



UNIVERSIDAD DE TALCA

Instituto de Ciencias Biológicas

Programa de Doctorado en Ciencias, mención Ingeniería Genética Vegetal

**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

TALCA, AGOSTO 2018

Candidato a Doctor: Carola Alejandra Campos Hernández

Fecha inicio de Tesis: Marzo 2013

Fecha término de Tesis: Septiembre 2016

Profesor Tutor: Dr. Enrique González

Instituto de Ciencias Biológicas

Universidad de Talca

2 norte 685, casilla 747, Talca.

egonzale@utalca.cl

Profesor co-Tutor: Dr. Fernando Guerra

Instituto de Ciencias Biológicas

Universidad de Talca

2 norte 685, casilla 747, Talca.

fguerra@utalca.cl

Integrantes de la Comisión de Evaluación:

Dra. Claudia Ortiz

Facultad de Química y Biología

Universidad de Santiago de Chile

Dr. Claudio Ramírez

Instituto de Ciencias Biológicas

Universidad de Talca

Dr. Carlos Gaete

Instituto de Ciencias Biológicas

Universidad de Talca

CONSTANCIA

La Dirección del Sistema de Bibliotecas a través de su unidad de procesos técnicos certifica que el autor del siguiente trabajo de titulación ha firmado su autorización para la reproducción en forma total o parcial e ilimitada del mismo.



Talca, 2019

AGRADECIMIENTOS

- A Dios por su infinita fidelidad.
- A CONICYT, por otorgarme la beca doctorado Nacional, y el beneficio de Gastos Operacionales asociados a mi tesis.
- A FONDECYT, por la adjudicación del proyecto asociado a mi tesis doctoral denominado: “Evaluating the role of novel genes involved in copper tolerance in forest trees: a structural and functional analysis of PdKTI3, a member of the kunitz trypsin inhibitor gene family in poplar” (11110214), dirigido por el Dr. Fernando Guerra.
- Al Centro Tecnológico del Álamo (CTA) de la Universidad de Talca, por el material vegetal facilitado.
- Al Dr. Simón Ruiz, por confiar en mí desde el inicio del doctorado y permitirme ser parte de un gran grupo de investigación como lo es el Laboratorio de Genómica Funcional. Por su disponibilidad, guía, y apoyo cada vez que lo necesité.
- Al Dr. Fernando Guerra, por su dirección, apoyo incondicional en todo momento, por siempre confiar en mis capacidades y por su gran compromiso con mi investigación.
- Al Dr. Enrique González, por su guía, apoyo, y constantes aportes atingentes a mi investigación doctoral.
- A la Dra. Claudia Ortiz, Dr. Claudio Ramírez y Dr. Carlos Gaete por aceptar ser parte de la comisión de esta tesis.
- A Victoria Ruz, Señor Chávez y Señor Moreno, quienes sin duda hicieron de mi estadía en el Instituto una grata experiencia.
- A Jorge y Ricardo Pérez por su guía y apoyo durante mis primeros años en el doctorado.
- A Daniela Urbina por su guía y dedicación en el uso del microscopio confocal.
- A mis amigos Isabel Verdugo, José Madrid, Sabina Rojas y Samuel Morales, por su constante apoyo, orientación, y amistad.
- A mis padres, Hernán Campos y Olga Hernández; a mis hermanos, Gonzalo y Macarena, por su amor, entrega, y confianza puesta en mí desde el principio de esta experiencia, y durante toda mi carrera profesional.
- A mi esposo Jorge Fuentes, por su apoyo incondicional, paciencia, comprensión y amor entregado en todo momento, así como a mis hijos Matías y Maximiliano, quienes son la motivación de mis días.

...Quisiera dedicar esta tesis a mi madre, quien me inculcó el amor por las ciencias

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	Mililitros
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>

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

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.

I. INTRODUCCIÓN

I.1 Presencia de metales pesados en el ambiente

Los metales pesados se definen como aquellos elementos que poseen una densidad mayor a 5 g/cm^3 (Schützendübel & Polle, 2002; Yang et al., 2005). Desde la perspectiva de la presencia de contaminantes inorgánicos en el ambiente, ellos constituyen el principal grupo. La contaminación del suelo por estos metales es una preocupación científica y social, debido a los efectos adversos en el ser humano y en los ecosistemas (Yadav, 2010). Dentro de las fuentes naturales más importantes de metales pesados se encuentran la degradación de minerales, erosión y actividad volcánica. Adicionalmente, existen fuentes antropogénicas que incluyen la minería, uso de pesticidas y fertilizantes en la agricultura, así como la generación de desechos industriales, todos los cuales han producido importantes efectos negativos sobre los ecosistemas terrestres impactados (Wuana & Okieimen, 2011; Thakur et al., 2016). En cuanto a sus efectos tóxicos, los metales pesados más dañinos para el ambiente son mercurio (Hg), cadmio (Cd), plomo (Pb), arsénico (As), cobre (Cu), zinc (Zn), estaño (Sn) y cromo (Cr) (Ghosh, 2010), de los cuales Hg, Cd, Pb y As son metales pesados no esenciales para funciones biológicas, mientras que Cu y Zn son metales pesados esenciales (Ali et al., 2013; Singh et al., 2016). Los efectos negativos sobre los ecosistemas se deben a la alta persistencia de los metales en el suelo y a la toxicidad directa que muchos de estos elementos producen en los seres vivos (Kabata-Pendias, 1995; Järup, 2003). La concentración total del metal presente en el suelo no se relaciona directamente con los efectos de toxicidad, sino más bien una fracción del total estaría disponible, lo que se denomina como concentración biodisponible (Ginocchio et al., 2002). La biodisponibilidad de cualquier metal en el suelo es un concepto multifactorial, ya que considera las complejas interacciones entre los metales y otros componentes del ecosistema terrestre, así como la capacidad específica de cada especie para extraer los metales del suelo. Parámetros físico- químicos de éste, tales como su textura, el pH, contenido de materia orgánica, y la cantidad y tipo de arcilla, interactúan para determinar el proceso de desorción de los metales en los suelos, determinando el grado de solubilización de los metales o la capacidad tamponante del suelo (Sauvé et al., 2000; Ginocchio & Narváez, 2002). Específicamente, la solubilidad de la mayoría de los metales aumenta al disminuir el pH del suelo, y disminuye al aumentar el contenido de materia orgánica (Ginocchio et al., 2002; Sherameti & Varma, 2010). Por lo

tanto, la fitotoxicidad provocada por metales en el suelo dependería además de diversos factores edáficos, y no sólo de su concentración. Por tanto, dada la complejidad de la presencia de metales pesados en el suelo, su adecuada caracterización o evaluación es fundamental para aplicar metodologías de remediación efectivas que minimicen el impacto de estos elementos sobre los ecosistemas.

I.2 Fitorremediación: una tecnología verde para la recuperación de suelos contaminados

La movilización de metales pesados por el hombre, a través de la extracción y del procesamiento de minerales para diferentes aplicaciones, ha dado lugar a la liberación de estos elementos en el medio ambiente, afectando las características de los suelos. Dado que los metales pesados no son biodegradables, se produce su bioacumulación, siendo un claro riesgo para la salud y el ambiente (Thakur et al., 2016). Se han utilizado diferentes métodos para evitar o reducir concentraciones de contaminantes tóxicos, sin embargo, éstos poseen limitaciones como por ejemplo el alto costo, la alteración de las propiedades del suelo, y la perturbación de la microflora nativa del suelo, que disminuye su número y actividad (Khan et al., 2010; Ali et al., 2013). Es por esto que la fitorremediación se presenta como una alternativa con un gran potencial, que permite utilizar plantas y sus microorganismos asociados del suelo, para reducir las concentraciones y/o efectos tóxicos que causan los contaminantes en el ambiente (Greipsson, 2011; Mosa et al., 2016). Las plantas pueden ser utilizadas bajo diferentes estrategias de fitorremediación, como por ejemplo fitoextracción (o fitoacumulación), rizofiltración (fitofiltración), fitoestabilización, fitovolatilización y fitodegradación (Tabla 1) (Alkorta et al., 2004; Yang et al., 2005; Tangahu et al., 2011).

Tabla 1. Estrategias de fitorremediación.

Estrategia	Mecanismo de acción	Medio tratado
Fitoextracción	Absorción por las raíces de las plantas, y translocación de contaminantes hacia las partes aéreas de la planta (brotes), los cuales podrían ser cosechados.	Suelo
Rizofiltración	Absorción y adsorción por las raíces de contaminantes que se encuentran en solución en la rizósfera.	Aguas superficiales y subterráneas
Fitoestabilización	Exudados radiculares causan la inmovilización y precipitación de metales, disminuyendo su biodisponibilidad. Este término también se emplea para referirse al establecimiento de una cubierta vegetal sobre un terreno contaminado.	Aguas subterráneas, suelo, relaves mineros
Fitovolatilización	Absorción y transpiración de compuestos orgánicos volátiles y iones de algunos metales, liberando el contaminante desde la planta hacia la atmósfera.	Suelo, aguas subterráneas
Fitodegradación	Degradación microbiana en la rizósfera	Suelo, aguas subterráneas dentro de la rizósfera

Los altos niveles de metales pesados como Cu, Cd, o Zn presentes en los suelos o desechos contaminados, puede afectar el desarrollo de las plantas utilizadas para fitorremediación. Sin embargo, algunas especies vegetales pueden tolerar e incluso acumular metales (Tong et al., 2004). Las plantas, generalmente manejan los contaminantes sin afectar el suelo, conservando así su utilidad, e inclusive pudiendo mejorar su fertilidad. La fitorremediación es considerada como una tecnología relativamente reciente, rentable y eficiente, en beneficio del medio ambiente (Mosa et al., 2016; Thakur et al., 2016). La mejora

genética de las plantas a través de métodos tradicionales y/o biotecnológicos es esencial para mejorar la eficiencia de los sistemas de fitorremediación (Pilon-Smits, 2005), por lo que las plantas con capacidades mejoradas para tolerar, acumular o degradar contaminantes, son muy deseables en el área de fitorremediación de suelos.

I.3 Especies metalófitas

Las metalófitas son plantas que se adaptan y prosperan natural y específicamente en suelos con altas concentraciones de metales pesados (Bothe, 2011; Sheoran et al., 2011). Las metalófitas se dividen en tres categorías: exclusoras, indicadoras e hiperacumuladoras de metales (Ali et al., 2013; Lange et al., 2016). Las exclusoras se caracterizan por acumular metales pesados en sus raíces, restringiendo su transporte hacia las partes aéreas de la planta. Las metalófitas indicadoras acumulan los metales pesados sólo en sus partes aéreas (Sheoran et al., 2011; Malik & Biswas, 2012). Por otro lado, las plantas hiperacumuladoras tienen la capacidad natural de acumular grandes cantidades de metales pesados en las hojas (Rascio & Navari-Izzo, 2011). Según Baker & Brooks (1989) dentro de esta categoría están aquellas especies capaces de acumular en sus brotes más de 100 mg/kg de peso seco de Cd, o más de 1000 mg/kg de peso seco de níquel (Ni), Cu y Pb, o más de 10.000 mg/kg de peso seco de Zn y manganeso (Mn), cuando crecen en suelos ricos en metales (Ali et al., 2013). En la literatura se han descrito más de 400 especies de este tipo, entre las cuales existen más de 300 hiperacumuladoras de Ni (Li et al, 2003; Prasad, 2005). En relación a hiperacumuladoras de Cu, el primer reporte descrito por Duvigneaud & Denaeyer-De (1963), informó concentraciones de 1200, 1660, y 1960 mg/kg de Cu para las especies *Ascolepis metallorum*, *Silene cobalticola*, y *Haumaniastrum robertii*, respectivamente. Otras especies hiperacumuladoras de este metal incluyen *Brassica juncea* (Cu, Ni) (Ebbs & Kochian, 1997), *Pteris vittata* (Cu, Ni, Zn) (Ma et al., 2001), *Pistia stratiotes* (Cu, Cd, Zn, Hg) (Odjegba & Fasidi, 2004), y *Sorghum sudanense*, la cual puede almacenar hasta 5330 mg/kg de metal por unidad de peso seco (Sarma, 2011).

Dentro de las especies vegetales, los árboles tienen muchas características útiles para la fitorremediación (Pulford & Watson, 2003). Si bien, especies como los álamos (*Populus* spp) no son metalíferas, estudios han identificado una serie de genotipos con respuestas de tolerancia frente a condiciones de exceso de metales. Así por ejemplo, Guerra et al. (2009) identificaron un clon de *Populus deltoides* con acumulación mayoritaria de Cu en sus raíces, que correspondería a un mecanismo de defensa basado en la exclusión de este metal.

La acumulación de metales pesados en algunas especies no necesariamente metalíferas, pero con una capacidad de producción de biomasa significativa, puede ser potenciada por modificaciones genéticas a través de métodos biotecnológicos (Pilon-Smits, 2005).

I.4 Absorción y transporte de metales pesados en las plantas

Las plantas absorben los metales pesados, esenciales y no esenciales, desde el suelo hacia sus raíces. Una vez que entran en contacto con la superficie radicular, los iones ingresan a la célula mediante proteínas transportadoras de membrana, pudiendo ser almacenados en la vacuola o en el citoplasma unidos a proteínas chaperonas o quelantes de metales. Por otro lado, los metales pueden ser transportados a través de los vasos xilemáticos en forma iónica o complejados, permitiendo así que sean transportados largas distancias hacia las estructuras aéreas (hojas, brotes), donde pueden formar complejos con diversos quelantes (Jabeen et al., 2009; Migocka & Malas, 2018). Entre éstos los ácidos orgánicos y aminoácidos son sugeridos como ligandos para la quelación de iones de metales pesados, debido a la presencia de átomos donadores de electrones en sus moléculas como azufre (S), nitrógeno (N) y oxígeno (O) (Sheoran et al., 2011). Cuando están en concentraciones por sobre las necesidades de las células, éstos se depositan mayoritariamente en las vacuolas (Ali et al., 2013). Ésta es una de las formas de remover el exceso de iones en el citosol y poder reducir su interacción con procesos metabólicos celulares (Sheoran et al., 2011). La compartimentación de metales en las vacuolas es parte del mecanismo de tolerancia en plantas hiperacumuladoras de metales (Tong et al., 2004). Adicional a este mecanismo, se

encuentran la quelación en el citoplasma a través de la inducción de péptidos de unión a metales y la formación de complejos metálicos (Memon & Schröder, 2009; Ali et al., 2013). El transporte de los metales desde el suelo está regulado por una serie de moléculas, algunas involucradas en el transporte a través de la membrana, y otras en la quelación y subsecuente secuestro de metales en la vacuola. La absorción de iones de metales pesados desde el suelo es mediada por transportadores especializados como canales proteicos, o por proteínas transportadoras acopladas a H⁺ presentes en la membrana plasmática de la raíz (Greipsson, 2011). En el caso del Cu, éste se absorbe en las raíces en su forma reducida (Cu⁺) por proteínas COPT (Copper Transporter), que corresponden a proteínas transportadores altamente selectivas (Schulten & Krämer, 2018). Alternativamente, el Cu puede ser absorbido en su forma oxidada (Cu⁺²) por proteínas no selectivas (ZIP); mientras que el flujo de salida de (Cu⁺²) está mediado por sistema antiporte [H⁺ /Cu⁺²] (Printz et al., 2016; Schulten & Krämer, 2018). Dentro de la célula, el Cu es unido a chaperonas específicas de Cu como ATX1 (Antioxidant Protein 1) o quelado por metalotioneínas (MT). El importe a la vacuola es mediado por proteínas transportadores HMA (Heavy Metal ATPase), mientras que el eflujo por proteínas COPT. La proteína chaperona ATX1 deriva el Cu a la proteína transportadora de membrana HMA5, para ser translocado hacia el xilema. Una vez ahí, el Cu reducido es oxidado a Cu⁺² formando complejos con proteínas quelantes como nicotianamina lo que permite que sea transportado largas distancias. Los transportadores YSL (Yellow Stripe Like) y COPT son los encargados de derivar el Cu hacia las células foliares, ya sea en su forma acomplejada o reducida, respectivamente (Migocka & Malas, 2018).

