

ÍNDICE GENERAL

| | |
|--|----|
| ÍNDICE GENERAL..... | 4 |
| ÍNDICE DE FIGURAS..... | 6 |
| ÍNDICE DE TABLAS..... | 7 |
| ABREVIACIONES..... | 8 |
| RESUMEN..... | 11 |
| ABSTRACT..... | 13 |
| I. INTRODUCCIÓN..... | 15 |
| I.1 Presencia de metales pesados en el ambiente..... | 16 |
| I.2 Fitorremediación: una tecnología verde para la recuperación de suelos contaminados..... | 17 |
| I.3 Especies metalófitas..... | 19 |
| I.4 Absorción y transporte de metales pesados en las plantas..... | 20 |
| I.5 Efecto del exceso de metales en las plantas..... | 21 |
| I.6 Mecanismos de tolerancia a Cu..... | 24 |
| I.7 Inhibidores de proteasas y su importancia para las plantas..... | 27 |
| I.8 Inhibidores de proteasas del tipo serina..... | 29 |
| I.9 Interacción de inhibidores de proteasa con metales pesados..... | 31 |
| I.10 KTI y metales pesados en álamos..... | 33 |
| HIPÓTESIS DE TRABAJO..... | 35 |
| OBJETIVOS..... | 35 |
| II. METODOLOGÍA..... | 36 |
| II.1 Clonación de <i>PdKTI3</i> | 37 |
| II.2 Generación y evaluación de plantas de <i>A. thaliana</i> | 38 |
| II.3 Modelamiento y simulación del efecto del reemplazo de aminoácidos en la estructura de <i>PdKTI3</i> | 42 |
| II.4 Mutagénesis sitio-dirigida, clonación en pYES2/CT y transformación de <i>S. cerevisiae</i> | 44 |
| II.5 Ensayo de estrés por Cu en levaduras..... | 47 |
| II.6 Cinética de crecimiento de levaduras..... | 48 |
| II.7 Localización subcelular de la proteína <i>PdKTI3</i> | 49 |
| III. RESULTADOS..... | 54 |

