlund I, Schroder WP, Finazzi G, Rappaport F, Masiero S, Furini A, Jahns P, Leister D (2009) Mutants, overexpressors, and interactors of *Arabidopsis* plastocyanin isoforms: revised roles of plastocyanin in photosynthetic electron flow and thylakoid redox state. *Mol Plant* 2 (2):236-248.
- Pich A, Scholz G (1996) Translocation of copper and other micronutrients in tomato plants (*Lycopersicon esculentum* Mill.): nicotianamine-stimulated copper transport in the xylem. *J Exp Bot* 47 (1):41-47.
- Pilon M (2011) Moving copper in plants. *New Phytol* 192 (2):305-307.

- Pilon M, (2014) Regulation of copper delivery to plastocyanin via the PAA/HMA8 transporter. En: 11th International Phytotechnologies Conference, Heraklion. Kalogeralis N, Manios T (eds). p 70.
- Pilon M, Abdel-Ghany SE, Cohu CM, Gogolin KA, Ye H (2006) Copper cofactor delivery in plant cells. *Curr Opin Plant Biol* 9 (3):256-263.
- Pilon M, Cohu CM, Ravet K, Abdel-Ghany SE, Gaymard F (2009) Essential transition metal homeostasis in plants. *Curr Opin Plant Biol* 12 (3):347-357.
- Pilon M, Ravet K, Tapken W (2011) The biogenesis and physiological function of chloroplast superoxide dismutases. *Biochim Biophys Acta* 1807 (8):989-998.
- Pope CR, Flores AG, Kaplan JH, Unger VM (2012) Structure and function of copper uptake transporters. En: *Curr Top Membr*, pp 97-112 José MA, Svetlana L (eds). Academic Press.
- Puig S, Andrés-Colés N, García-Molina A, Peñarrubia L (2007a) Copper and iron homeostasis in *Arabidopsis*: responses to metal deficiencies, interactions and biotechnological applications. *Plant Cell Environ* 30 (3):271-290.
- Puig S, Mira H, Dorcey E, Sancenón V, Andrés-Colás N, García-Molina A, Burkhead JL, Gogolin KA, Abdel-Ghany SE, Thiele DJ, Ecker JR, Pilon M, Peñarrubia L (2007b) Higher plants possess two different types of ATX1-like copper chaperones. *Biochem Biophys Res Co* 354 (2):385-390.
- Puig S, Peñarrubia L (2009) Placing metal micronutrients in context: transport and distribution in plants. *Curr Opin Plant Biol* 12 (3):299-306.
- Puig S, Thiele DJ (2002) Molecular mechanisms of copper uptake and distribution. *Curr Opin Plant Biol* 6 (2):171-180.

- Rae TD, Schmidt PJ, Pufahl RA, Culotta VC, O'Halloran TV (1999) Undetectable intracellular free copper: the requirement of a copper chaperone for superoxide dismutase. *Science* 284 (5415):805-808.
- Rae TD, Torres AS, Pufahl RA, O'Halloran TV (2001) Mechanism of Cu,Zn-superoxide dismutase activation by the human metallochaperone hCCS. *J Biol Chem* 276 (7):5166-5176.
- Ravet K, Danford FL, Dihle A, Pittarello M, Pilon M (2011) Spatiotemporal analysis of copper homeostasis in *Populus trichocarpa* reveals an integrated molecular remodeling for a preferential allocation of copper to plastocyanin in the chloroplasts of developing leaves. *Plant Physiol* 157 (3):1300-1312.
- Ravet K, Pilon M (2013) Copper and iron homeostasis in plants: the challenges of oxidative stress. *Antioxid Redox Sign* 19 (9):919-932.
- Redinbo M, Yeates T, Merchant S (1994) Plastocyanin: Structural and functional analysis. *J Bioenerg Biomem* 26 (1):49-66.
- Ren L, Tang G (2012) Identification of sucrose-responsive microRNAs reveals sucrose-regulated copper accumulations in an SPL7-dependent and independent manner in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Sci* 187:59-68.
- Reuscher S (2012) Functional characterization of the *Arabidopsis thaliana* gene Cysteine Three Histidine 2, pp 171. Tesis Doctoral, Heidelberg University, Heidelberg.
- Roberts LA, Pierson AJ, Panaviene Z, Walker EL (2004) Yellow stripe1. Expanded roles for the maize iron-phytosiderophore transporter. *Plant Physiol* 135 (1):112-120.
- Robinson N, Groom S, Groom Q (1997) The froh gene family from *Arabidopsis thaliana*: putative iron-chelate reductases. *Plant Soil* 196 (2):245-248.
- Robinson NJ, Procter CM, Connolly EL, Guerinot ML (1999) A ferric-chelate reductase for iron uptake from soils. *Nature* 397 (6721):694-697.