I.5 Efecto del exceso de metales en las plantas

Metales como el Fe, Zn, Mn o Cu, son elementos esenciales para el crecimiento de la planta, siendo requeridos para roles estructurales y catalíticos en proteínas involucradas en su metabolismo y desarrollo (Singh et al., 2016). Sin embargo, estos metales pueden ser tóxicos cuando se presentan en altas concentraciones (Yang et al., 2005; Haydon & Cobbett, 2007). Las plantas, al ser organismos aerobios, utilizan oxígeno molecular (O₂) como aceptor terminal de electrones. Como resultado de la reducción de O₂, se producen intermediarios

altamente reactivos, denominados especies reactivas de oxígeno (ROS). Estas especies incluyen radicales libres [superóxido ($O_2^{\bullet-}$), hidroxilo ($\bullet OH$)], así como moléculas no radicales [peróxido de hidrógeno (H_2O_2), oxígeno singlete (1O_2)] (Gechev et al., 2006; Sharma et al., 2012). El poder oxidante de $O_2^{\bullet-}$ y H_2O_2 los hace potencialmente peligrosos para el entorno celular circundante. El radical superóxido puede desactivar importantes enzimas metabólicas que contienen grupos Fe-S y alterar así actividades catalíticas. Su forma protonada, radical hidropéroxido, puede atravesar membranas biológicas e iniciar la oxidación lipídica mediante la extracción de protones de ácidos grasos poliinsaturados. (Gechev et al., 2006). Las ROS son producidas continuamente como subproductos de varias rutas metabólicas que se localizan en diferentes compartimentos celulares, como cloroplastos y mitocondrias. En cloroplastos, los principales sitios de producción de ROS son el fotosistema I y II, mientras que en la mitocondria son el complejo I, la ubiquinona y el complejo III de la cadena transportadora de electrones (Singh Gill & Tuteja, 2010). Los peroxisomas y glioxisomas también son importantes sitios de generación de ROS, durante la fotorrespiración y la oxidación de ácidos grasos, respectivamente (Gechev et al., 2006). La producción y eliminación de ROS está finamente regulada por diferentes mecanismos antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos, logrando la homeostasis celular (Yang et al., 2005; Thakur et al., 2016). Sin embargo, este equilibrio puede ser perturbado por diferentes factores medioambientales, como la sequía, la salinidad, el frío, y la toxicidad por metales pesados, así como por el ataque de patógenos. Estos factores externos conducen a un repentino aumento de los niveles intracelulares de ROS, debido a la alteración de la homeostasis, llegando a ser altamente dañinos para la célula. Cuando los niveles de ROS exceden los mecanismos de defensa se produce un desequilibrio celular lo que conlleva a un estrés oxidativo, pudiendo conducir al daño o muerte celular (Das et al., 2008; Mudipalli, 2008; Sharma et al., 2012; Singh et al., 2016). Sin embargo, a pesar de los efectos negativos que provoca el exceso de ROS en la célula, estas moléculas también están involucradas en el proceso de aclimatación al estrés, siendo importantes moléculas de señalización en plantas. Por ejemplo, el radical superóxido y peróxido de hidrógeno pueden actuar como segundos mensajeros, regulando la expresión génica mediante la modificación de factores de transcripción (Gechev et al., 2006; Choudhury et al., 2013).

Si bien el Cu es un elemento traza esencial, participando como cofactor de muchas proteínas (Linder & Goode, 1991), que desempeña un importante rol en procesos como fotosíntesis, respiración, metabolismo del carbono y nitrógeno, percepción del etileno, y síntesis de la pared celular (Hänsch & Mendel, 2009; Burkhead et al., 2009; Ravet & Pilon, 2013), en su forma iónica es un elemento potencialmente tóxico (Burkhead et al., 2009). Las principales proteínas cúpricas en la planta son la PC y COX, implicadas en el transporte de electrones en el cloroplasto y la mitocondria, respectivamente. Otras son la PPO y LAC (**Fig. 1**) (Ravet & Pilon, 2013). Bajo condiciones fisiológicas, el Cu posee dos estados de oxidación: Cu^+ (ión cuproso) y Cu^{+2} (ión cúprico), siendo la forma monovalente la menos estable, y la divalente la principal absorbida por las plantas (Emamverdian et al., 2015; Migocka & Malas, 2018). Esto permite que el Cu funcione como un agente oxidante o reductor en las reacciones bioquímicas, siendo potencialmente tóxico. El ión cúprico se puede reducir a ión cuproso, siendo capaz de catalizar la formación de radicales hidroxilos ($\bullet\text{OH}$) altamente reactivos, a través de la descomposición del peróxido de hidrógeno (H_2O_2) mediante la reacción de Fenton (Schulten & Krämer, 2018):



Esta reacción puede conducir al daño de proteínas, ADN, inhibición enzimática y peroxidación lipídica (Valko et al., 2005; Sharma et al., 2012). El daño en el ADN produce diversos efectos fisiológicos, como la reducción de síntesis de proteínas, destrucción de la membrana celular y el daño de proteínas fotosintéticas, afectando el crecimiento y desarrollo de toda la planta (Singh Gill & Tuteja, 2010).

Sin embargo, como un mecanismo de defensa celular, los iones de Cu pueden ser unidos a proteínas quelantes, como las MT, las que previenen la acumulación en niveles tóxicos para la célula. Además, existen iones de Cu que son capturados por proteínas de unión pequeñas, denominadas proteínas chaperonas de Cu (O'Halloran & Culotta, 2000; Puig et al., 2007), que capturan este metal desde los sistemas de detoxificación y los guían a sitios blancos en la célula. Más de la mitad del Cu en las plantas se encuentra en los cloroplastos,

donde participa en reacciones fotosintéticas. Interesantemente, el metabolismo del Cu está íntimamente ligado al metabolismo del Fe, ya que dependiendo de la biodisponibilidad de Cu y Fe, las plantas poseen enzimas para alternar el uso del Cu versus Fe, y así catalizar la misma reacción bioquímica con apoproteínas completamente diferentes (Merchant et al., 2006). Además, el Cu es altamente reactivo con los grupos tioles y puede desplazar otros metales esenciales en proteínas (Burkhead et al., 2009).

I.6 Mecanismos de tolerancia a Cu

La concentración de Cu en el suelo es 2 a 250 $\mu\text{g/g}$, de los cuales las plantas pueden absorber 20 a 30 $\mu\text{g/g}$ de peso seco (Emamverdian et al., 2015). Sin embargo, su biodisponibilidad depende además de diversos factores físico-químicos del suelo (mencionados en el punto I.1). Las plantas poseen mecanismos de tolerancia basal para evitar la toxicidad de Cu. Entre ellos, destacan la: (1) reducción de la absorción mediante la producción de exudados radiculares y/o la interacción con hongos micorrízicos, (2) inmovilización del exceso de Cu en la raíz, (3) estimulación del eflujo de metales desde la membrana plasmática, (4) quelación de iones en el citoplasma, y (5) acumulación de metales en la vacuola (Krämer & Clemens, 2005; Yruela, 2009). En condiciones de estrés por Cu, algunas especies como *Triticum aestivum* reducen la absorción de iones libres tóxicos liberando malato, citrato y oxalato desde sus raíces, que actúan como moléculas quelantes de iones (Haydon & Cobbett, 2007). La interacción de plantas con ectomicorrizas les confiere una protección adicional contra la toxicidad por Cu (Krpata et al., 2008). A nivel celular, la pared puede unir iones de metales, regulando su flujo hacia el citoplasma mediante intercambio catiónico (Wang & Evangelou, 1995), donde el Cu puede unirse a pectinas (Konno et al., 2005) o proteínas de pared (Bringezu et al., 1999). Adicionalmente, diferentes proteínas transmembranas transportadoras de metales, permiten su compartimentalización subcelular o el flujo hacia el apoplasto (**Fig. 1**), como por ejemplo, PAA1 que regula el ingreso hacia el cloroplasto, o COPT5 ubicado en el tonoplasto (Williams & Mills, 2005; Ravet & Pilon, 2013). Los transportadores de Cu identificados en *Arabidopsis* incluyen miembros de la familia COPT (Sancenón et al., 2003), P_{1B}-ATPase (Williams & Mills, 2005),

y de la familia ZIP (Palmer & Guerinot, 2009). Mientras que en *P. trichocarpa* algunos identificados son PtCOPT6, PtCOPT4, y PtCOPT3, expresados en el xilema, raíces e inflorescencias, respectivamente (Migeon et al., 2010). La distribución intracelular del Cu es regulada por proteínas chaperonas que pueden ser coordinadas con Cu-ATPasas, facilitando la detoxificación de Cu (Andrés-Colás et al., 2006). Algunas proteínas chaperonas de Cu caracterizadas en *Arabidopsis* son: AtCCH (Mira et al., 2001) y AtCOX17 (Balandin & Castresana, 2002). Además de estos mecanismos, las plantas poseen dos sistemas de defensa antioxidante: enzimáticos y no enzimáticos. Los primeros incluyen a enzimas como superóxido dismutasa, catalasa, ascorbato peroxidasa, glutatión reductasa, monodehidroascorbato reductasa, dehidroascorbato reductasa, y glutatión peroxidasa. En el segundo sistema de defensa se encuentran el ácido ascórbico, glutatión, compuestos fenólicos, alcaloides, aminoácidos no proteicos y α -tocoferoles (Ravet & Pilon, 2013; Emanverdian et al., 2015; Singh et al., 2016). Estos mecanismos de defensa antioxidante se activan en conjunto, para controlar las cascadas de oxidación y proteger las células del daño oxidativo por ROS (Singh Gill & Tuteja, 2010).

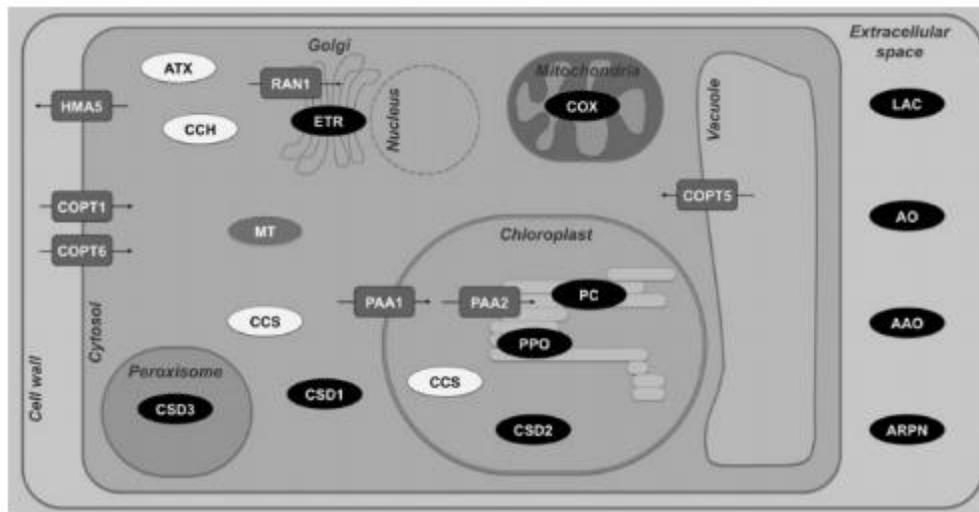


Figura 1. Transporte de Cu, utilización y quelación en la célula vegetal. Representación de las diferentes proteínas implicadas en la homeostasis de Cu, respecto a su membrana y ubicación. Rectángulos indican proteínas transportadoras de Cu, y las flechas su orientación transporte. Óvalos blancos representan proteínas chaperonas de Cu, óvalos negros proteínas que utilizan Cu, y óvalos

grises proteínas quelantes de Cu. (RAN=HMA7; PAA1=HMA6; PAA2=HMA8). (Ravet & Pilon, 2013).

El exceso de iones metálicos libres en el citoplasma puede ser disminuido mediante la unión de éstos a ligandos fuertes como los tioles, que incluyen a las fitoquelatinas (PC) (Cobbett, 2000) y metalotioneínas (MT) (Zhou & Goldsbrough, 1994), siendo la principal estrategia de detoxificación en plantas. Esta detoxificación está dada por la formación de complejos con iones metálicos, ya sea a nivel de citoplasma, vacuola, o mediante eflujo del metal a través de la membrana plasmática (Cobbett & Goldsbrough, 2002). Las PCs y MTs son moléculas proteicas de unión a metales pesados ricas en Cys. La Cys es el residuo aminoacídico de unión a metal más importante en las proteínas, y es además un componente básico de las PCs y MTs. Las PCs son péptidos sintetizados principalmente en el citoplasma de la célula por la enzima fitoquelatina sintasa, la cual es activada por varios iones de metales pesados, con inducción *in vivo* de las PCs (Cobbett, 2000; Sarma, 2011). Luego de la formación del complejo PC-metal en el citoplasma, éste es derivado a la vacuola con el propósito de disminuir la toxicidad del metal en la célula (Chaudhary et al., 2018). Mutantes de *A. thaliana* que carecen de la enzima fitoquelatina sintasa son incapaces de sintetizar PC y son hipersensibles a Cd y Hg (Memon & Schröder, 2009). Las MT, a diferencia de las PC, son polipéptidos codificados por cuatro subfamilias de genes (Cobbett & Goldsbrough, 2002). Las MT corresponden a los ligandos detoxificantes de metales más conocidos, y su rol en las plantas está asociado a homeostasis de metales bajo condiciones fisiológicas normales (no tóxicas) (Leitenmaier & Küpper, 2013). Son moléculas ricas en cisteína, lo que las hace eficientes en la formación de complejos metálicos. La detoxificación está dada por la unión a diferentes iones metálicos a través del grupo tiol de la cisteína, ejerciendo un papel clave frente a estrés por metales pesados. Al igual que las PCs, las MTs pueden compartimentalizar los iones en la vacuola (Chaudhary et al., 2018). En términos de detoxificación, parece no ser muy importante para Cd, ya que la protección contra la toxicidad por este metal es provista por las PC en plantas. Sin embargo, juega un rol fundamental para tolerancia y homeostasis del Cu (Cobbett & Goldsbrough, 2002). Se ha reportado una coordinación en la expresión de genes MTs y genes implicados en la homeostasis del Cu en hojas senescentes. Los genes AtCCH y AtRAN1, en conjunto con

genes MTs, permiten la quelación del Cu liberado por metaloproteínas que están siendo catabolizadas en hojas senescentes, evitando el daño oxidativo celular (Cobbett & Goldsbrough, 2002). También, el nivel de expresión del gen MT Tipo 2 es correlacionado estrechamente con la tolerancia a Cu en *Arabidopsis* ecotipo Wassilewskija (tolerante a Cu), y no así el ecotipo Columbia (sensible a Cu) (Murphy & Taiz, 1995). Adicionalmente, se ha demostrado que poblaciones tolerantes a Cu de *Silene vulgaris* tienen una mayor la expresión del gen MT Tipo 2 (Van Hoof et al., 2001). Recientemente, además de las PC y MT, se ha descrito a los inhibidores de proteasa del tipo Kunitz como proteínas que tienen la capacidad de unir Cu, a través de la coordinación de este ion con los aminoácidos His, Glu, Ser y Met (Guerra et al., 2015). Esta capacidad quedó evidenciada mediante el modelamiento molecular de la proteína PdKTI3, y la identificación de dos sitios de unión a Cu (Guerra et al., 2015).

