
**ANÁLISIS FUNCIONAL DEL GEN *PdKTI3* DE *Populus deltoides*. ROL DE LA
PROTEÍNA CODIFICADA EN LA TOLERANCIA A EXCESO DE COBRE**

**CAROLA ALEJANDRA CAMPOS HERNÁNDEZ
DOCTOR EN CIENCIAS MENCIÓN INGENIERÍA GENÉTICA VEGETAL**

RESUMEN

Los álamos (*Populus* spp) han sido propuestos como especies candidatas para la fitorremediación de metales pesados en los suelos. Si bien el cobre (Cu) es un elemento traza esencial para las plantas, que participa como cofactor de muchas proteínas y desempeña un importante rol en procesos celulares, cuando está en exceso, se convierte en un elemento potencialmente tóxico. Recientemente, el análisis transcripcional de genes en álamos expuestos a exceso de Cu ha permitido identificar una serie de genes diferencialmente expresados relacionados con su respuesta frente al estrés. Entre éstos destacan genes que codifican para proteínas inhibidoras de tripsina del tipo kunitz (KTI), los que fueron significativamente inducidos por el Cu. Sin embargo, la función específica de este tipo de proteínas bajo estrés por metales pesados es muy poco conocida. En estudios previos, el gen *PdKTI3* fue aislado, secuenciado, y la estructura de la proteína codificada fue modelada *in silico*. En ésta destacan dos putativos dominios de unión a Cu, lo que sugiere la capacidad de la proteína para quelar este metal. En ese contexto, para determinar su potencial rol en el marco de los mecanismos de tolerancia a Cu, en esta tesis se analizó funcionalmente el gen *PdKTI3* y su correspondiente proteína, basándose en la hipótesis de que si *PdKTI3* está asociado a la tolerancia al exceso de Cu, entonces su expresión en sistemas heterólogos sensibles debiera conferirles tolerancia a dicho metal. Para ello, se propusieron los siguientes objetivos: (1) establecer la capacidad de *PdKTI3* para conferir tolerancia a Cu, mediante su expresión en sistemas heterólogos, (2) evaluar la participación de dominios de unión a Cu, presentes en la proteína *PdKTI3*, en la respuesta de tolerancia, y (3) establecer la localización subcelular de la proteína codificada por *PdKTI3*. Ensayos de transformación estable de *PdKTI3* en plántulas de *Arabidopsis thaliana* demostraron que su expresión constitutiva confiere tolerancia a estrés por Cu, no obstante, esta tolerancia está limitada a un determinado nivel de expresión del gen. Por otro lado, considerando la estructura de *PdKTI3* previamente modelada, en esta

investigación, ambos sitios de unión a Cu fueron mutados *in silico*, sin que se observara un efecto significativo en su estructura tridimensional. Luego, el gen *PdKTI3* fue modificado mediante mutagénesis sitio-dirigida, y utilizado para complementar una cepa de levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) sensible a Cu (*cup2Δ*), mediante ensayos de tolerancia y cinética de crecimiento, en medios sólidos y líquidos, respectivamente. La evaluación del efecto de las mutaciones sobre la tolerancia al metal mostró que ambos sitios de unión son funcionales. Finalmente, la expresión transitoria de *PdKTI3* en catáfilos de cebolla y células epidermales de tabaco, en conjunto con la utilización de marcadores organelo-específico, permitió precisar su ubicación subcelular. Los ensayos revelaron que *PdKTI3* está localizada en la vacuola y el retículo endoplasmático, y cercanamente relacionada con la membrana plasmática. Los resultados obtenidos sugieren un nuevo papel para proteínas KTI, particularmente como elemento de interacción con Cu frente al estrés por este metal. *PdKTI3* interactuaría con los iones de Cu a nivel de vacuola, compartimentalizando y confiriendo tolerancia a este metal. La caracterización de este nuevo mecanismo molecular de respuesta representa un aporte para el desarrollo de futuras aproximaciones biotecnológicas tendientes a la generación de plantas útiles para fitorremediación.

ABSTRACT

Poplars (*Populus* spp) have been proposed as candidate species for the phytoremediation of heavy metals in soils. Although copper (Cu) is a trace element for plants, it participates as a cofactor of many proteins and plays an important role in cellular processes, when it is in excess, it becomes a potentially toxic element. Recently, the transcriptional analysis of genes in poplars exposed to Cu excess has allowed to identify a series of differentially expressed genes related to their response to stress. Among these genes are those encoding Kunitz trypsin inhibitor proteins (KTI), which were significantly up-regulated by Cu. However, the specific function of these proteins under heavy metal stress still remains almost unknown. In previous studies, the PdKTI3 gene was isolated, sequenced and the structure of the encoded protein was modeled *in silico*. In this stage, two putative Cu binding domains were identified, suggesting the ability of the protein to chelate this metal. In this context, in order to determine its potential role in the framework of Cu tolerance mechanisms, in this thesis the PdKTI3 gene and its corresponding protein were functionally analyzed. The underlying hypothesis considered that if PdKTI3 is associated with tolerance to excess of Cu, then its expression in sensitive heterologous systems should confer tolerance to this metal. For testing that hypothesis, the following objectives were proposed: (1) to establish the ability of PdKTI3 to confer tolerance to Cu, through its expression in heterologous systems, (2) to evaluate the participation of the Cu binding domains, of PdKTI3 protein, in the tolerance response, and (3) to define the subcellular localization of the protein encoded by PdKTI3. The stable transformation assays of *PdKTI3* in *Arabidopsis thaliana* seedlings showed that can confer tolerance to Cu stress. However, this tolerance is limited to specific levels of gene expression. On the other hand, considering the structure of PdKTI3 previously modeled, in this research work, both Cu binding sites were mutated *in silico*, without a significant effect on its three-dimensional structure. Then, the PdKTI3 gene was modified by site-directed mutagenesis, and used to complement a Cu-sensitive strain of yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) (*cup2Δ*), in solid and liquid media, characterizing its performance by tolerance and growth kinetic assays. The analysis of the effect of mutations on metal tolerance showed that both binding sites are functional. Finally, the transient 14 expression of *PdKTI3* in onion and tobacco epidermal cells, along

with the use of specific organelle markers, allows to identify its subcellular location. The results indicated that PdKTI3 is found in the vacuole and the endoplasmic reticulum, and closely related to the plasma membrane. The results suggest a new role for KTI proteins, particularly as a molecule that interacts with Cu, under stress conditions. PdKTI3 would interact with Cu ions at the vacuole level, suggesting their compartmentalization and conferring tolerance to this metal. The characterization of this new molecular mechanism of response represents a support for the development of future biotechnological approaches suitable for generating phytoremediation systems