- Robinson NJ, Winge DR (2010) Copper metallochaperones. *Annu Rev Biochem* 79:537-562.
- Rodrigo-Moreno A, Andrés-Colés N, Poschenrieder C, Gunse B, Peñarrubia L, Shabala S (2013) Calcium- and potassium-permeable plasma membrane transporters are activated by copper in *Arabidopsis* root tips: linking copper transport with cytosolic hydroxyl radical production. *Plant Cell Environ* 36 (4):844-855.
- Rodríguez FI, Esch JJ, Hall AE, Binder BM, Schaller GE, Bleecker AB (1999) A copper cofactor for the ethylene receptor ETR1 from *Arabidopsis*. *Science* 283 (5404):996-998.
- Ruzsa SM, Scandalios JG (2003) Altered Cu metabolism and differential transcription of Cu/ZnSod genes in a Cu/ZnSOD-deficient mutant of maize: evidence for a Cu-responsive transcription factor. *Biochemistry* 42 (6):1508-1516.
- Ryan BM, Kirby JK, Degryse F, Harris H, McLaughlin MJ, Scheiderich K (2013) Copper speciation and isotopic fractionation in plants: uptake and translocation mechanisms. *New Phytol* 199 (2):367-378.
- Sagasti S (2009) Caracterización y regulación de la chaperona de cobre para la CuZn superóxido dismutasa cloroplástica de soja, pp 179. Tesis Doctoral, Estación Experimental de Aula Dei, Zaragoza.
- Sagasti S, Bernal M, Sancho D, del Castillo MB, Picorel R (2014) Regulation of the chloroplastic copper chaperone (CCS) and cuprozinc superoxide dismutase (CSD2) by alternative splicing and copper excess in *Glycine max*. *Funct Plant Biol* 41 (2):144-155.
- Sagasti S, Yruela I, Bernal M, Luján MA, Frago S, Medina M, Picorel R (2011) Characterization of the recombinant copper chaperone (CCS) from the plant *Glycine (G.) max*. *Metallomics* 3 (2):169-175.
- Sakai H, Aoyama T, Oka A (2000) *Arabidopsis* ARR1 and ARR2 response regulators operate as transcriptional activators. *Plant J* 24 (6):703-711.

- Sancenón V, Puig S, Mateu-Andrés I, Dorcey E, Thiele DJ, Peñarrubia L (2004) The *Arabidopsis* copper transporter COPT1 functions in root elongation and pollen development. *J Biol Chem* 279 (15):15348-15355.
- Sancenón V, Puig S, Mira H, Thiele DJ, Peñarrubia L (2003) Identification of a copper transporter family in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol* 51 (4):577-587.
- Sautron E, Mayerhofer H, Giustini C, Pro D, Crouzy S, Ravaud S, Pebay-Peyroula E, Rolland N, Catty P, Seigneurin-Berny D (2015) HMA6 and HMA8 are two chloroplast Cu⁺-ATPases with different enzymatic properties. *Biosci Rep* 35 (3):e00201.
- Schmidke I, Stephan UW (1995) Transport of metal micronutrients in the phloem of castor bean (*Ricinus communis*) seedlings. *Physiol Plantarum* 95 (1):147-153.
- Schmidt PJ, Rae TD, Pufahl RA, Hamma T, Strain J, O'Halloran TV, Culotta VC (1999a) Multiple protein domains contribute to the action of the copper chaperone for superoxide dismutase. *J Biol Chem* 274 (34):23719-23725.
- Schmidt PJ, Ramos-Gómez M, Culotta VC (1999b) A gain of superoxide dismutase (SOD) activity obtained with CCS, the copper metallochaperone for SOD1. *J Biol Chem* 274 (52):36952-36956.
- Schmutz J, Cannon SB, Schlueter J, Ma J, Mitros T, Nelson W, Hyten DL, Song Q, Thelen JJ, Cheng J, Xu D, Hellsten U, May GD, Yu Y, Sakurai T, Umezawa T, Bhattacharyya MK, Sandhu D, Valliyodan B, Lindquist E, Peto M, Grant D, Shu S, Goodstein D, Barry K, Futrell-Griggs M, Abernathy B, Du J, Tian Z, Zhu L, Gill N, Joshi T, Libault M, Sethuraman A, Zhang X-C, Shinozaki K, Nguyen HT, Wing RA, Cregan P, Specht J, Grimwood J, Rokhsar D, Stacey G, Shoemaker RC, Jackson SA (2010) Genome sequence of the palaeopolyploid soybean. *Nature* 463 (7278):178-183.
- Schreiber U, Schliwa U, Bilger W (1986) Continuous recording of photochemical and non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching with a new type of modulation fluorometer. *Photosynth Res* 10 (1-2):51-62.