I.7 Inhibidores de proteasas y su importancia para las plantas

Durante el ciclo de vida normal de una planta existen procesos de desarrollo específicos, tales como germinación, recambio de proteínas asociado con el crecimiento, diferenciación, embriogénesis y senescencia, en los cuales la actividad proteolítica, mediada por las proteasas, es crucial (Stintzi et al., 1993; Rustgi et al., 2018). Estas enzimas se han clasificado, según el mecanismo catalítico de su sitio activo, en proteasas del tipo serina, cisteína, aspártico, y metalo-proteasas (Zolórzano & Peteira, 2000; Christeller, 2005). Por otra parte, las plantas se defienden activamente contra patógenos y herbívoros utilizando mecanismos de defensa inducibles (Karban & Myers, 1989). Uno de estos mecanismos es la activación de genes que codifican proteínas de defensa contra herbívoros denominadas proteínas inhibidoras (IP). Se han identificado 76 familias distintas de IPs, las cuales se agrupan principalmente como inhibidores del tipo serina, cisteína, aspártico o metaloproteasas (Ma et al., 2011; Rustgi et al., 2018). Estas IP son pequeñas proteínas reguladoras presentes en alta concentración en tejidos de almacenamiento principalmente, y también en hojas en respuesta al ataque de insectos y patógenos (De Leo et al., 2002). Las IP corresponden a proteínas involucradas en múltiples procesos celulares, incluyendo la embriogénesis (Jofuku & Goldberg, 1989), muerte celular programada (Li et al., 2008), y

germinación (Hernández-Nistal et al., 2009). El inhibidor del tipo serina es el más abundante, ya que se encuentra presente en semillas, hojas, y tubérculos de muchas especies de la familia Fabaceae, Poaceae, y Solanaceae (Charity et al., 1999). Los IPs constituyen una parte efectiva e integral de defensa de la planta, debido a su capacidad de inhibir enzimas proteolíticas digestivas y reducir así el crecimiento y sobrevivencia de organismos herbívoros (Lopes et al., 2004; Ma et al., 2011). Su distribución es ubicua en la mayoría de las plantas, ya que se encuentran, tanto en órganos reproductivos y vegetativos, como en órganos de almacenamiento (Ma et al., 2011). Se ha descrito que el inhibidor de proteasa del tipo serina podría jugar un rol en respuestas medioambientales y del desarrollo (Huang et al., 2007). Diversos estudios han demostrado que el daño mecánico por insectos y la infección por microorganismos potencia significativamente el nivel de IP (Telang et al., 2003). En rábano (*Raphanus sativus*), se ha reportado una inducción de la expresión de IP en plantas tratadas con NaCl (López et al., 1994), así como en *A. thaliana* por estrés por sequía (Gosti et al., 1995). También en papa (*Solanum tuberosum*), se ha reportado la inducción de un inhibidor de proteasa del tipo Kunitz de 27 kDa, en respuesta a ABA, etileno, déficit hídrico y metil jasmonato (Kang et al., 2002). Por otra parte, en tomate se han identificado inhibidores de la proteasa serina bajo condiciones de estrés por NaCl (Dombrowski, 2003). En arroz, un inhibidor de quimiotripsina fue significativamente inducido bajo estrés hídrico y tratamientos con ABA (Huang et al., 2007). Factores involucrados en el estrés abiótico, tales como ABA y peróxido de hidrógeno, aumentan la expresión de IP (Hilderman et al., 1992). Recientemente se reportó la característica multifuncional que presentan las proteínas inhibidoras de proteasas en plantas (Grosse-Holz & van der Hoorn, 2016). Esta característica, permite que una misma proteína posea dos sitios inhibitorios funcionales a la vez; más de un dominio inhibitorio; o que utilicen el mismo sitio de unión para inhibir diferentes proteasas blanco (Grosse-Holz & van der Hoorn, 2016). Tal como ocurre con algunos IPs del tipo Kunitz, que se caracterizan por inhibir diferentes clases de enzimas como las serin y cisteín proteasas (Migliolo et al., 2010; Da Silva et al., 2014; Chan et al., 2017). Estos antecedentes sugieren que los inhibidores de proteasa, además de tener un rol defensivo frente a estrés biótico, también están implicados en estrés abiótico, aunque su función específica como mecanismos de tolerancia aún no ha sido definida.

I.8 Inhibidores de proteasas del tipo serina

Las serin proteasas constituyen la familia más grande de proteasas vegetales y se caracterizan por la presencia de un único residuo de Ser en su tríada catalítica (His-Asp-Ser) (Rustgi et al., 2018). Las dos familias mejor caracterizadas de los inhibidores de proteasa del tipo serina son la familia Kunitz y la familia Bowman-Birk (Haq et al., 2004). Las proteínas de la familia Kunitz, como el KTI, son moléculas que poseen un tamaño entre 18-24 kDa, con una o dos cadenas polipeptídicas, usualmente con cuatro residuos de Cys en dos puentes disulfuro y un sitio reactivo para tripsina (Oliva et al., 2000; Chan et al., 2017; Rustgi et al., 2018). En contraste, los inhibidores del tipo Bowman-Birk poseen una baja masa molecular (8-10 kDa), un alto contenido de Cys y dos sitios reactivos (Haq et al., 2004). En plantas, la mayoría de los miembros de estas dos familias inhiben proteasas del tipo serina, en particular tripsina (Major & Constabel, 2008). El inhibidor de tripsina KTI, es una superfamilia que ha sido objeto de una amplia investigación por su actividad contra proteasas (Ma et al., 2011). Fue descrita por primera vez por Moses Kunitz en el año 1946, quien aisló un inhibidor de tripsina de soya (*Glycine max*) (Kunitz, 1946). Las proteínas KTI poseen un péptido señal que consiste en 25-28 aminoácidos (Nielsen et al., 1997), el cual es escindido durante el procesamiento post-traducciona, generando la forma activa del inhibidor de proteasa (Song & Suh, 1998). Estas proteínas poseen en su estructura el dominio Kunitz ([L,I,V,M]-X-D-X₂-G-X₂-[L,I,V,M]-X₅-Y-X-[L,I,V,M]) (Major & Constabel, 2008; Chan et al., 2017). Este dominio se caracteriza por la presencia de un patrón aminoacídico constituido por Leu, Ile, Val y Met, los cuales pueden estar presentes hasta tres veces; mientras que los aminoácidos Asp, Gly y Tyr, sólo una vez. Los primeros tres aminoácidos del patrón (Leu, Ile y Val) poseen una cadena lateral hidrocarbonada, mientras que Met posee un grupo sulfhidrilo (-SH). En relación a su solubilidad, casi todos son aminoácidos hidrofóbicos, excepto el Asp que clasifica como hidrofílico. Este dominio Kunitz es conservado en otras especies, como soya (*GmKTI*), cúrcuma (*CiKTI*) y álamo (*PtKTI*) (Major & Constabel, 2008; Chan et al., 2017). Las proteínas maduras se componen de 10 a 12 hebras β antiparalelas (Song & Suh, 1998). La mayoría de las KTI contienen cuatro residuos de Cys conservados, que forman dos puentes disulfuro, los cuales estabilizan la proteína madura (Rustgi et al., 2018). El primer

puente disulfuro, en la parte amino terminal, es altamente conservado y crítico para la actividad de la proteína (Laskowski & Kato, 1980; Major & Constabel, 2008; Ma et al., 2011). Ésta lleva una región reactiva que juega un rol vital durante la formación del complejo inhibidor-enzima, que conduce a la inactivación de la proteasa. La composición de los aminoácidos del *loop* reactivo tiene una gran influencia sobre la función inhibidora (Song y Suh 1998; Major & Constabel, 2008). La localización de la proteína KTI depende de la especie vegetal y su función. Algunos miembros con un rol de defensa contra patógenos son almacenados en la vacuola (Srinivasan et al., 2009), mientras que en la especie *Cicer arietinum* KTI fue localizado en la pared celular de tejidos vasculares (Hernández-Nistal et al., 2009). En híbridos de *Populus* (*P. tremuloides* o *P. trichocarpa* x *P. deltoides*), una serie de genes que codifican para proteínas KTI son inducidos en hojas, por daño causado por herbívoros y heridas (Haruta et al., 2001; Christopher et al., 2004; Major & Constabel, 2008; Ramírez et al., 2009). Por otra parte, en garbanzo KTI es inducida por daño mecánico en los epicotilos y hojas (Jiménez et al., 2008). Philippe et al., (2009), llevó a cabo un análisis funcional y estructural de la familia génica KTI, donde se identificaron 31 genes KTI dentro del genoma de *Populus*. Según sus resultados y dentro del análisis funcional y estructural estos genes, destaca la diversidad de la familia con respecto a su tamaño, tipo de expresión, y estímulo inductor de la expresión (Ej. Insectos).

Estudios sobre la regulación (a nivel del promotor) de genes KTI son escasos. Los genes KTI contienen diferentes combinaciones de elementos en *cis* que permiten distintos patrones de expresión durante el ciclo de vida de *Glicine max* (Jofuku & Goldberg, 1989). Guerra et al., (2009) demostró que al someter álamos a estrés por Cu, el número de transcritos que codifican proteínas del tipo KTI se incrementaban significativamente (a nivel de raíces). La tasa de expresión (medida transcripcionalmente) varió 10-20 veces cuando las plantas fueron tratadas con 30 o 60 μM de Cu durante 12 o 24 h, respecto del control, sugiriendo una regulación a nivel transcripcional. Un análisis *in silico*, realizado usando la secuencia genómica de *P. trichocarpa*, sobre la región promotora (1000 pb río arriba del inicio de la transcripción) de genes con respuesta diferencial al estrés por Cu, permitió identificar una serie de elementos en *cis* asociados a distintas señales de regulación (Guerra, 2008). Entre

ellos destacó el motivo GTAC (motivo CuREs), de respuesta específica a Cu, el cual es parte del promotor del gen *KTI3*. Interesantemente, a pesar de que han sido identificados 31 genes *KTI* en álamo (Ma et al., 2011), sólo *KTI3* mostró una inducción en la expresión génica bajo condiciones de estrés por exceso de Cu en álamo (Guerra et al., 2009). También se han identificado en otras especies elementos en *cis* que participarían de la regulación de la expresión génica. Por ejemplo, en el musgo *Barbula unguiculata*, fragmentos del promotor del gen *FeSOD* clonados en fase a GUS permitieron identificar el motivo GTACT, el cual estaría actuando como un elemento en *cis* de regulación negativa en respuesta a Cu (Nagae et al., 2008). En *Neurospora crassa*, se identificaron dos elementos de respuesta a Cu (CuREs; CuMRTFs) en el promotor de un gen que codifica para una metalotioneína (Kumar et al., 2005).

I.9 Interacción de inhibidores de proteasa con metales pesados

A la fecha existe poca evidencia que demuestre la interacción entre IP con metales pesados. Sin embargo, estudios referidos a la aplicación de técnicas para purificar proteínas como la precipitación de metales por afinidad, ha demostrado que IP pueden ser unidos por copolímeros que contienen iones de metales (Cu, Zn o Ni) (Galaev et al., 1997; Mattiasson et al., 2007). Según Sessa et al., (1990), los inhibidores de proteasa del tipo tripsina tienen efectos deletéreos en la nutrición humana ya que pueden restringir severamente la digestión eficiente de proteínas, debido a la reducción de la actividad trípica en los fluidos duodenales. Esto ha impulsado el desarrollo de tecnologías tendientes a eliminar la actividad de este tipo de inhibidores en los alimentos procesados, a fin de favorecer un mejor aprovechamiento de las proteínas vegetales (por ejemplo, proteínas de soya). En este contexto, la aplicación del método de precipitación por afinidad de metales, utilizando copolímeros (por ejemplo, vinilimidazol con vinilcaprolactama) cargados con Cu, ha demostrado ser una alternativa efectiva para aislar específicamente y precipitar KTI de soya (Galaev et al., 1997). La unión selectiva de KTI por un copolímero podría ser el efecto de la unión entre el metal del copolímero (Cu, Zn o Ni) y los grupos donadores de electrones presentes en aminoácidos (His, Cys, Trp y Arg) de las proteínas (Mattiasson et al., 2007). Resultados similares han sido

observados mediante la aplicación de cromatografía de afinidad por iones metálicos inmovilizados para la purificación de KTI a partir de extractos de soya y papa, donde los métodos llevados a cabo utilizan Zn unido a una matriz de alginato o de ácido hidroxámico de pectina (Liu et al., 2005).

En plantas se han identificado genes de inhibidores de proteasa, así como proteínas de este tipo, que responden la presencia de metales pesados, o que inclusive se unirían a este tipo de elementos (Guerra et al., 2015). Snowden et al., (1995) reportó la inducción de putativos genes inhibidores de proteasa del tipo Bowman-Birk: *wali3* y *wali5*, en raíces trigo (*Triticum aestivum*) cuando éstas fueron sometidas a estrés por Cd, Fe, Zn, Cu, galio (Ga), indio (In) y lantano (La). Taylor et al., (2002) identificó una proteína de unión a zinc (CVZBP) en el xilema del limón (*Citrus jambhiri*), la cual demostró tener más del 50% de similitud con algunos miembros de la familia KTI. Dentro de la secuencia aminoacídica de CVZBP, se encontraron 7 residuos de Cys y 4 de His, lo cual podría estar relacionado con la unión a metales pesados. Según estos autores, como las MT, la proteína CVZBP también tiene la capacidad para unir otros cationes divalentes como Cd, Pb, y Ni, dado que posee un alto contenido de grupos tioles, sugiriendo su posible unión a metales. Además, la secuenciación del extremo N-terminal de la proteína demostró tener un 52% de identidad con un inhibidor de tripsina de papaya y otros inhibidores de proteasa del tipo Kunitz de soya. Años más tarde, un grupo de investigadores realizó un perfil de expresión en plantas de maíz (*Zea mays*) estresadas por aluminio (Al), permitiendo identificar genes de IP del tipo Bowman-Birk, los cuales fueron inducidos al momento del estrés (Cançado et al., 2008). Células cultivadas de coptis (*Coptis japonica*), mostraron tolerancia a varios compuestos tóxicos como el Cd. Esta capacidad, fue dada por la expresión del gen *CjBBI*, un gen de la familia de IP del tipo Bowman-Birk. La inducción de la expresión de *CjBBI* por el tratamiento con Cd, sugiere que *CjBBI* es responsable de dicha tolerancia (Shitan et al., 2007).

En levaduras, se reportó la inducción de tolerancia a estrés por metales (Cd y Hg) mediante la expresión ectópica de inhibidores de proteasas del tipo serina en *Pichia pastoris*. Esta expresión ectópica bajo condiciones de estrés condujo a la inhibición de proteasas, como

las metacaspasas, mediante el mecanismo de inhibición competitiva, bloqueando el acceso del sustrato GAPDH al sitio activo, evitando la muerte celular programada (Joshi et al., 2014). La expresión heteróloga de *PdKTI3* en cepas mutantes de *S. cerevisiae* sensibles a metales (*cup2Δ*, *zrc1Δ*, *ycf1Δ* y *smf1Δ*), permitió la complementación del fenotipo confiriendo tolerancia a los metales Cu y Cd (Guerra et al., 2015).

I.10 KTI y metales pesados en álamos

La inducción de genes *KTI3* ha sido observada en álamos sometidos a estrés por metales pesados. Guerra (2008) observó una inducción simultánea de *KTI3* en todas las condiciones de estrés aplicadas, y además en genotipos de álamo con niveles de tolerancia contrastantes, como es el caso de *P. deltoides* (tolerante a Cu), en comparación a *P. trichocarpa x maximowiczii x P. maximowiczii* (sensible a Cu), lo que sugiere un rol general de respuesta al exceso de Cu.

Por otro lado, el tratamiento de plantas de álamo con Cd provocó la inducción de varios genes que codifican proteínas vinculadas, generalmente, en respuesta a estrés biótico. Entre éstas, se encuentran las proteínas inhibidoras de tripsina del tipo Kunitz, específicamente *KTI3*, la cual se ha observado que también aumentó significativamente luego del estrés por Cd (Kieffer et al., 2008).

Recientemente, Guerra et al., (2015) obtuvieron el modelo molecular de *PdKTI3* (**Fig. 2**). En él se identificaron dos putativos sitios de unión a Cu^{+2} . El primer sitio (sitio 1) está compuesto por los residuos aminoacídicos His 27, Glu 29 e His 92. Su estructura optimizada muestra un posible sitio de unión a Cu^{+2} , coordinado por la cadena lateral de ambas His. Por su parte, el segundo sitio (sitio 2) está compuesto por los residuos Ser 70, Met 72 y Ser 73. Su estructura optimizada revela que los tres aminoácidos estarían coordinando la unión a Cu^{+2} . Estos resultados sugieren que la proteína *PdKTI3* posee dominios estructurales específicos de unión a Cu (Guerra et al., 2015).