| | |
|--|----|
| III.1 PdKTI3 mejora la tolerancia a Cu en una cepa mutante de <i>S. cerevisiae</i> sensible a este metal. | 55 |
| III.2 PdKTI3 revierte el fenotipo sensible a Cu de una cepa mutante de <i>S. cerevisiae</i> , superando la tolerancia de la cepa <i>wild-type</i> | 57 |
| III.3 La expresión heteróloga de <i>PdKTI3</i> en <i>A. thaliana</i> confiere tolerancia a exceso de Cu..... | 59 |
| III.4 La expresión constitutiva del gen <i>PdKTI3</i> en <i>A. thaliana</i> , disminuye la generación de radicales superóxido bajo condiciones de estrés por Cu; complementando, mediante un efecto indirecto, la maquinaria antioxidante propia de ésta. | 62 |
| III.5 El modelamiento de las proteínas mutadas en el sitio 1 y sitio 2 de PdKTI3 no altera su estructura tridimensional. | 66 |
| III.6 Los aminoácidos del sitio 1 (His, Glu, His) y 2 (Ser, Met, Ser) son fundamentales en la actividad de la proteína involucrada en la tolerancia a Cu en <i>S. cerevisiae</i> | 69 |
| III.7 PdKTI3 está localizada en el retículo endoplasmático y la vacuola. | 70 |
| IV. DISCUSIÓN | 74 |
| V. CONCLUSIONES | 85 |
| VI. BIBLIOGRAFÍA | 87 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Transporte de Cu, utilización y quelación en la célula vegetal..... | 25 |
| Figura 2. Modelo tridimensional de PdKTI3. | 34 |
| Figura 3. Evaluación del crecimiento de levaduras a diferentes concentraciones de CuSO ₄ | 56 |
| Figura 4. Cinética de crecimiento de levaduras en medio líquido, a diferentes concentraciones de CuSO ₄ , durante 72 h..... | 58 |
| Figura 5. Expresión relativa del gen <i>PdKTI3</i> bajo condiciones de estrés por exceso de Cu en plántulas de <i>A. thaliana</i> | 59 |
| Figura 6. Efecto del CuSO ₄ sobre estructuras aéreas y elongación radicular en líneas transgénicas de <i>A. thaliana</i> que expresan heterológamente <i>PdKTI3</i> | 60 |
| Figura 7. Efecto de 75 µM CuSO ₄ en la formación de raíces laterales en <i>A. thaliana</i> | 61 |
| Figura 8. Evaluación cualitativa de la acumulación de radicales superóxido mediante tinción NBT bajo condiciones de estrés por exceso de cobre (75 µM CuSO ₄) en <i>A. thaliana</i> | 63 |
| Figura 9. Expresión relativa del gen marcador de estrés oxidativo <i>CSD1</i> bajo condiciones de estrés por exceso de Cu en plántulas de <i>A. thaliana</i> | 64 |
| Figura 10. Expresión relativa del gen marcador de estrés oxidativo <i>CCS</i> bajo condiciones de estrés por exceso de Cu en plántulas de <i>A. thaliana</i> | 65 |
| Figura 11. Modelo tridimensional de PdKTI3 incluyendo mutaciones en los nucleótidos correspondientes a los sitios de unión a Cu..... | 67 |
| Figura 12. Gráfico de energías para cada residuo presente en el modelo molecular de PdKTI3S1S2Δ | 67 |
| Figura 13. Gráfico de Ramachandran para PdKTI3 derivada de modelo con mutaciones | 68 |
| Figura 14. Evaluación funcional de los sitios de unión a Cu mutagenizados en <i>PdKTI3</i> , en levaduras mutantes sensibles a este metal (<i>cup2Δ</i>). | 69 |
| Figura 15. Expresión transiente de PdKTI3 en células epidermales de cebolla. (a-c), células transformadas con vector vacío (35S::GFP) | 71 |
| Figura 16. Localización subcelular de la proteína PdKTI3 fusionada a GFP, mediante expresión transitoria en células epidermales de hojas de <i>N. benthamiana</i> , utilizando los marcadores subcelulares pm-rk, ER-rk, y vac-rk | 72 |
| Figura 17. Localización subcelular de la proteína PdKTI3 fusionada a GFP, utilizando los marcadores subcelulares mt-rk, y g-rk. | 73 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|---|----|
| Tabla 1. Estrategias de fitorremediación | 18 |
| Tabla 2. Partidores utilizados para generar mutaciones puntuales en el gen <i>PdKT13</i> . Los nucleótidos mutados están escritos en negrita y subrayados..... | 45 |

ABREVIACIONES

| | |
|-----------------------------------|--|
| Å | Ångström |
| AAO | Amino Oxidasa |
| ABA | Ácido abscísico |
| Ala | Alanina |
| ANOEA | Atomic Non-Local Environment Assessment |
| ANOVA | Análisis de varianza |
| AO | Ascorbato oxidasa |
| Arg | Arginina |
| ARPN | Plantacianina |
| Asp | Ácido aspártico |
| ATX | Antioxidante |
| AtCCH | <i>Arabidopsis thaliana</i> Copper chaperone |
| AtCOX17 | <i>Arabidopsis thaliana</i> cytochrome c oxidase 17 |
| ATPasa | Adenosina trifosfatasa |
| CaCl ₂ | Cloruro de calcio |
| CaMV 35S | Cauliflower mosaic virus 35S |
| Ca(NO ₃) ₂ | Nitrato de calcio |
| CCH | Chaperona de cobre |
| CCS | Chaperona de cobre para superóxido dismutasa |
| cDNA | Ácido desoxirribonucleico complementario |
| CHARMM | Chemistry at HARvard Macromolecular Mechanics |
| <i>CjBBI</i> | Inhibidor de proteasa Bowman-Birk de <i>Coptis japonica</i> |
| CSD | Cu/ZnSOD |
| <i>cup2Δ</i> | Cepa mutante de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> sensible a cobre |
| cm | Centímetro |
| COX | Citocromo-c oxidasa |
| COPT | Copper Transporter |
| CuMRTFs | Cu metalloregulatory transcription factors |
| CuREs | Copper response elements |
| CVZBP | Citrus vascular Zn-binding protein |
| Cys | Cisteína |
| DNA | Ácido desoxirribonucleico |
| DNAP | Ácido desoxirribonucleico plasmidial |
| eGFP | Enhanced-Green Fluorescent Protein |
| ER- rk | Endoplasmic reticulum-rk |
| ETR | Receptor de etileno |
| FeSOD | Superóxido dismutasa de hierro |
| °C | Grados Celsius |
| g | Gramos |
| GAL1 | Galactose1 |
| GAPDH | Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase |
| GFP | Green Fluorescent Protein |