- Seigneurin-Berny D, Gravot A, Auroy P, Mazard C, Kraut A, Finazzi G, Grunwald D, Rappaport F, Vavasseur A, Joyard J, Richaud P, Rolland N (2006) HMA1, a new Cu-ATPase of the chloroplast envelope, is essential for growth under adverse light conditions. *J Biol Chem* 281 (5):2882-2892.
- Sethy SK, Ghosh S (2013) Effect of heavy metals on germination of seeds. *J Nat Sci Biol Med* 4 (2):272-275.
- Shahbaz M, Ravet K, Peers G, Pilon M (2015) Prioritization of copper for the use in photosynthetic electron transport in developing leaves of hybrid poplar. *Front Plant Sci* 6 (407):1-12.
- Shikanai T, Muller-Moule P, Munekage Y, Niyogi KK, Pilon M (2003) PAA1, a P-type ATPase of *Arabidopsis*, functions in copper transport in chloroplasts. *Plant Cell* 15 (6):1333-1346.
- Shin LJ, Lo JC, Yeh KC (2012) Copper chaperone antioxidant protein1 is essential for copper homeostasis. *Plant Physiol* 159 (3):1099-1110.
- Shin LJ, Yeh KC (2012) Overexpression of *Arabidopsis* ATX1 retards plant growth under severe copper deficiency. *Plant Signal Behav* 7 (9):1082-1083.
- Shuman S (1991) Recombination mediated by vaccinia virus DNA topoisomerase I in *Escherichia coli* is sequence specific. *Proc Natl Acad Sci USA* 88 (22):10104-10108.
- Shuman S (1994) Novel approach to molecular cloning and polynucleotide synthesis using vaccinia DNA topoisomerase. *J Biol Chem* 269 (51):32678-32684.
- Stephan UW, Scholz G (1993) Nicotianamine: mediator of transport of iron and heavy metals in the phloem? *Physiol Plantarum* 88 (3):522-529.
- Sunkar R, Kapoor A, Zhu JK (2006) Posttranscriptional induction of two Cu/Zn superoxide dismutase genes in *Arabidopsis* is mediated by downregulation of miR398 and important for oxidative stress tolerance. *Plant Cell* 18 (8):2051-2065.