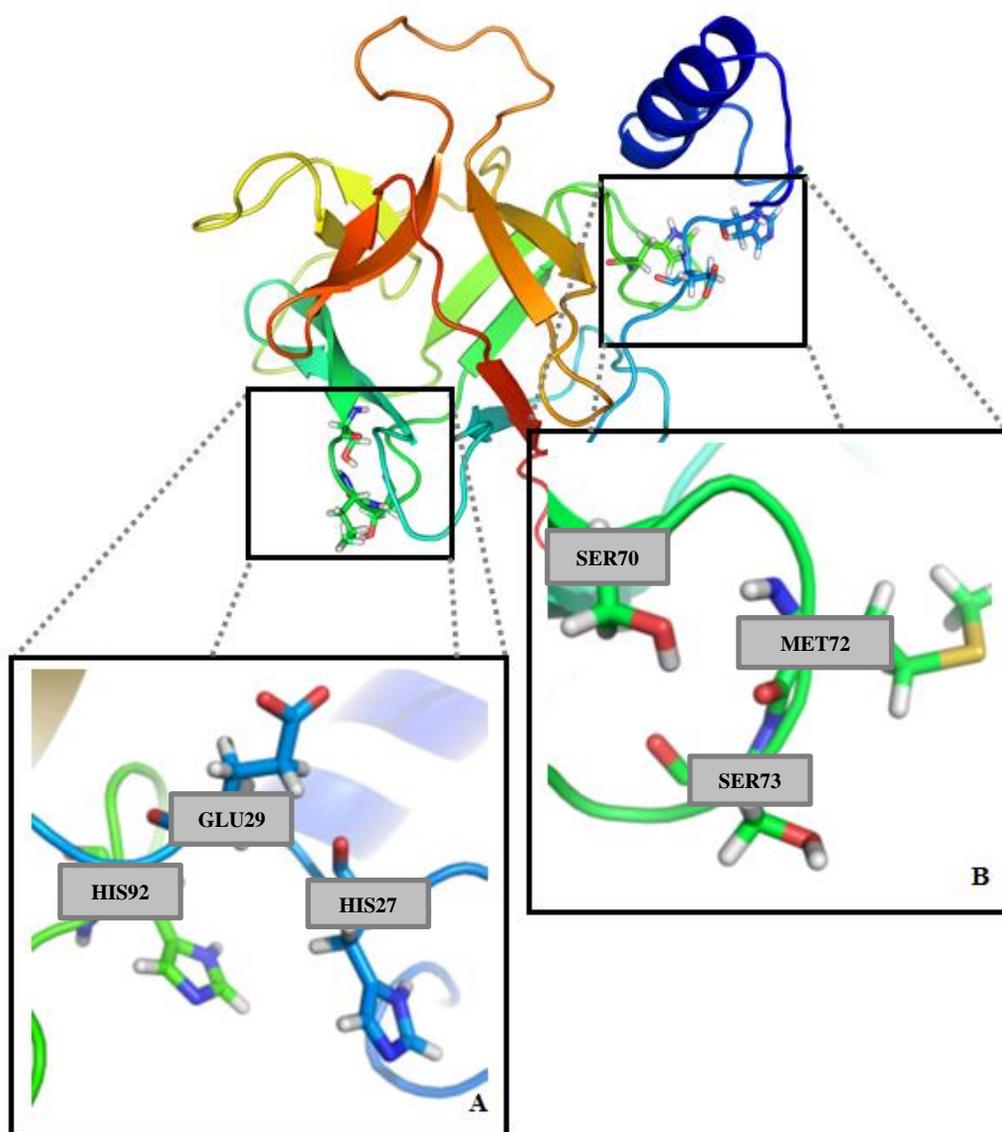


Figura 2. Modelo tridimensional de PdKTI3. (a) Estructura modelada. (b) Vista detallada de los motivos de unión a Cu predichos (His27-Glu29-His92 y Ser70-Met72-Ser73 en el cuadrado izquierdo y derecho, respectivamente (Guerra et al., 2015).

HIPÓTESIS DE TRABAJO

Antecedentes:

(1) El Cu es un elemento esencial para el crecimiento de las plantas. Sin embargo, puede llegar a ser tóxico cuando se presenta en exceso. (2) Las plantas poseen mecanismos para evitar el efecto negativo del exceso de Cu. (3) Los inhibidores de proteasa son proteínas multifuncionales, asociadas a estrés biótico, y recientemente abiótico. (4) El gen *PdKTI3*, que codifica un inhibidor de proteasa, es inducido en plantas de álamo bajo estrés por Cu. (5) Se han descrito dos putativos sitios de unión a Cu en la proteína PdKTI3, sugiriendo una capacidad de interacción entre la proteína y el metal.

Hipótesis:

“La expresión de PdKTI3 en sistemas heterólogos sensibles a Cu, confiere tolerancia al metal mediante la capacidad para unir Cu y compartimentalizarlo en la vacuola.”

OBJETIVOS

Objetivo general:

Analizar funcionalmente el gen *PdKTI3*, y el rol de la proteína codificada, en la tolerancia a exceso de Cu.

Objetivos específicos:

- 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.
3. - Establecer la localización subcelular de la proteína codificada por *PdKTI3*.

II. METODOLOGÍA

II.1 Clonación de *PdKTI3*

II.1.1 Material vegetal

El material vegetal utilizado para la aislación de DNA correspondió a hojas de un clon de *P. deltoides* (accesión 21002), colectadas del banco de germoplasma del Centro Tecnológico del Álamo (Universidad de Talca, Talca, Chile).

II.1.2 Diseño de partidores

Para el diseño de partidores se utilizó la secuencia genómica de *P. trichocarpa*, disponible en la base de datos Phytozome (<http://www.phytozome.net/>), lo que permitió obtener la secuencia actualizada del ORF de *PtKTI3*. Para ello, se empleó el software Vector NTI®, y la región codificante de *PdKTI3* fue amplificada a partir de DNA genómico de *P. deltoides*, con los partidores 5'-ATGAAGATCACTAACTTTCTAGTGC-3' (*forward*) y 5'-CATCATTTTATACTCGATTTTAGAA-3' (*reverse*), utilizando la enzima Taq DNA Polimerasa Platinum® High Fidelity (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

II.1.3. Clonación

Los fragmentos obtenidos a partir de la reacción de PCR fueron separados por electroforesis en gel de agarosa al 1%, en buffer de Tris, acetato y EDTA (TAE) 1X. Las bandas visualizadas en el gel fueron cortadas con un bisturí y el DNA extraído del gel mediante el sistema EZNA Elution gel Kit (Omega Bio-Tek). Los fragmentos purificados fueron ligados al vector pGEM®-T Easy Vector System (Promega). Los plásmidos recombinantes fueron utilizados para transformar la cepa bacteriana DH5α de *Escherichia coli*, según el método descrito por Sambrook et al., (1989). Las bacterias fueron seleccionadas en placas LAXI. DNAp fue extraído de las colonias positivas, mediante el sistema de minipreparación de plasmidios EZNA (Omega Bio-Tek), para comprobar la presencia del gen mediante una reacción de PCR, utilizando los partidores indicados en el punto anterior. Posteriormente, la secuenciación del gen de interés de las colonias recombinantes fue llevada a cabo a través del servicio de secuenciación de Macrogen (Korea).

II.2 Generación y evaluación de plantas de *A. thaliana* transformadas con el gen *PdKTI3*

Plantas transgénicas de *A. thaliana*, que expresaron constitutivamente el gen *PdKTI3*, fueron producidas con el objetivo de evaluar los efectos de la expresión heteróloga de dicho gen en la tolerancia a Cu.

II.2.1 Diseño de partidores

Para el diseño de partidores se utilizó la secuencia actualizada del ORF de *PtKTI3* de *P. trichocarpa* (Phytozome; <http://www.phytozome.net/>) y el software Vector NTI®. La región codificante de *PdKTI3* fue amplificada a partir de DNA genómico de *P. deltoides*. Adicionalmente, los partidores *forward* y *reverse* diseñados fueron flanqueados por los sitios de restricción de las enzimas XbaI y SacI, adquiriendo la siguiente secuencia: 5'-ATCTAGAATGAAGATCACTAACTTTCTAGTGC-3' y 5'-AGAGCTCTTACATCATTTTATACTCGATTTTAGAA-3', respectivamente. Estos sitios de restricción permitieron la posterior clonación del gen en el vector binario pBI121.

II.2.2 Amplificación y ligación de *PdKTI3*

La región codificante de *PdKTI3* fue amplificada mediante PCR con los partidores diseñados, visualizada en un gel de agarosa (1%) y purificada utilizando el sistema Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega). La reacción de ligación del producto de PCR con el vector pGEM®-T fue llevada a cabo según las instrucciones del sistema pGEM®-T Easy Vector System (Promega).

II.2.3 Transformación de células de *E. coli*, secuenciación y clonación en el vector pBI121.

Células competentes de la cepa DH5α de *E. coli* fueron transformadas con los plásmidos recombinantes, según el método descrito por Sambrook et al., (1989). Las bacterias fueron seleccionadas en placas LAXI. DNAp de las colonias transformantes fue extraído mediante el sistema de minipreparación de plásmidos EZNA (Omega Bio-Tek), para comprobar la presencia del ORF (open reading frame) de *PdKTI3*. Ello fue realizado mediante una reacción de PCR, utilizando los partidores diseñados previamente. La correcta

inserción del transgen de las colonias positivas fue corroborada a través de secuenciación (Macrogen, Corea). Una vez confirmada la inserción de PdKTI3, éste fue liberado desde el vector pGEM®-T por digestión enzimática con *XbaI* y *SacI* (New England BioLabs). El vector binario pBI121 fue digerido con las mismas enzimas, con el objetivo de insertar el gen *PdKTI3*, y reemplazar al gen *GUS*, permitiendo su expresión bajo la dirección del promotor CaMV 35S.

II.2.4 Obtención de plantas transgénicas de *A. thaliana*.

El vector binario pBI121, recombinado con la construcción *CaMV 35S ::PdKTI3*, fue introducido mediante electroporación en la cepa de GV3101 de *A. tumefaciens* (Sambrook and Russell, 2001). Las bacterias transformadas fueron crecidas y seleccionadas en medio YM sólido con los antibióticos de selección rifampicina (100 mg/l), gentamicina (25 mg/l) y kanamicina (50 mg/l). Luego de 48 h de incubación a 28 °C, las colonias transformadas positivamente fueron analizadas por PCR. Las bacterias recombinantes fueron utilizadas para transformar plantas de *A. thaliana*, del ecotipo Columbia-0. Este genotipo ha sido descrito previamente como un ecotipo sensible a Cu (Murphy & Taiz, 1995). La transformación fue llevada a cabo por medio del método de inmersión de yemas florales (“*floral dip*”), siguiendo el protocolo descrito por Clough & Bent (1998). Para ello, como primera etapa, una colonia transformante única fue cultivada como pre inóculo, en 5 ml de medio YEB líquido (0,1% p/v de extracto de levadura, 0,5% p/v de extracto de carne, 0,5% p/v de peptona, 0,5% p/v de sacarosa y 0,05% p/v de MgSO₄·7H₂O, pH 7), complementado con los antibióticos de selección, durante 24 h a 28 °C. Posteriormente, este cultivo fue utilizado para inocular 500 ml de medio YEB líquido. Luego, las células fueron centrifugadas a 5000 rpm por 5 min. A continuación, el sedimento bacteriano fue resuspendido en igual volumen de medio de infiltración (5% p/v de sacarosa, 2,2 g/l de MS y 0,02% v/v de Silwet L77). La transformación consistió en sumergir durante 5 s las inflorescencias de *Arabidopsis* en estado de pre-antésis en medio de infiltración. Luego de un período de 4 semanas, las semillas producidas por las plantas transformadas fueron cosechadas y desinfectadas con una solución de hipoclorito de sodio (2% p/v, con Tween-20) durante 20 min, y luego lavadas 5 veces con agua estéril, bajo cámara de flujo laminar. La selección de las líneas transformantes T₀ fue realizada mediante

la siembra de las semillas desinfectadas en medio MS sólido, suplementado con los antibióticos kanamicina (50 mg/l) y cefotaxima (250 mg/l). Las placas con semillas fueron mantenidas bajo fotoperiodo de 16 h luz y 8 h de oscuridad, considerando una temperatura de 22° C. Una vez germinadas y crecidas durante 42 días, las plantas fueron utilizadas para la extracción de ácidos nucleicos, los cuales fueron utilizados para confirmar la presencia del transgen (mediante PCR sobre DNA genómico), así como para evaluar sus niveles de transcritos (mediante qPCR). Las semillas generadas por las plantas T₀ fueron sembradas nuevamente en medio de selección con los mismos antibióticos, con la finalidad de obtener plantas T₁. Éstas fueron mantenidas bajo las mismas condiciones de fotoperíodo, con el fin de inducir la floración, producir nuevas semillas y hasta obtener una tercera generación (T₃) de plantas transformantes. Con las plantas T₃ se realizó un ensayo de germinación, con el fin de evaluar la homocigosidad del transgen. De las plantas homocigotas se seleccionaron las tres líneas que presentaron una expresión diferenciada para *PdKTI3*.

II.2.5 Determinación del largo radicular en plantas transgénicas de *A. thaliana* bajo estrés por Cu, como un indicador de tolerancia al estrés.

Una vez obtenidas las plantas T₃ homocigotas, un ensayo *in vitro* de estrés por exceso de Cu fue realizado para evaluar el efecto del exceso de Cu sobre plantas que expresaron constitutivamente el gen *PdKTI3*. Esta etapa se llevó a cabo siguiendo el protocolo desarrollado por Martínez-Trujillo et al., (2013). Para ello, las semillas colectadas de las plantas T₃ fueron germinadas verticalmente, en placas cuadradas, las que contenían medio MS sólido sin modificar (Paul et al., 2001; Dubrovsky & Forde, 2012). Las condiciones ambientales en esta etapa consideraron una temperatura de 22° C, un fotoperíodo de 18 h luz y 6 h oscuridad, y una humedad relativa del 70%. Estas condiciones fueron logradas mediante la utilización de una cámara de crecimiento BINDER KBWF-720. Luego de 7 días las plantas fueron extraídas del medio de cultivo y se les midió el largo de la raíz primaria, variable considerada como indicador de la tolerancia al estrés por Cu (Murphy & Taiz, 1995). Luego de ello, las plántulas fueron transferidas a placas con medio MS sólido, suplementado con 0 (control), 50 y 75 µM de CuSO₄ (Drażkiewicz et al., 2004; Martínez-Trujillo et al., 2013). Las plántulas se mantuvieron bajo estos tratamientos durante 7 días adicionales,

tiempo después del cual fueron removidas del medio y nuevamente se les midió el largo de la raíz primaria. Con ambas mediciones del largo de raíz (antes y después del tratamiento de estrés) se estimó un valor para el incremento (Δ) del largo radicular post estrés. Para dicha estimación se consideró al menos tres réplicas por tratamiento, considerando 5 plántulas por cada réplica. Adicionalmente, se colectó hojas y raíces de las plántulas ensayadas, las cuales fueron congeladas en nitrógeno líquido, y mantenidas a -80°C hasta la realización de análisis transcripcionales posteriores, mediante qPCR. Dichos análisis consideraron la evaluación de la inducción de genes marcadores de estrés oxidativo (Drażkiewicz et al., 2004). El primero de ellos correspondió al gen *CSD1* que codifica para una superóxido dismutasa (Cu/Zn SOD) citosólica, la cual participa en la desintoxicación de los radicales superóxido (Andrés-Colás et al., 2013). Cu/Zn SOD es parte de la defensa antioxidante en la célula, inducida por factores externos como estrés por metales pesados. En ensayos de *Arabidopsis*, la expresión del gen *CSD1* ha sido fuertemente inducida bajo condiciones de estrés por exceso de Cu, sugiriendo un papel como indicador de estrés (del Pozo et al., 2010; dos Reis et al., 2018). El segundo gen marcador, correspondió al gen *CCS*, que codifica para una proteína chaperona de Cu, el cual también fue inducido bajo condiciones de estrés por exceso de Cu en plantas de *Arabidopsis* (Del Pozo et al., 2010). Los valores de expresión relativa fueron normalizados utilizando el gen de expresión constitutiva *F-box* (Remans et al., 2008). Los resultados fueron analizados mediante ANOVA de dos vías y una prueba de comparación múltiple (test de Tukey), mediante el software R versión 3.1.2 (R Core Team, 2014).