| | |
|--------------------------------------|---|
| Glu | Ácido Glutámico |
| Gly | Gly |
| G- rk | Golgi-rk |
| GUS | β -glucuronidasa |
| H ⁺ | Catión hidrógeno |
| h | Hora |
| His | Histidina |
| HMA | Heavy Metal Associated transporter |
| IPs | Inhibidores de proteasas |
| K ₂ HPO ₄ | Fosfato dipotásico |
| kDa | kiloDalton |
| kg | Kilógramo |
| KTI | Inhibidor de tripsina de kunitz |
| L | Litro |
| LAC | Lacasa |
| LAXI | LB, Ampicilina, X-Gal, IPTG |
| LB | Luria-Bertani médium |
| μ g | Microgramos |
| μ L | Microlitros |
| μ M | Micromolar |
| M | Molar |
| mCherry | Proteína fluorescente roja |
| Met | Metionina |
| mg | Miligramo |
| MgSO ₄ •7H ₂ O | Sulfato de magnesio heptahidratado |
| mL | Militros |
| mM | Milimolar |
| MS | Murashige and Skoog medium |
| MT | Metalotioneína |
| MTPs | Metal Transporter Proteins |
| mt- rk | Mitochondria -rk |
| NaCl | Cloruro de Sodio |
| Na ₂ HPO ₄ | Fosfato de disodio |
| NaH ₂ PO ₄ | Bifosfato de sodio |
| NAMD | Not (just) Another Molecular Dynamics program |
| NBT | Nitro blue tetrazolium |
| nm | Nanómetro |
| ns | Nanosegundo |
| OD | Densidad óptica |
| ORF | Open reading frame |
| P _{1B} -ATPase | 1B Sub-family of the P-type ATPase |
| PAA1 | P-type ATPase 1 |
| pb | Pares de bases |
| PC | Fitoquelatina |
| PCY | Plastocianina |

| | |
|----------------|---|
| PCR | Reacción en cadena de la polimerasa |
| PdKTI3 | <i>Populus deltoides</i> kunitz trypsin inhibitor 3 |
| <i>PdKTI3Δ</i> | Mutante de <i>Populus deltoides</i> kunitz trypsin inhibitor 3 |
| pH | Potencial hidrógeno |
| pm- rk | Plasma membrane-rk |
| PPO | Polifenol oxidasa cloroplástica |
| Pro | Prolina |
| ProSA | Protein Structure Analysis program |
| psi | Libras por pulgada al cuadrado |
| p/v | Porcentaje masa-volumen |
| qPCR | PCR cuantitativo o Real time-PCR |
| RAN | Response to Antagonist |
| RMSD | Root Mean Square Deviation |
| ROS | Especies reactivas de oxígeno |
| rpm | Revoluciones por minuto |
| SC | Synthetic Complete médium |
| seg | Segundos |
| Ser | Serina |
| <i>smf1Δ</i> | Cepa mutante de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> sensible a Ni |
| T ₀ | Transformante 0 (inicial) |
| T ₁ | Transformante, primera generación |
| T ₃ | Transformante, tercera generación |
| TIP3P | Transferable intermolecular potencial 3P |
| Trp | Triptófano |
| Tyr | Tirosina |
| U | Unidades |
| <i>URA3</i> | URAcil3 |
| Val | Valina |
| vac- rk | Vacuole-rk |
| VMD | Visual Molecular Dynamics software |
| <i>wali</i> | Wheat Aluminum Induced |
| <i>ycf1Δ</i> | Yeast cadmium factor protein 1, <i>Saccharomyces cerevisiae</i> |
| YEB | Agrobacterium Growth Medium |
| YM | Yeast and Mold medium |
| ZIP | ZRT, IRT-like Protein |
| <i>zrc1Δ</i> | Zinc resistance conferring <i>Saccharomyces cerevisiae</i> |