- Sunkar R, Zhu JK (2004) Novel and stress-regulated microRNAs and other small RNAs from *Arabidopsis*. *Plant Cell* 16 (8):2001-2019.
- Tabata K, Kashiwagi S, Mori H, Ueguchi C, Mizuno T (1997) Cloning of a cDNA encoding a putative metal-transporting P-type ATPase from *Arabidopsis thaliana*. *Biochim Biophys Acta* 1326 (1):1-6.
- Taiz L (2010) *Plant physiology*, pp 782. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Takahashi M, Terada Y, Nakai I, Nakanishi H, Yoshimura E, Mori S, Nishizawa NK (2003) Role of nicotianamine in the intracellular delivery of metals and plant reproductive development. *Plant Cell* 15 (6):1263-1280.
- Talke IN, Hanikenne M, Krämer U (2006) Zinc-dependent global transcriptional control, transcriptional deregulation, and higher gene copy number for genes in metal homeostasis of the hyperaccumulator *Arabidopsis halleri*. *Plant Physiol* 142 (1):148-167.
- Tanaka M, Takano J, Chiba Y, Lombardo F, Ogasawara Y, Onouchi H, Naito S, Fujiwara T (2011) Boron-dependent degradation of NIP5;1 mRNA for acclimation to excess boron conditions in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 23 (9):3547-3559.
- Tapken W (2012) Copper transport into the chloroplast and its implications for copper homeostasis in *Arabidopsis thaliana*, pp 128. Tesis Doctoral, Fort Collins.
- Tapken W, Kim J, Nishimura K, van Wijk KJ, Pilon M (2015) The Clp protease system is required for copper ion-dependent turnover of the PAA2/HMA8 copper transporter in chloroplasts. *New Phytol* 205 (2):511-517.
- Tapken W, Ravet K, Pilon M (2012) Plastocyanin controls the stabilization of the thylakoid Cu-transporting P-type ATPase PAA2/HMA8 in response to low copper in *Arabidopsis*. *J Biol Chem* 287 (22):18544-18550.

- Terzaghi WB, Cashmore AR (1995) Photomorphogenesis. Seeing the light in plant development. *Curr Biol* 5 (5):466-468.
- Thatcher LF, Carrie C, Andersson CR, Sivasithamparam K, Whelan J, Singh KB (2007) Differential gene expression and subcellular targeting of Arabidopsis glutathione S-transferase F8 is achieved through alternative transcription start sites. *J Biol Chem* 282 (39):28915-28928.
- Tomizioli M, Lazar C, Brugiére S, Burger T, Salvi D, Gatto L, Moyet L, Breckels LM, Hesse AM, Lilley KS, Seigneurin-Berny D, Finazzi G, Rolland N, Ferro M (2014) Deciphering thylakoid sub-compartments using a mass spectrometry-based approach. *Mol Cell Proteomics* 13 (8):2147-2167.
- Torres AS, Petri V, Rae TD, O'Halloran TV (2001) Copper stabilizes a heterodimer of the yCCS metallochaperone and its target superoxide dismutase. *J Biol Chem* 276 (42):38410-38416.
- Trindade LM, Horvath BM, Bergervoet MJ, Visser RG (2003) Isolation of a gene encoding a copper chaperone for the copper/zinc superoxide dismutase and characterization of its promoter in potato. *Plant Physiol* 133 (2):618-629.
- Ulmasov T, Hagen G, Guilfoyle TJ (1999) Dimerization and DNA binding of auxin response factors. *Plant J* 19 (3):309-319.
- Verret F, Gravot A, Auroy P, Leonhardt N, David P, Nussaume L, Vavasseur A, Richaud P (2004) Overexpression of *AthMA4* enhances root-to-shoot translocation of zinc and cadmium and plant metal tolerance. *FEBS Lett* 576 (3):306-312.
- Vitha S, Benes K, Phillips JP, Gartland KM (1995) Histochemical GUS analysis. *Methods Mol Biol* 44:185-193.
- von Wiren N, Klair S, Bansal S, Briat JF, Khodr H, Shioiri T, Leigh RA, Hider RC (1999) Nicotianamine chelates both FeIII and FeII. Implications for metal transport in plants. *Plant Physiol* 119 (3):1107-1114.