II.2.6 Ensayo de tinción con NBT

La técnica de tinción histoquímica con NBT (Grellet & Díaz-Ricci, 2011) fue utilizada con el objetivo de evaluar cualitativamente la acumulación de radicales superóxido, producidos por el estrés por Cu, en las plantas de *A. thaliana* transformadas con el gen *PdKTI3*. Para esto, se germinaron al menos 5 semillas de cada genotipo, incluyendo plantas *wild-type* y plantas representantes de las tres líneas transgénicas T₃ (las mismas líneas utilizadas en los ensayos anteriores). Estas semillas fueron sembradas en medio MS sólido, dispuesto en placas cuadradas, en orientación vertical. Las condiciones de germinación consideraron nuevamente un fotoperíodo controlado, con 18 h luz y 6 h oscuridad. Luego de

7 días, las plántulas fueron trasplantadas a placas con medio MS, con 0 (control) y 75 μM de CuSO_4 (Drażkiewicz et al., 2004; Martínez-Trujillo et al., 2013). El efecto de la presencia del metal sobre las plántulas fue evaluado 7 días post estrés. Ese ensayo consideró al menos tres réplicas biológicas por genotipo y tratamiento de estrés. La detección cualitativa de los radicales superóxido en las plántulas ensayadas fue realizada incubándolas en *buffer* fosfato (NaH_2PO_4 1M; Na_2HPO_4 1 M; Hepes 200 mM; NBT 0,1%), bajo oscuridad, durante 2 h, según el protocolo de Grellet & Díaz-Ricci (2011).

II.3 Modelamiento y simulación del efecto del reemplazo de aminoácidos en la estructura de PdKTI3.

Con el objetivo de evaluar la funcionalidad de los sitios de unión a Cu de la proteína PdKTI3, predichos *in silico* por Guerra et al., (2015), la técnica de mutagénesis sitio-dirigida fue utilizada para generar mutaciones puntuales en los nucleótidos que codifican los aminoácidos que conforman dichos sitios de unión. De esta manera se buscó impedir la unión de la proteína con el ion Cu. Esto permitió evaluar el grado de tolerancia a este metal que presentan las cepas de levaduras que expresan heterológamente el gen *PdKTI3A*. Con este propósito, como primer paso se realizó un modelamiento *in silico* de la proteína PdKTI3 “mutada”. Con el fin de evaluar posibles cambios generados en su estructura tridimensional, se llevó a cabo un alineamiento estructural entre la estructura tridimensional de la proteína PdKTI3 mutada y no mutada (nativa).

II.3.1 Modelamiento

La estructura refinada de PdKTI3, predicha por Guerra et al., (2015), fue utilizada como templatado para construir el modelo estructural de PdKTI3 con aminoácidos diferentes a los presentes en la estructura nativa. La estructura con las mutaciones: His de la posición 27 mutada por Ala (H27A); Glu de la posición 29 mutado por Val (E29V); His de la posición 92 mutada por Ala (H92A); Ser de la posición 70 mutada por Ala (S70A); Met de la posición 72 mutada por Val (M72V); Ser de la posición 73 mutada por Ala (S73A), fue generada usando el software VMD (Humphrey et al., 1996), con el complemento VMD Mutator

(Versión 1.3). La sustitución por Ala y/o Val, mediante estudios de mutagénesis sitio-dirigida, es una alternativa efectiva para revelar la función de otros aminoácidos, que poseen mayor peso molecular, mayor volumen o polaridad. Además, ambos residuos presentan un carbono beta, distinto a otros aminoácidos pequeños como Gly o Pro, que evita la alteración de la estructura tridimensional de la proteína por imposición de efectos estereo o electroquímicos muy importantes (Lefèvre et al., 1997). Se consideró el menor número de cambios posibles de nucleótidos para codificar el codón de interés, es decir, se seleccionó aquel codón que al menos tuviera un nucleótido en común con el aminoácido original. Por ejemplo, en el sitio 1 para el caso de His 92, su codón correspondiente en la secuencia ORF de PdKTI3 es CAC. El aminoácido correspondiente para la mutación de His 92 es Ala 92, el cual posee cuatro codones que lo codifican: GCU, GCC, GCA y GCG. Por lo tanto, de éstos el codón seleccionado para diseñar el partidor mutagenizado es el codón GCC, ya que es el único mantiene al menos un nucleótido del codón original (nucleótido subrayado).

II.3.2 Simulación

La estructura proteica mutada fue solvatada en una caja periódica con moléculas de agua TIP3P pre-equilibradas, mediante el complemento VMD Solvate (versión 1.5). Luego fue ionizada con 15 mM de iones Cl^- y Na^+ (concentración promedio del contenido normal de cloruro y sodio en el citoplasma de células de *Arabidopsis*), y neutralizada utilizando el complemento VMD Autoionize (versión 1.3), ya que proporciona un medio rápido y fácil de hacer que la carga neta del sistema sea cero al agregar los iones de cloro y sodio al solvente. Todo esto permite mantener un sistema ideal para mantener condiciones fisiológicas celulares similares a las normales (pH 7; pH citoplasmático). A continuación, el efecto de las mutaciones sobre PdKTI3 fue evaluado mediante una minimización energética y equilibrio termodinámico, realizadas en el software NAMD (Phillips et al., 2005), con el campo de fuerzas de CHARMM27 (MacKerell et al., 1998). El algoritmo de gradientes conjugados fue utilizado para aumentar gradualmente la temperatura, a lo largo de 12.000 pasos de minimización, optimizando energéticamente la estructura inicial. Esto fue seguido de 20 ns de dinámica molecular a 298° K, en condiciones isotérmica-isobáricas. El sistema final fue comparado y analizado respecto de la estructura no mutada, utilizando el complemento

RMSD calculator (Coutsias et al., 2004) de VMD (versión 1.0) (Humphrey et al., 1996). Las características espaciales de los aminoácidos de ambas proteínas fueron evaluadas a través de un gráfico de Ramachandran, mediante el uso del software PROCHECK (Laskowski et al., 1993). Las características energéticas fueron a analizadas con el software ANOLEA (Melo et al., 1997).

II.4 Mutagénesis sitio-dirigida, clonación en pYES2/CT y transformación de *S. cerevisiae*.

Una vez que se corroboró que las mutaciones puntuales de los aminoácidos que constituyen los sitios de unión a Cu, no generaron cambios en la estructura tridimensional de la proteína, se realizó una aproximación experimental utilizando la técnica de mutagénesis sitio-dirigida como se describe a continuación.

II.4.1 Diseño de partidores con mutaciones puntuales

Los partidores utilizados fueron diseñados manualmente dependiendo de la posición de los nucleótidos que componen el sitio de unión a Cu predichos por Guerra et al., (2015). Cada partidior *forward* incluyó las mutaciones de los nucleótidos que codifican para los aminoácidos del sitio 1 (S1): HIS27-GLU29-HIS92 y del sitio 2 (S2): SER70-MET72-SER73, los cuales fueron reemplazados por los aminoácidos ALA27-VAL29-ALA92, y por ALA70-VAL72-ALA73, respectivamente. Los partidores fueron fosforilados en el extremo 5' y diseñados según las indicaciones del sistema Thermo Scientific Phusion Site-Directed Mutagenesis Kit (Thermo Scientific). La secuencia nucleotídica de los partidores utilizados se detalla en la Tabla 2.

Tabla 2. Partidores utilizados para generar mutaciones puntuales en el gen *PdKTI3*. Los nucleótidos mutados están escritos en negrita y subrayados.

Sitio	Aminoácido reemplazado	Sentido	Secuencia	Largo (pb)
1	HIS27-GLU29	<i>Forward</i>	CGTGCCGTT <u>GCT</u> GCT <u>GTA</u> GCAGTGAT	26
		<i>Reverse</i>	AGGAAATATTGAAGTTGCCGTGAAGGCAA	29
	HIS92	<i>Forward</i>	ACAGTGTCATC <u>GCC</u> GAAGACAGTAAT	26
		<i>Reverse</i>	CGTTGGATTCTACAACCTGGTGAAAATATT	29
2	SER70-MET72-SER73	<i>Forward</i>	GTTTCCTT <u>GCT</u> CC <u>AGTGGCC</u> AATGGACT	29
		<i>Reverse</i>	ATCTGAATTGCATATGATACGGCTGGAAGT	30

II.4.2 Reacción de mutagénesis y ligación del producto de PCR

La región codificante de *PdKTI3*, clonada en el vector pGEM®-T Easy Vector System (Promega), fue amplificada mediante PCR con los partidores mencionados en la Tabla 1, utilizando la enzima Phusion Hot Start DNA Polimerasa (2U/μL) (Thermo Scientific). Se realizaron diversas reacciones de PCR que permitieron amplificar los sitios de unión a Cu en conjunto o individualmente, obteniéndose tres plásmidos con las mutaciones puntuales. Además, se consideró la amplificación del gen *PdKTI3* sin mutar, como control positivo. Los fragmentos amplificados fueron visualizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% en buffer TAE 1X. El producto de PCR fue circularizado en una reacción de 5 min utilizando la enzima T4 DNA ligasa (Thermo Scientific). El protocolo de amplificación

y la enzima T4 DNA ligasa utilizados fueron los provistos por el sistema Thermo Scientific Phusion Site-Directed Mutagenesis Kit (Thermo Scientific).

II.4.3 Transformación y secuenciación de células de *E. coli*

Los plásmidos con las mutaciones puntuales fueron utilizados para transformar la cepa DH5 α de *E. coli*. Las bacterias fueron seleccionadas en placas con medio LB y el antibiótico de selección ampicilina (100 μ g/mL). De las colonias positivas se extrajo DNAP, según lo indicado en II.1.3, con el fin de comprobar la presencia del gen mediante una reacción de PCR utilizando los partidores con las mutaciones deseadas ya diseñados. El DNAP de las colonias que poseían el gen *PdKTI3* mutado, fue secuenciado a través del servicio de secuenciación de Macrogen (Korea). El análisis de las secuencias mutadas fue realizado con Vector NTI® Software-Thermo Fisher Scientific, lo que permitió corroborar la correcta mutación puntual en cada caso.

II.4.4 Diseño de partidores para clonación en vector de expresión en levaduras

Los partidores *forward* y *reverse* utilizados para purificar los fragmentos clonados desde pGEM®-T, y posteriormente clonarlos en el vector de expresión de levaduras, fueron flanqueados por los sitios de restricción de las enzimas *KpnI* y *NotI*: 5'-GGGGTACCATGAAGATCACTAACTTTCTAGTGC-3' y 5'-GGGCGGCCCGCTTACATCATTTTATACTCGATTTTAGAA-3', respectivamente. Los sitios de restricción adicionales permitieron la clonación de las secuencias en pYES2/CT. Los fragmentos obtenidos a partir de la reacción de PCR fueron visualizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%, en buffer TAE 1X.

II.4.5 Clonación en pYES2/CT

El vector pYES2/CT Yeast Expression (Invitrogen), es un vector de expresión en *S. cerevisiae* que se caracteriza por poseer el gen *URA3* para selección en levaduras, y el promotor inducible por galactosa GAL1. Los fragmentos amplificados a partir de DNAP de *PdKTI3*, mutados en el sitio 1, sitio 2, ambos sitios a la vez, y sin mutar, fueron ligados con la enzima T4 DNA Ligasa (New England BioLabs) al vector pYES2/CT. La correcta ligación

fue corroborada mediante digestión enzimática con las enzimas *KpnI* y *NotI*, de acuerdo a protocolo del fabricante.

II.4.6 Transformación de células competentes de *S. cerevisiae*

Para la expresión heteróloga se consideró la cepa mutante *cup2Δ* de *S. cerevisiae*, sensible a Cu, disponible en Euroscarf (www.uni-rankfurt.de/fb15/mikro/euroscarf/) bajo el número de acceso YGL166W. Esta cepa se caracteriza por ser sensible a Cu, es decir, no es capaz de crecer en medios suplementados con este metal, debido a que no codifica una proteína de unión a DNA (activada por este metal), que a su vez regula la expresión de MT (Buchman et al., 1989). Adicionalmente, se utilizó una cepa *wild-type* BY4741 como control. Las células competentes *wild-type* y *cup2Δ*, fueron transformadas con el vector de expresión pYES2/CT vacío (sin PdKTI3), constituyendo un control positivo y negativo, respectivamente. Además, se transformó la cepa *cup2Δ* con el gen *PdKTI3* (a) sin mutar (PdKTI3), (b) mutado en el sitio 1 (PdKTI3S1Δ), (c) mutado en el sitio 2 (PdKTI3S2Δ) y (d) mutado en ambos sitios a la vez (PdKTI3S1S2Δ), generando seis transformaciones. Todas las transformaciones se hicieron según el sistema S.c EasyComp™ Transformation Kit (Invitrogen), considerando 1 μg de DNAP para cada construcción. Las células transformantes fueron crecidas en placas con medio SC con galactosa 2%, 0.67% Yeast nitrogen base w/o AA (USBiological), y 0.07% -Ura DO Supplement (Clontech). La presencia del transgen fue corroborada mediante PCR.

II.5 Ensayo de estrés por Cu en levaduras

Primeramente, con el propósito de determinar si la proteína PdKTI3 está asociada a tolerancia a Cu, se realizó un ensayo de estrés en *S. cerevisiae* sometidas a altas concentraciones de CuSO₄, con el objetivo de comparar la tolerancia al estrés entre la cepa *wild-type* transformada con el vector de expresión pYES2/CT vacío, y la cepa mutante *cup2Δ* expresando el gen *PdKTI3* sin mutar. Se consideró también la cepa *cup2Δ* transformada con el vector vacío, como control negativo. Para esto, las levaduras fueron crecidas en medio líquido SC con 2% de galactosa, con el fin de inducir el promotor GAL1 y activar la

transcripción del gen de interés, y con 0.07% de -Ura DO Supplement para selección de las levaduras. La OD fue estandarizada a 1 para las tres líneas transformantes, las cuales fueron sembradas en spots (2 μ l) en diluciones seriadas (10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3}), en placas con medio SC (2% galactosa, 0.07% -Ura DO Supplement) sin metal (control), y con 60 μ M, 100 μ M, 500 μ M, 1 mM, 2 mM, 3 mM y 4 mM de CuSO_4 . El Cu fue aplicado como CuSO_4 en solución de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ a 0.5g/L. Las placas fueron incubadas por 72 h a 28 °C.

Para los ensayos de evaluación funcional de los sitios de unión a Cu mutagenizados en PdKTI3, en levaduras mutantes sensibles a este metal (*cup2 Δ*) descritas en el punto II.4.6, se consideraron las mismas condiciones de crecimiento, siembra e incubación descritas en el ensayo anterior, no así la concentración de Cu utilizada, ya que para las seis líneas transformantes fue de 60 μ M CuSO_4 .

II.6 Cinética de crecimiento de levaduras

Una cinética de crecimiento de las cepas de *S. cerevisiae* transgénicas fue realizada para evaluar cuantitativamente su desempeño en medio SC con diferentes concentraciones de Cu. Para este ensayo se consideraron las siguientes cepas: (a) *wild-type* transformada con el vector pYES2/CT vacío, (b) mutante *cup2 Δ* transformada con el vector pYES2/CT vacío, (c) mutante *cup2 Δ* expresando el gen *PdKTI3* sin mutar, y (d) mutante *cup2 Δ* expresando el gen *PdKTI3* mutado en ambos sitios de unión a Cu. Las células fueron crecidas en medio líquido SC con galactosa 2%, 0.67% Yeast nitrogen base w/o AA (USBiological), y 0.07% -Ura DO Supplement (Clontech). Se consideró una condición control (SC), y las siguientes concentraciones de estrés: 1 mM, 2 mM y 4 mM de CuSO_4 . Estas concentraciones fueron seleccionadas considerando los resultados obtenidos en el ensayo anterior (Fig. 3), por lo que las concentraciones fueron duplicadas a partir del momento en que la cepa *wild-type* empezó a cesar su normal crecimiento. La OD fue estandarizada a 1 y se realizaron tres réplicas técnicas por cada línea de transformantes y concentración. El equipo NANOQUANT Infinite M200 PRO (Tecan) fue utilizado para incubar los cultivos líquidos en agitación y medir la

OD, cada hora, durante 72 h. Los datos obtenidos fueron analizados con el software GraphPad Prism 6.

II.7 Localización subcelular de la proteína PdKTI3

La determinación de la localización subcelular de la proteína PdKTI3 se llevó a cabo mediante dos técnicas diferentes. Esta determinación fue necesaria con el fin de validar el primer resultado con una tecnología más precisa, la cual no estaba disponible al inicio del experimento. La primera, fue mediante experimentos de expresión transitoria en células epidermales de catáfilo de cebolla, sin considerar marcadores sub celulares. Por su parte, la segunda aproximación fue mediante experimentos de agroinfiltración en hojas de tabaco, en la cual la localización de la proteína fue determinada mediante la co-localización con marcadores subcelulares de membrana plasmática, retículo endoplasmático, golgi, vacuola y mitocondria. Las transformaciones obtenidas con ambas técnicas fueron visualizadas en un microscopio confocal (Sistema Zeiss- LSM-510).

II.7.1 Determinación de la localización subcelular de PdKTI3 en catáfilos de cebolla

II.7.1.1 Diseño de partidores

La determinación de la localización subcelular de la proteína PdKTI3 se llevó a cabo mediante la fusión de ésta a la proteína GFP. Los partidores fueron diseñados de tal forma de introducir el gen *PdKTI3* en la inserción en la orientación amino y carboxilo del gen *GFP*, en el vector de localización pAM1 (derivado de los vectores pGreen0029 y pA7-GFP [Ryngajllo et al., 2011]). Para la inserción en el extremo amino de GFP, los partidores utilizados fueron 5'- ACTCGAGATGAAGATCACTAACTTTCTAGTGC-3' (*forward*) y 5'-ATCCATGGCCATCATTTTATACTCGATTTTAGAA-3' (*reverse*), a los cuales se les adicionó los sitios de restricción para las enzimas *XhoI* y *NcoI*, respectivamente. Adicionalmente, para el partidore *reverse*, el codón de término fue eliminado. Para la inserción en la orientación carboxilo de GFP, se diseñaron los partidores 5'- ATCTAGAAATGAAGATCACTAACTTTCTAGTGC-3' (*forward*) y 5'-

AGGATCCTTACATCATTTTATACTCGATTTTAGAA-3' (*reverse*), a los cuales se les adicionó los sitios de restricción para las enzimas *XbaI* y *BamHI*, respectivamente. Los partidores fueron diseñados utilizando el software Vector NTI® Software-Thermo Fisher Scientific. De este modo, se generaron dos proteínas de fusión: PdKTI3:GFP y GFP:PdKTI3, las cuales fueron empleadas para transformar células competentes de *E. coli*.

II.7.1.2 Amplificación y ligación al vector de localización

La región codificante de *PdKTI3* fue amplificada a partir del gen *PdKTI3* ya clonado en el vector pGEM®-T Easy Vector System (Promega), con los partidores diseñados, descrito en el punto II.1.2. Luego, visualizada en un gel de agarosa (1%) y purificada utilizando los sistemas Wizard® SV Gel y PCR Clean-Up System (Promega). Los fragmentos purificados fueron ligados al vector pAM1, utilizando el sistema de recombinación mediante enzimas de restricción *XhoI/NcoI*, y *XbaI/BamHI*. Las células de la cepa bacteriana DH5α de *E. coli* fueron transformadas con los plásmidos recombinantes, según el método descrito por Sambrook et al., (1989). Las bacterias fueron seleccionadas en placas con medio LB y el antibiótico de selección kanamicina (50 mg/L). Para comprobar la presencia del gen, DNAp de las colonias transformantes fue extraído mediante el sistema de minipreparación de plásmidos EZNA (Omega Bio-Tek). Este DNAp fue amplificado mediante una reacción de PCR utilizando, los partidores ya diseñados, y digerido con las enzimas *XhoI-NcoI* y *XbaI-BamHI*, según la inserción en el vector, para corroborar la correcta inserción del gen en el vector.

II.7.1.3 Transformación de catáfilos de cebolla

Las construcciones que codificaban las proteínas de fusión fueron purificadas y utilizadas para transformación transitoria de células epidermales de cebolla, mediante el bombardeo de partículas. Como control, se utilizó el vector pAM1 vacío (expresando GFP de forma constitutiva). Se empleó partículas de oro de 1.0 μm (Bio-Rad, USA), cubiertas con el DNAp conteniendo las construcciones de interés. Para esto, a las partículas de oro (1,5 mg) disueltas en 50 μl de agua, previamente sonicadas, se les agregó (mediante agitación por vortex constante): 5 μl de DNAp (1 μg/μl), 50 μl de CaCl₂ 2.5 M y 20 μl del antibiótico

espermidina (0.1 M; Sigma). El sobrenadante fue removido y las partículas fueron lavadas con 140 µl de etanol 70%, luego con 140 µl de etanol 100%, y finalmente resuspendidas en 48 µl de etanol 100%. Esta última solución fue utilizada para cargar cuatro discos *macrocarrier*. Previo al bombardeo, las láminas epiteliales de cebolla fueron colocadas en placas petri con medio MS (sin sacarosa) durante 4 h. El bombardeo se llevó a cabo con un cañón Bio-Rad PDS 1000/He, con disco de ruptura de 1350 psi y bajo una presión de vacío de 25 pulgadas de Hg. Después del bombardeo, las placas con el tejido epidermal fueron selladas e incubadas en oscuridad por 24 h a 22 °C. El proceso de recubrimiento de las partículas de oro y el bombardeo se realizó según las instrucciones del fabricante (Particle Delivery System-BIO-RAD). Se consideraron cuatro réplicas para cada construcción, y la fluorescencia emitida por GFP fue visualizada mediante microscopía confocal (Sistema Zeiss- LSM-510).

II.7.2 Determinación de la localización subcelular de *PdKTI3* en hojas de tabaco

II.7.2.1 Diseño de partidores

Los partidores fueron diseñados según el sistema de clonación Gateway® (Invitrogen), específicamente de acuerdo a las instrucciones del kit pENTR™/SD/D-TOPO® Cloning (Invitrogen). Así, los partidores 5'-CACCATGAAGATCACTAACTTTCTAGTGC-3' (*forward*) y 5'-CATCATTTTATACTCGATTTTAGAA-3' (*reverse*) permitieron amplificar los fragmentos de *PdKTI3* clonados desde pGEM®-T, y posteriormente clonarlos en el vector pENTR/SD/D-TOPO.

II.7.2.2 Amplificación y ligación de *PdKTI3*

La región codificante de *PdKTI3* fue amplificada con los partidores indicados en el punto anterior, visualizada en un gel de agarosa (1%) y purificada utilizando los sistemas Wizard® SV Gel y PCR Clean-Up System (Promega). La reacción de ligación del producto de PCR con el vector pENTR/SD/D-TOPO fue llevada a cabo según las instrucciones del kit pENTR™/SD/D-TOPO® Cloning (Invitrogen).

II.7.2.3 Transformación de células competentes de *E. coli* y secuenciación

Las células de la cepa DH5 α de *E. coli* fueron transformadas con los plásmidos recombinantes, según el método descrito por Sambrook et al., (1989). Las bacterias fueron seleccionadas en placas con medio LB y kanamicina (50 mg/l). El DNAp fue extraído desde las colonias transformantes mediante el sistema de minipreparación de plásmidos EZNA (Omega Bio-Tek). La presencia del plásmido fue comprobada mediante una reacción de PCR, utilizando los partidores ya indicados. La correcta inserción del transgen fue corroborada a través de secuenciación del DNAp extraído de las colonias transformantes.

II.7.2.4 Purificación vectores de co-localización y destinación

El vector pK7FWG2 fue utilizado como vector de destinación Gateway para ser recombinado con *PdKTI3* (Karimi et al., 2002). Su regulación génica está dada por el promotor CaMV 35S y la emisión fluorescente por la proteína eGFP. Se utilizaron los siguientes vectores marcadores de organelo: membrana plasmática, pm-rk, retículo endoplasmático, ER-rk, Golgi, G-rk, vacuola, vac-rk, y mitocondria, mt-rk (Nelson et al., 2007). Todos estos vectores contenían la proteína roja fluorescente mCherry, y fueron adquiridos en el *Arabidopsis Biological Resource Center* de la *Ohio State University*. Todos los vectores fueron purificados mediante minipreparaciones de plásmidos utilizando el KIT EZNA (Omega Bio-Tek).

II.7.2.5 Recombinación *PdKTI3* con el vector de destinación y transformación de *Agrobacterium tumefaciens*.

El vector de entrada pENTR/SD/D-TOPO fue recombinado al vector de destinación pK7FWG2, con la enzima Gateway® LR Clonase®, según las indicaciones del proveedor (Invitrogen). Luego, se procedió a transformar químicamente la cepa GV1303 de *A. tumefaciens* (Xu & Li, 2008) con el DNAp del vector recombinado, y con cada vector de localización subcelular: pm-rk, ER-rk, G-rk, vac-rk y mt-rk. Además, se consideró el vector pK7FWG2 vacío como control. Las bacterias transformadas fueron crecidas y seleccionadas en medio YM sólido (0,04% p/v de extracto de levadura, 1% p/v manitol, 1,7 mM NaCl, 0,8 mM MgSO $_4$ •7H $_2$ O, 2,2 mM K $_2$ HPO $_4$ y 1,5% p/v de agar), con los siguientes antibióticos:

rifampicina (100 mg/l), gentamicina (25 mg/l) y kanamicina (50 mg/l). Para el medio en el que se cultivó las bacterias con el vector vacío pK7FWG2 y el vector con el gen *PdKTI3* se utilizó espectinomicina (50 mg/l), en vez de kanamicina. Luego de 48 h de incubación a 28 °C, las colonias transformadas positivamente fueron analizadas por PCR. Para el caso del vector recombinado expresando *PdKTI3* se utilizó los partidores mencionados en el punto 2.6.1. Los fragmentos amplificados fueron visualizados en gel de agarosa al 1%.

II.7.2.6 Agroinfiltración de hojas de tabaco

La localización subcelular de la proteína PdKTI3 fue realizada mediante expresión transitoria en hojas de tabaco (*Nicotiana benthamiana*). Para ello, las bacterias (*A. tumefaciens*) transformadas con las siete construcciones: vector pK7FWG2 vacío (control), expresando *PdKTI3* de manera constitutiva, y los cinco marcadores subcelulares mencionados en el punto anterior, fueron cultivadas durante 48 h a 28 °C en medio líquido LB, con los antibióticos rifampicina (100 mg/l), gentamicina (25 mg/l), y kanamicina (50 mg/l). Para las bacterias con el vector vacío pK7FWG2 y para el vector con el gen *PdKTI3* se utilizó espectinomicina (50 mg/l). Posteriormente, las células fueron centrifugadas a 5000 rpm por 10 min, luego de lo cual el sedimento bacteriano fue resuspendido en un tercio del volumen con el medio de infiltración (agua destilada estéril). Hojas de plantas de tabaco de 12 semanas fueron agroinfiltradas por su cara abaxial, utilizando una jeringa de 1 ml (NIPRO), la cual contenía el medio de infiltración con la construcción respectiva. Cada experimento fue realizado en triplicado, a fin de identificar el mismo patrón de fluorescencia. Luego de 48 h, las células fueron visualizadas y documentadas en un microscopio confocal (Sistema Zeiss- LSM-700 AxioObserver). Para ello, se utilizaron dos filtros: (i) para la fluorescencia de eGFP, longitud de onda de excitación de 488 nm, y (ii) para mCherry, longitud de onda de excitación de 568 nm. El objetivo del microscopio confocal con el cual se obtuvieron las imágenes fue un Fluar 40x/1.30 Oil M27. El análisis de las imágenes se llevó a cabo con el software ZEN2010.

III. RESULTADOS

III.1 PdKTI3 mejora la tolerancia a Cu en una cepa mutante de *S. cerevisiae* sensible a este metal.

Con el objetivo de comparar la tolerancia de la cepa *wild-type* de *S. cerevisiae*, frente a la cepa mutante *cup2Δ* complementada con *PdKTI3*, en condiciones de estrés por Cu, se realizó un ensayo considerando su exposición a concentraciones de estrés, en un rango de 60 μM a 4 mM de CuSO_4 . Los resultados obtenidos son mostrados en la **Fig. 3**. En la condición control, las levaduras con las tres construcciones evaluadas crecieron sin problemas, dada la ausencia de Cu en el medio (**Fig. 3 a-c**). A medida que se adicionó CuSO_4 al medio, la cepa de levadura mutante transformada con el vector vacío cesó su crecimiento (**Fig. 3 c**), mientras que las cepas correspondientes a las otras dos construcciones (**Fig. 3 a-b**) crecieron de forma similar hasta 100 μM de CuSO_4 . Para el caso de la cepa *wild-type*, a 500 μM de CuSO_4 se observa un menor crecimiento en la dilución 10^{-3} (**Fig. 3 a**), al igual que en 1 mM de CuSO_4 , en comparación con la cepa mutante complementada con el gen *PdKTI3* (**Fig. 3 b**). La concentración de Cu limitante para el crecimiento de la cepa *wild-type* fue 2 mM CuSO_4 (**Fig. 3 a**), mientras que la concentración limitante para el crecimiento de la cepa mutante complementada con el gen *PdKTI3* fue de 4 mM CuSO_4 .

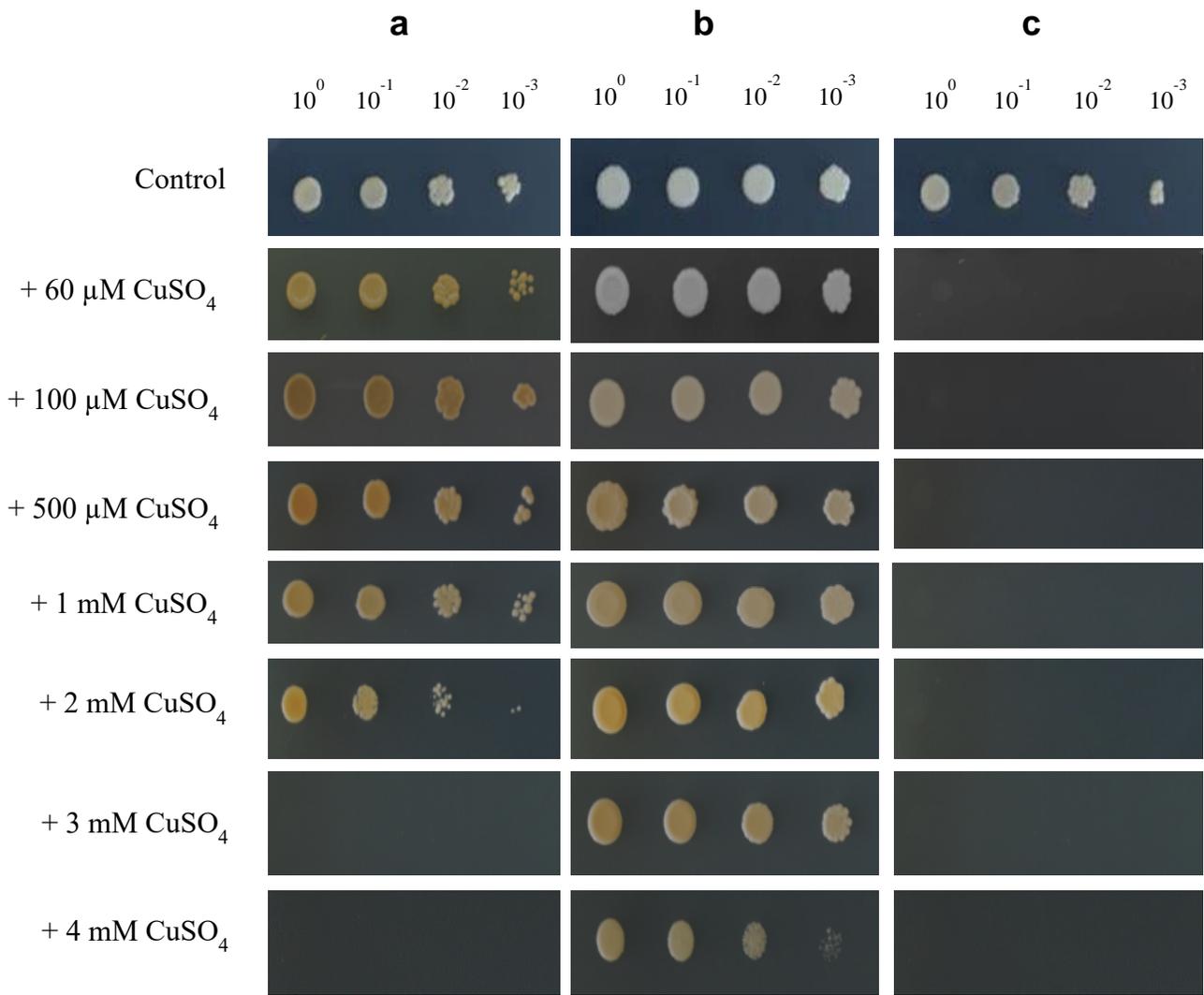


Figura 3. Evaluación del crecimiento de levaduras a diferentes concentraciones de CuSO_4 . (a) WT + pYES2/CT, (b) *cup2 Δ* + pYES2/CT-PdKTI3, (c) *cup2 Δ* + pYES2/CT. Las diluciones seriadas son mostradas bajo los valores 10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} . Las placas con las levaduras sembradas en spot fueron incubadas por 72 h a 28 °C.