- Wang CY, Zhang S, Yu Y, Luo YC, Liu Q, Ju C, Zhang YC, Qu LH, Lucas WJ, Wang X, Chen YQ (2014) MiR397b regulates both lignin content and seed number in *Arabidopsis* via modulating a laccase involved in lignin biosynthesis. *Plant Biotechnol J* 12 (8):1132-1142.
- Wang J, Constabel CP (2004) Polyphenol oxidase overexpression in transgenic *Populus* enhances resistance to herbivory by forest tent caterpillar (*Malacosoma disstria*). *Planta* 220 (1):87-96.
- Ward JD, Spears JW (1997) Long-term effects of consumption of low-copper diets with or without supplemental molybdenum on copper status, performance, and carcass characteristics of cattle. *J Anim Sci* 75 (11):3057-3065.
- Waters BM, Armbrust LC (2013) Optimal copper supply is required for normal plant iron deficiency responses. *Plant Signal Behav* 8 (12):26611-26615.
- Waters BM, Blevins DG, Eide DJ (2002) Characterization of FRO1, a pea ferric-chelate reductase involved in root iron acquisition. *Plant Physiol* 129 (1):85-94.
- Waters BM, McInturf SA, Amundsen K (2014) Transcriptomic and physiological characterization of the fefe mutant of melon (*Cucumis melo*) reveals new aspects of iron-copper crosstalk. *New Phytol* 203 (4):1128-1145.
- Waters BM, McInturf SA, Stein RJ (2012) Rosette iron deficiency transcript and microRNA profiling reveals links between copper and iron homeostasis in *Arabidopsis thaliana*. *J Exp Bot* 63 (16):5903-5918.
- Weng JK, Chapple C (2010) The origin and evolution of lignin biosynthesis. *New Phytol* 187 (2):273-285.
- White MC (1981) Metal complexation in xylem fluid. *Plant Physiol* 67 (2):292-300.
- White PJ, Brown PH (2010) Plant nutrition for sustainable development and global health. *Ann Bot* 105 (7):1073-1080.

- Williams LE, Mills RF (2005) P(1B)-ATPases--an ancient family of transition metal pumps with diverse functions in plants. *Trends Plant Sci* 10 (10):491-502.
- Wintz H, Vulpe C (2002) Plant copper chaperones. *Biochem Soc T* 30 (4):732-735.
- Woeste KE, Kieber JJ (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. *Plant Cell* 12 (3):443-455.
- Wojcik M, Tukiendorf A (2003) Response of wild type of *Arabidopsis thaliana* to copper stress. *Biol Plantarum* 46 (1):76-84.
- Wong CK, Cobbett CS (2009) HMA P-type ATPases are the major mechanism for root-to-shoot Cd translocation in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytol* 181 (1):71-78.
- Wong CK, Jarvis RS, Sherson SM, Cobbett CS (2009) Functional analysis of the heavy metal binding domains of the Zn/Cd-transporting ATPase, HMA2, in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytol* 181 (1):79-88.
- Woo HR, Kim JH, Kim J, Kim J, Lee U, Song IJ, Kim JH, Lee HY, Nam HG, Lim PO (2010) The RAV1 transcription factor positively regulates leaf senescence in *Arabidopsis*. *J Exp Bot* 61 (14):3947-3957.
- Wood PM (1978) Interchangeable copper and iron proteins in algal photosynthesis. *Eur J Biochem* 87 (1):9-19.
- Wuana RA, Okieimen FE (2011) Heavy metals in contaminated soils: a review of sources, chemistry, risks and best available strategies for remediation. *ISRN Ecology* 2011:1-20.
- Xie X-Q, Ying S-H, Feng M-G (2010) Characterization of a new Cu/Zn-superoxide dismutase from *Beauveria bassiana* and two site-directed mutations crucial to its antioxidation activity without chaperon. *Enzyme Micro Tech* 46 (3-4):217-222.

- Xu R, Li QQ (2008) Protocol: streamline cloning of genes into binary vectors in *Agrobacterium* via the Gateway(R) TOPO vector system. *Plant methods* 4 (4):1-7.
- Xu W, Jiao Y, Li R, Zhang N, Xiao D, Ding X, Wang Z (2014) Chinese wild-growing *Vitis amurensis* ICE1 and ICE2 encode MYC-type bHLH transcription activators that regulate cold tolerance in *Arabidopsis*. *PLoS One* 9 (7):e102303.
- Yamasaki H, Abdel-Ghany SE, Cohu CM, Kobayashi Y, Shikanai T, Pilon M (2007) Regulation of copper homeostasis by micro-RNA in *Arabidopsis*. *J Biol Chem* 282 (22):16369-16378.
- Yamasaki H, Hayashi M, Fukazawa M, Kobayashi Y, Shikanai T (2009) SQUAMOSA Promoter Binding Protein-Like7 is a central regulator for copper homeostasis in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 21 (1):347-361.
- Yamasaki H, Pilon M, Shikanai T (2008) How do plants respond to copper deficiency? *Plant Signal Behav* 3 (4):231-232.
- Yoo SD, Cho YH, Sheen J (2007) *Arabidopsis* mesophyll protoplasts: a versatile cell system for transient gene expression analysis. *Nat Protoc* 2 (7):1565-1572.
- Yruela I (2009) Copper in plants: acquisition, transport and interactions. *Funct Plant Biol* 36 (5):409-430.
- Yruela I (2013) Transition metals in plant photosynthesis. *Metallomics* 5 (9):1090-1109.
- Yu D, Chen C, Chen Z (2001) Evidence for an important role of WRKY DNA binding proteins in the regulation of NPR1 gene expression. *Plant Cell* 13 (7):1527-1540.
- Yuan DS, Dancis A, Klausner RD (1997) Restriction of copper export in *Saccharomyces cerevisiae* to a late Golgi or post-Golgi compartment in the secretory pathway. *J Biol Chem* 272 (41):25787-25793.

- Yuan M, Li X, Xiao J, Wang S (2011) Molecular and functional analyses of COPT/Ctr-type copper transporter-like gene family in rice. *BMC Plant Biol* 11 (69):1-12.
- Yurekli F, Porgali ZB (2006) The effects of excessive exposure to copper in bean plants. *Acta Biol Cracov* 48 (2):7-13.
- Zdarska M, Dobisova T, Gelova Z, Pernisova M, Dabravolski S, Hejatko J (2015) Illuminating light, cytokinin, and ethylene signalling crosstalk in plant development. *J Exp Bot* 66 (16):4913-4931.
- Zhang H, Mao X, Wang C, Jing R (2010) Overexpression of a common wheat gene *TaSnRK2.8* enhances tolerance to drought, salt and low temperature in *Arabidopsis*. *PLoS One* 5 (12):e16041.
- Zhang H, Zhao X, Li J, Cai H, Deng XW, Li L (2014) MicroRNA408 is critical for the HY5-SPL7 gene network that mediates the coordinated response to light and copper. *Plant Cell* 26 (12):4933-4953.
- Zhang XL, Jiang L, Xin Q, Liu Y, Tan JX, Chen ZZ (2015) Structural basis and functions of abscisic acid receptors PYLs. *Front Plant Sci* 6:88.
- Zheng L, Yamaji N, Yokosho K, Ma JF (2012) YSL16 is a phloem-localized transporter of the copper-nicotianamine complex that is responsible for copper distribution in rice. *Plant Cell* 24 (9):3767-3782.
- Zhu C, Ding Y, Liu H (2011) MiR398 and plant stress responses. *Physiol Plantarum* 143 (1):1-9.
- Zhu H, Shipp E, Sánchez RJ, Liba A, Stine JE, Hart PJ, Gralla EB, Nersissian AM, Valentine JS (2000) Cobalt(2⁺) binding to human and tomato copper chaperone for superoxide dismutase: implications for the metal ion transfer mechanism. *Biochemistry* 39 (18):5413-5421.

Zimmermann M, Clarke O, Gulbis JM, Keizer DW, Jarvis RS, Cobbett CS, Hinds MG, Xiao Z, Wedd AG (2009) Metal binding affinities of *Arabidopsis* zinc and copper transporters: selectivities match the relative, but not the absolute, affinities of their amino-terminal domains. *Biochemistry* 48 (49):11640-11654.

Zlobin IE, Kholodova VP, Rakhmankulova ZF, Kuznetsov VV (2014) *Brassica napus* responses to short-term excessive copper treatment with decrease of photosynthetic pigments, differential expression of heavy metal homeostasis genes including activation of gene NRAMP4 involved in photosystem II stabilization. *Photosynth Res* 125 (1-2):141-150.

Zwack PJ, Rashotte AM (2015) Interactions between cytokinin signalling and abiotic stress responses. *J Exp Bot* 66 (16):4863-4871.