III.2 PdKTI3 revierte el fenotipo sensible a Cu de una cepa mutante de *S. cerevisiae*, superando la tolerancia de la cepa *wild-type*.

Para complementar los resultados del ensayo de estrés por Cu realizados con las levaduras sembradas en medio sólido (**Fig. 3**), se realizó un ensayo de cinética de crecimiento durante 72 h a fin de realizar una evaluación cuantitativa. Los resultados obtenidos son mostrados en la **Fig. 4**. En la condición control (**Fig. 4 a**) se observó que no existieron diferencias significativas en el crecimiento de las cuatro cepas, todas alcanzaron la fase *plateau*. En tanto, en 1 mM de CuSO₄ (**Fig. 4 b**) sólo crecieron la cepa *wild-type* transformada con el vector de expresión pYES2/CT vacío, y la cepa *cup2 Δ* complementada con *PdKTI3*. Por otra parte, la cepa sensible a Cu *cup2Δ*, transformada con el vector pYES2/CT vacío, y la cepa *cup2Δ*, transformada con *PdKTI3* mutado en ambos sitios de unión a Cu (*PdKTI3S1S2Δ*), no alcanzaron la fase *log* en las tres condiciones de estrés por Cu (**Fig. 4 b-d**). Por el contrario, a 2 mM de CuSO₄ ya se observan diferencias significativas entre el crecimiento de la cepa *wild-type* transformada con el vector de expresión pYES2/CT vacío, y la cepa *cup2Δ* complementada con *PdKTI3*, alcanzando esta última una OD mayor a las 72 h (**Fig. 4c**). Para el caso de 4 mM de CuSO₄ (**Fig. 4 d**), se observa que sólo la cepa *cup2Δ* complementada con *PdKTI3* es capaz de alcanzar la fase *plateau*, a diferencia de la cepa *wild-type* que no fue capaz de crecer en las mismas condiciones.

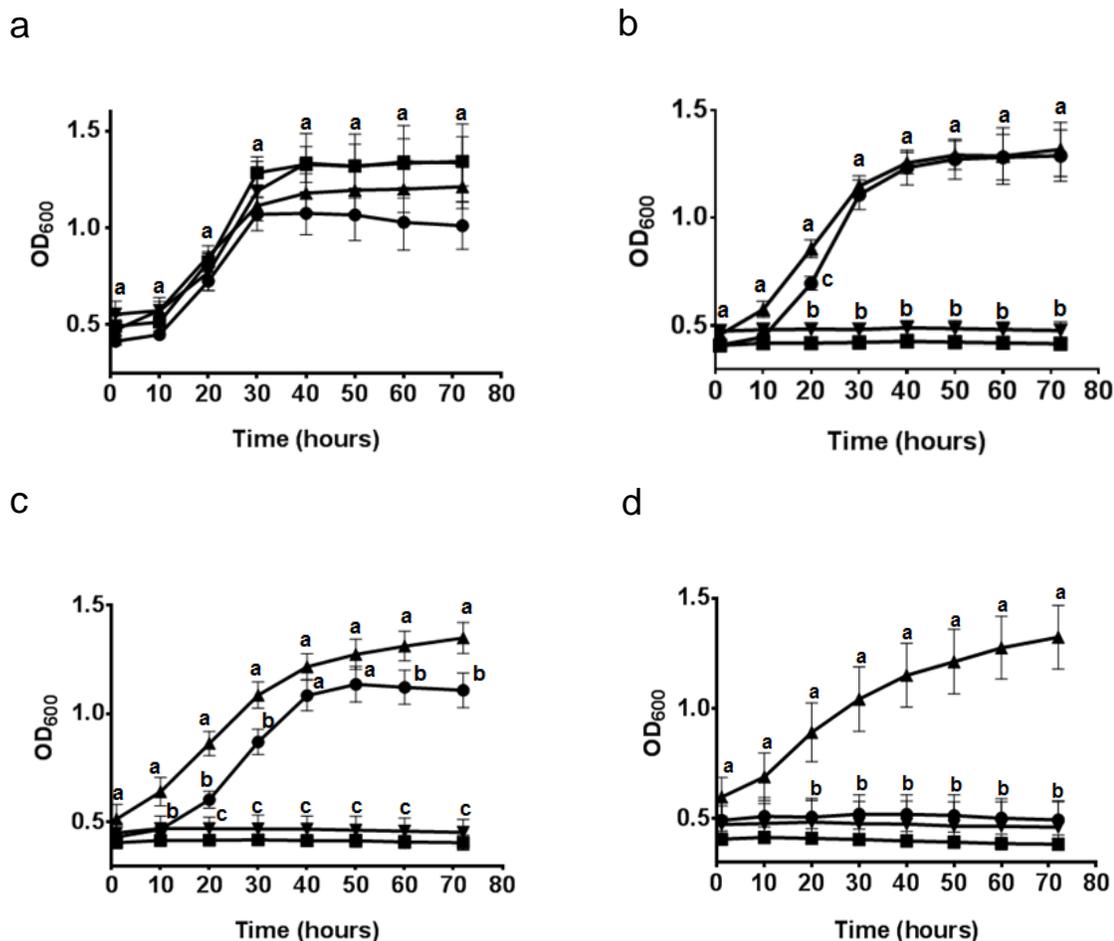


Figura 4. Cinética de crecimiento de levaduras en medio líquido, a diferentes concentraciones de CuSO₄, durante 72 h. (a) Condición control (sin Cu adicionado). (b) Condición estresante a 1 mM de CuSO₄. (c) Condición estresante a 2 mM de CuSO₄. (d) Condición estresante a 4 mM de CuSO₄. ▲ *cup2Δ* + pYES2/CT-PdKTI3; ▼ *cup2Δ* + pYES2/CT-PdKTI3S1S2Δ; ■ *cup2Δ* + pYES2/CT; ● WT + pYES2/CT. Letras distintas indican diferencia estadística significativa con valor- $p < 0,05$; test de Tukey.

III.3 La expresión heteróloga de *PdKTI3* en *A. thaliana* confiere tolerancia a exceso de Cu.

Los niveles de expresión del gen *PdKTI3*, en las plantas de *A. thaliana* transformadas sometidas a estrés por Cu, fueron evaluados. La expresión heteróloga de *PdKTI3* fue comandada por el promotor constitutivo CaMV 35S, lo que en teoría produce una expresión constante del gen, independiente de las condiciones ambientales en las cuales las plantas son ensayadas. En la **Fig. 5**, para ambas condiciones de exposición a Cu (0 [control] y 75 μ M CuSO_4) se observó una diferencia significativa en la expresión de *PdKTI3* entre el genotipo *wild-type* y las líneas transgénicas L21, L27 y L30, lo que demuestra la efectividad de la transformación con un promotor de expresión constitutiva, junto con la expresión diferenciada de *PdKTI3* en las tres líneas transgénicas seleccionadas.

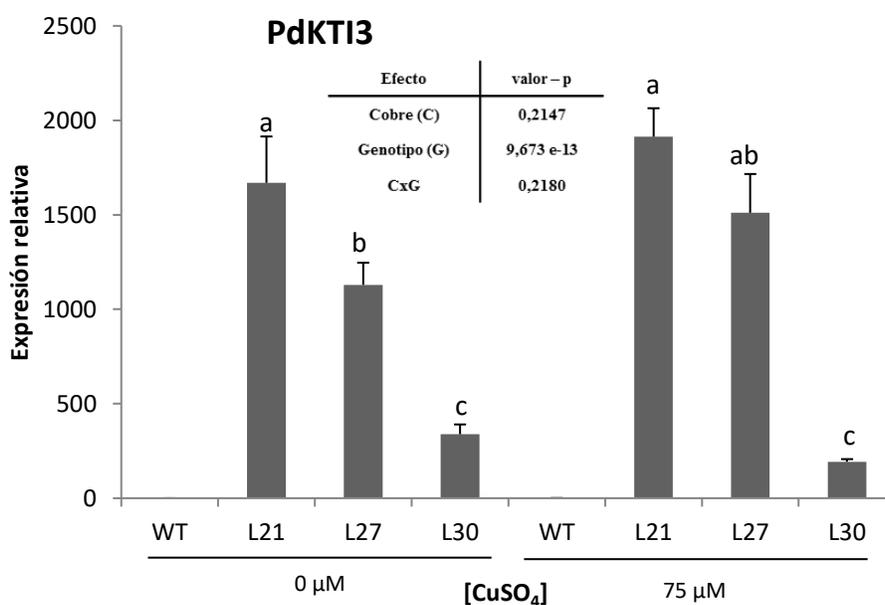


Figura 5. Expresión relativa del gen *PdKTI3* bajo condiciones de estrés por exceso de Cu en plántulas de *A. thaliana*. La abundancia relativa de los niveles de transcritos del gen fue determinada mediante qPCR utilizando cDNA de la planta completa de *Arabidopsis*. Los valores de expresión fueron normalizados con gen de expresión constitutiva *F-box*.

El rol de la proteína PdKTI3 en respuesta a estrés por Cu, fue evaluado en plantas de *A. thaliana* que expresaron constitutivamente el gen *PdKTI3*, sometidas a 50 y 75 μM CuSO_4 . En condiciones control (0 μM CuSO_4) no se observó diferencia fenotípica entre el genotipo *wild-type* y las líneas transgénicas L21, L27 y L30 (**Fig. 6 a**), ya sea en el incremento del largo radicular (de la raíz primaria), como en la biomasa foliar. Por el contrario, a 50 μM CuSO_4 sí se observaron diferencias entre los distintos genotipos. Las líneas L27 y L30 presentaron un mayor largo radicular, en comparación a la *wild-type*, y la línea L21 (**Fig. 6 b**). Este resultado se correlacionó con la cuantificación del largo radicular, en el cual a 0 μM CuSO_4 , no existieron diferencias significativas entre los cuatro genotipos evaluados, mientras que a 50 μM CuSO_4 sólo la línea L27 y L30 fueron significativamente diferentes de los otros dos genotipos (**Fig. 6 c**).

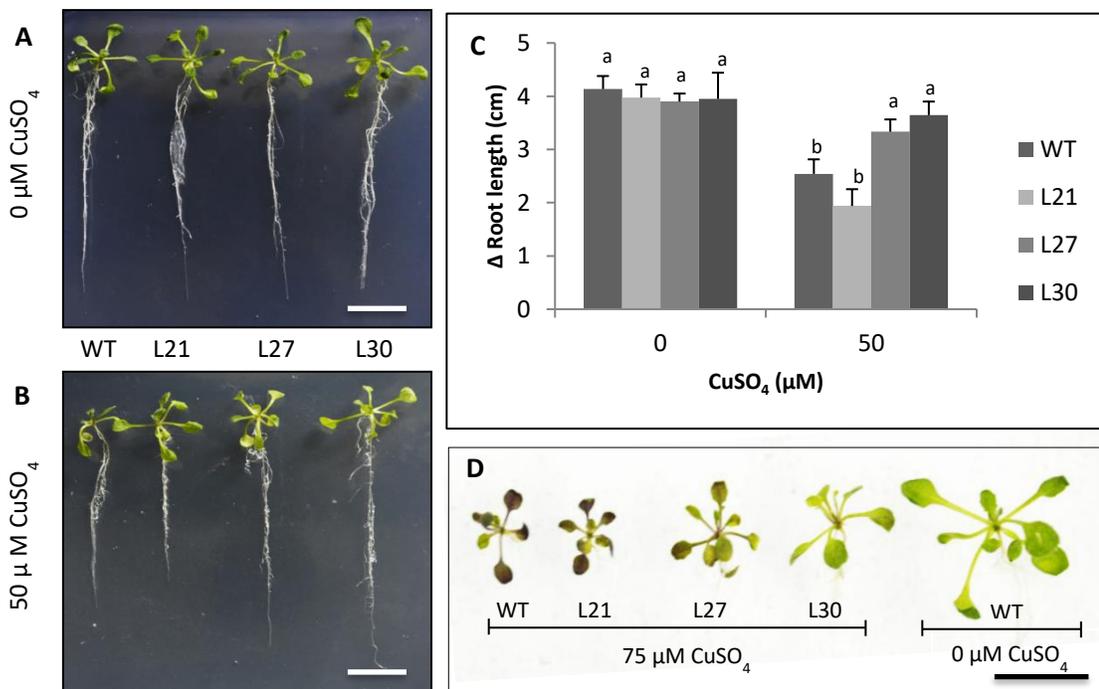


Figura 6. Efecto del CuSO_4 sobre estructuras aéreas y elongación radicular en líneas transgénicas de *A. thaliana* que expresan heterológicamente *PdKTI3*. (a) Largo raíz primaria a 0 μM CuSO_4 (control). (b) Largo raíz primaria a 50 μM CuSO_4 en plántulas de 7 días post-estrés. (c) Incremento del largo radicular (Δ) post-estrés por Cu. Para este cálculo fueron utilizadas tres replicas

biológicas para cada genotipo, provenientes de tres experimentos independientes de cada concentración de CuSO_4 . Los datos son promedio \pm D.E. Letras distintas indican diferencia estadística significativa con valor- $p < 0,05$; test de Tukey. (d) Estructuras aéreas de las plantas bajo $75 \mu\text{M}$ CuSO_4 . Las barras blancas y negras indican 1 cm de largo.

Cuando las plántulas fueron sometidas a condiciones de $75 \mu\text{M}$ CuSO_4 no se observaron diferencias en el largo radicular, sin embargo, sí en la coloración de las hojas de la roseta (**Fig. 6 d**). La línea L21 mostró un fenotipo similar al *wild-type*, sin embargo, las líneas L27 y L30 mostraron una coloración rojo-pardo menos intensa, asemejándose al genotipo *wild-type* en condiciones control (**Fig. 6 d**). A pesar del cese del crecimiento, a $75 \mu\text{M}$ CuSO_4 las plántulas continuaron su desarrollo generando abundantes raíces laterales, sobrellevando el exceso de Cu (**Fig. 7**). Notablemente, la línea transgénica L21, es la que presenta una mayor expresión de *PdKTI3*, y a la vez la que se comporta más similar al genotipo *wild type* bajo condiciones de estrés por exceso de Cu.

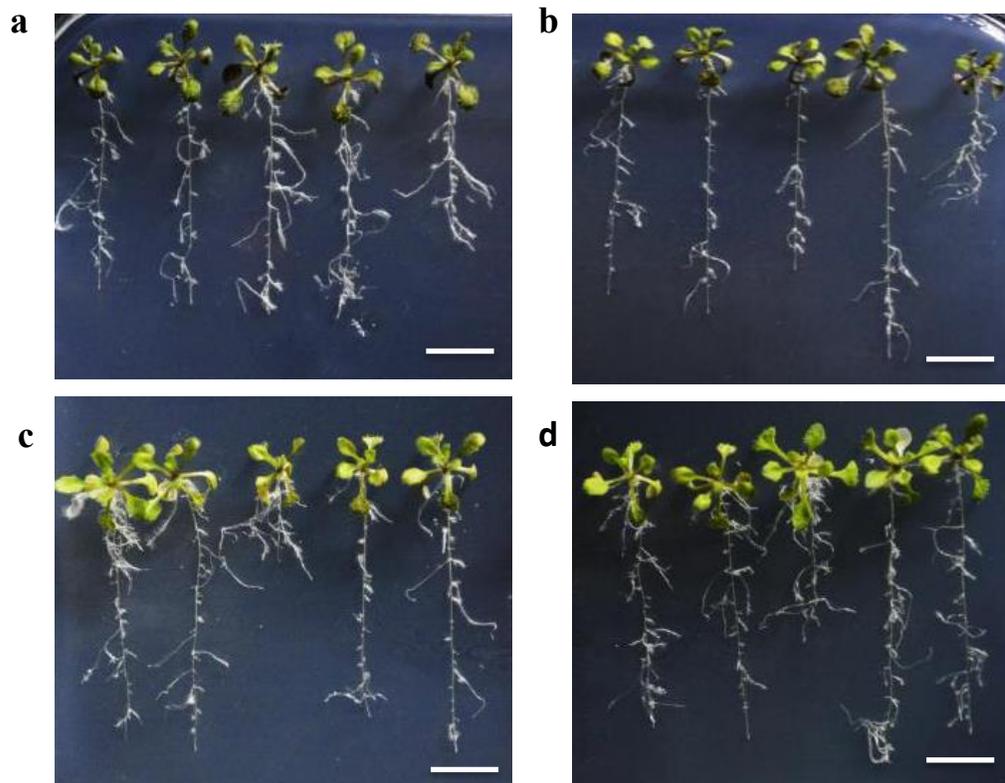


Figura 7. Efecto de $75 \mu\text{M}$ CuSO_4 en la formación de raíces laterales en *A. thaliana*. (a) Genotipo *wild-type*. (b) Línea L21. (c) Línea L27. (d) Línea L30. Las barras blancas indican 1 cm de largo.

III.4 La expresión constitutiva del gen *PdKTI3* en *A. thaliana*, disminuye la generación de radicales superóxido bajo condiciones de estrés por Cu; complementando, mediante un efecto indirecto, la maquinaria antioxidante propia de ésta.

Una detección histoquímica del radical superóxido, mediante tinción con NBT, fue realizada en las plantas transformadas, con el objetivo de evaluar la acumulación de especies reactivas de oxígeno generadas por el estrés oxidativo asociado al Cu. Los resultados son mostrados en la **Fig. 8**, en la cual se observan tres condiciones para cada genotipo: previo a la tinción, post tinción, y control. De forma previa a la tinción, en condiciones de 0 μM CuSO_4 no se observaron diferencias fenotípicas entre las plantas *wild-type* y las líneas L21, L27 y L30. Sin embargo, a 75 μM CuSO_4 existió una diferencia en biomasa y coloración foliar entre el genotipo *wild-type* y las líneas L27 y L30, siendo el genotipo *wild-type* el que presentó una menor biomasa y un mayor pardeamiento foliar. Al realizar la tinción con NBT se observó una posible acumulación de radicales superóxido, dada la generación de formazán en los tejidos (evidenciado por la coloración azul). Bajo condiciones control, 0 μM CuSO_4 , esta acumulación fue notoria para todos los genotipos, lo que indica que, tanto para el genotipo *wild-type*, como para las líneas L21, L27, y L30 existiría producción de radicales superóxido en condiciones normales. Sin embargo, bajo condiciones de estrés (75 μM CuSO_4), esta producción se redujo tanto para las tres líneas transgénicas como el genotipo *wild-type*, observándose una mínima coloración azul en los tejidos analizados. Ésto indicaría que el genotipo *wild type* posee ciertas características que le permitieron sobrellevar el estrés de una manera similar a las líneas transgénicas. Este resultado es discutido en la página 78.

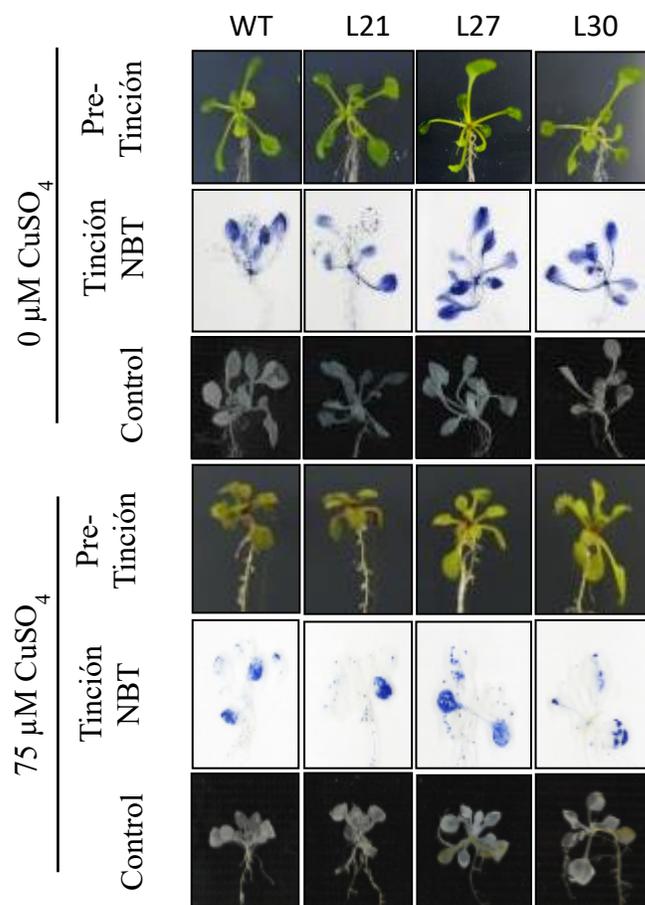


Figura 8. Evaluación cualitativa de la acumulación de radicales superóxido mediante tinción NBT bajo condiciones de estrés por exceso de cobre (75 μM CuSO_4) en *A. thaliana*. Condición control corresponde a buffer fosfato sin NBT adicionado.

La evaluación mediante tinción NBT fue complementada con el análisis de los niveles de expresión (a nivel de transcritos) de genes marcadores de estrés oxidativo.

En la **Fig. 9** se muestran los niveles de expresión del gen que codifica para la enzima superóxido dismutasa, *CSD1*, el cual fue inducido bajo condiciones de estrés por exceso de Cu. Para el genotipo *wild-type* se observó una inducción significativa de la expresión del gen a 75 μM CuSO_4 . Esta inducción se correlaciona con el fenotipo de tinción con NBT observado en la **Fig. 8**. Por el contrario, en la condición control (0 μM CuSO_4), los niveles de expresión de *CSD1* fueron significativamente menores, lo que se vio reflejado en una mayor acumulación de radicales superóxido, de acuerdo a la tinción con NBT. Para el caso de las líneas transgénicas L21, L27 y L30, la expresión del gen *CSD1* no difirió significativamente del control. Sin embargo, los niveles de expresión fueron significativamente más bajos que el genotipo *wild-type*, cuando las plantas fueron sometidas a estrés por exceso de Cu (**Fig. 9**).

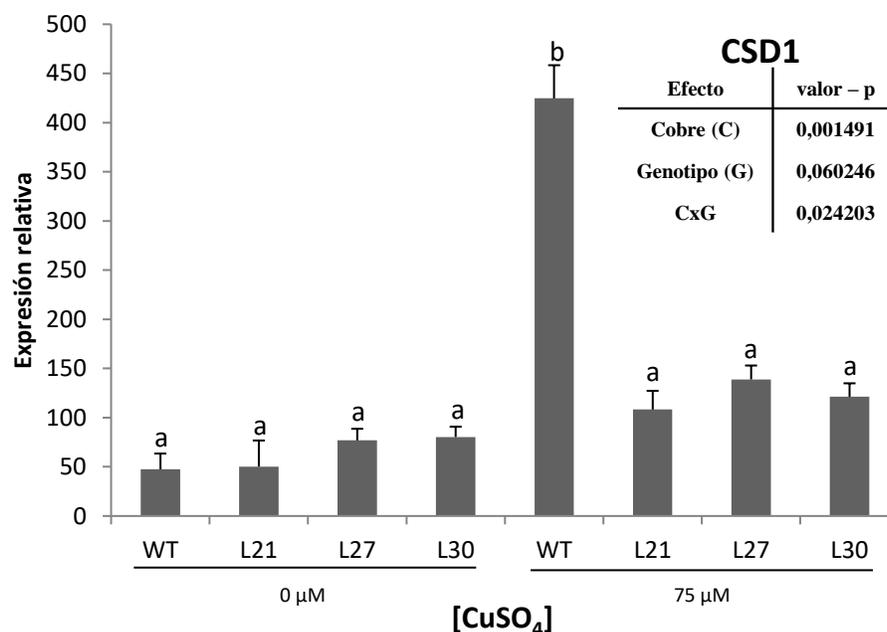


Figura 9. Expresión relativa del gen marcador de estrés oxidativo *CSD1* bajo condiciones de estrés por exceso de Cu en plántulas de *A. thaliana*. La abundancia relativa de los niveles de transcritos del gen *CSD1* se determinó mediante qPCR utilizando cDNA de la planta completa de *Arabidopsis*. Los valores de expresión fueron normalizados con gen de expresión constitutiva *F-box*.

Adicionalmente al gen *CSD1*, se evaluó la expresión del gen *CCS*, que codifica para una proteína chaperona de Cu. La **Fig. 10** muestra una inducción de la expresión del gen para el genotipo *wild-type* bajo condiciones de estrés por exceso de Cu, similar a lo ocurrido con el gen *CSD1*. De igual forma, para las líneas transgénicas L21, L27 y L30, no hubo una inducción significativa en la expresión de *CCS* entre la condición control y la de estrés. Por tanto, los genes marcadores de estrés *CSD1* y *CCS*, indican que las plantas sí presentaban una condición estresante, mostrando un mejor comportamiento frente al estrés las plantas transgénicas que la *wild type*.

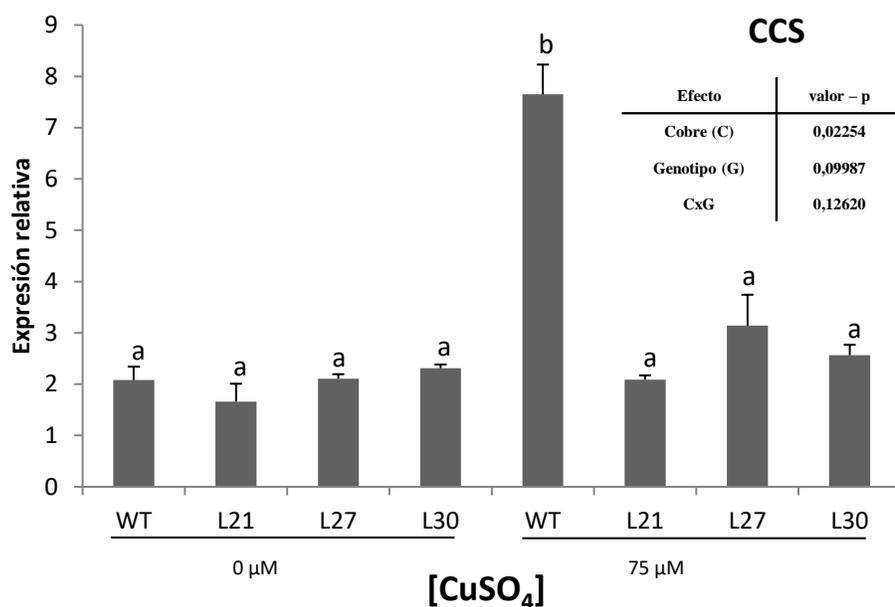


Figura 10. Expresión relativa del gen marcador de estrés oxidativo *CCS* bajo condiciones de estrés por exceso de Cu en plántulas de *A. thaliana*. La abundancia relativa de los niveles de transcritos del gen *CCS* se determinó mediante qPCR utilizando cDNA de la planta completa de *Arabidopsis*. Los valores de expresión fueron normalizados con gen de expresión constitutiva *F-box*.

III.5 El modelamiento de las proteínas mutadas en el sitio 1 y sitio 2 de PdKTI3 no altera su estructura tridimensional.

Un modelo estructural de la proteína PdKTI3, PdKTI3S1S2 Δ , considerando mutaciones en los nucleótidos correspondientes a los dos sitios de unión a Cu, fue obtenido a partir del modelo predicho por Guerra et al., (2015). El modelo generado fue sometido a una dinámica molecular de 20 ns para evaluar el efecto de ambas mutaciones en su estructura tridimensional. Este nuevo modelo es presentado junto al modelo estructural de la proteína PdKTI3 nativa en la **Fig. 11**. La mutación del sitio S1 no provocó alteraciones energéticas ni conformacionales en la proteína (**Fig. 11 b, 12 y 13**). En tanto, el sitio S2 mutado provoca una pequeña perturbación energética, centrada en los aminoácidos 73, 74 y 75. Conformacionalmente, el aminoácido 73 se encontraría impedido estereoquímicamente (**Fig. 11 c, 12 y 13**). La proteína con los sitios mutados presenta pocas regiones energéticamente desfavorables, similar por lo presentado por Guerra et al., (2015) (**Fig. 12**). Ello se refleja en el gráfico de Ramachandran, el cual revela que el 98,9% de los aminoácidos totales fueron ubicados en regiones espacialmente muy favorables o permitidas y sólo el 1,1% en regiones desfavorables (**Fig. 13**). La desviación espacial de los carbonos alfa, respecto de la proteína nativa es de 3,63 Å (RMSD). De esta manera, los resultados muestran que las mutaciones no alteraron la estructura tridimensional de PdKTI3 Δ .

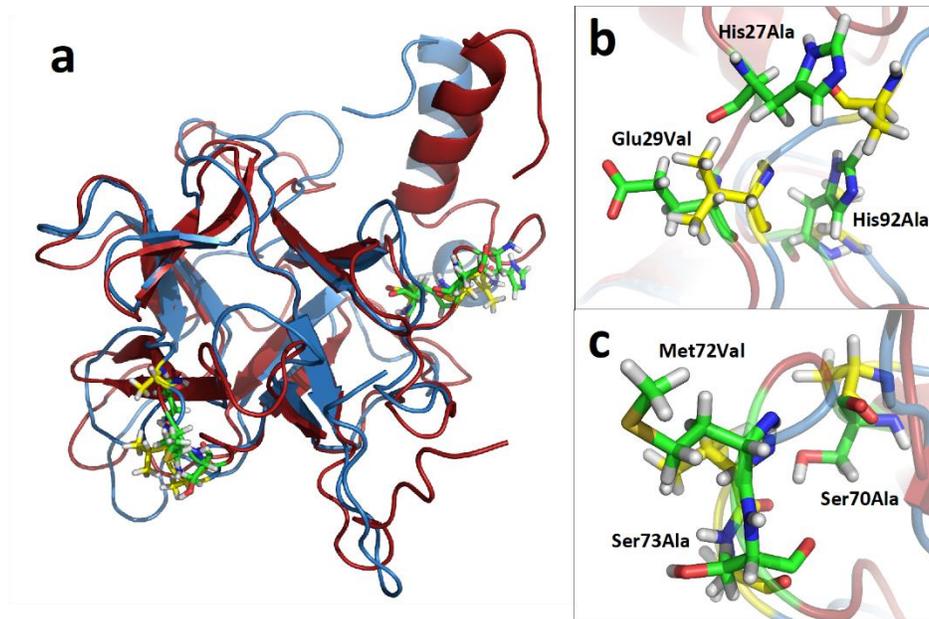


Figura 11. Modelo tridimensional de PdKTI3 incluyendo mutaciones en los nucleótidos correspondientes a los sitios de unión a Cu. (a) Alineamiento estructural entre PdKTI3 modificada (en azul) y la nativa (en rojo). Los aminoácidos reemplazados son representados en bastones amarillos, y los nativos, en verde. El Sitio 1 se ubica a la izquierda, en tanto que, el Sitio 2 a la derecha. (b) Vista detallada del Sitio 1. (c) Vista detallada del Sitio 2.

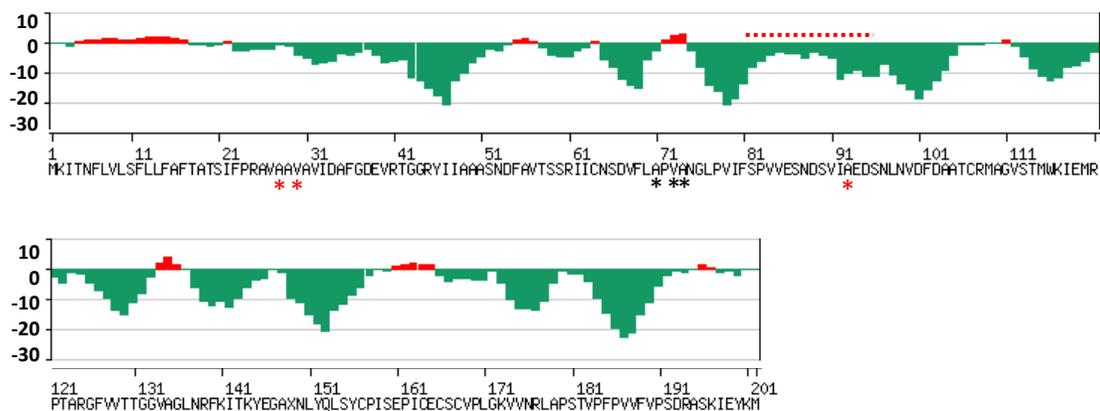
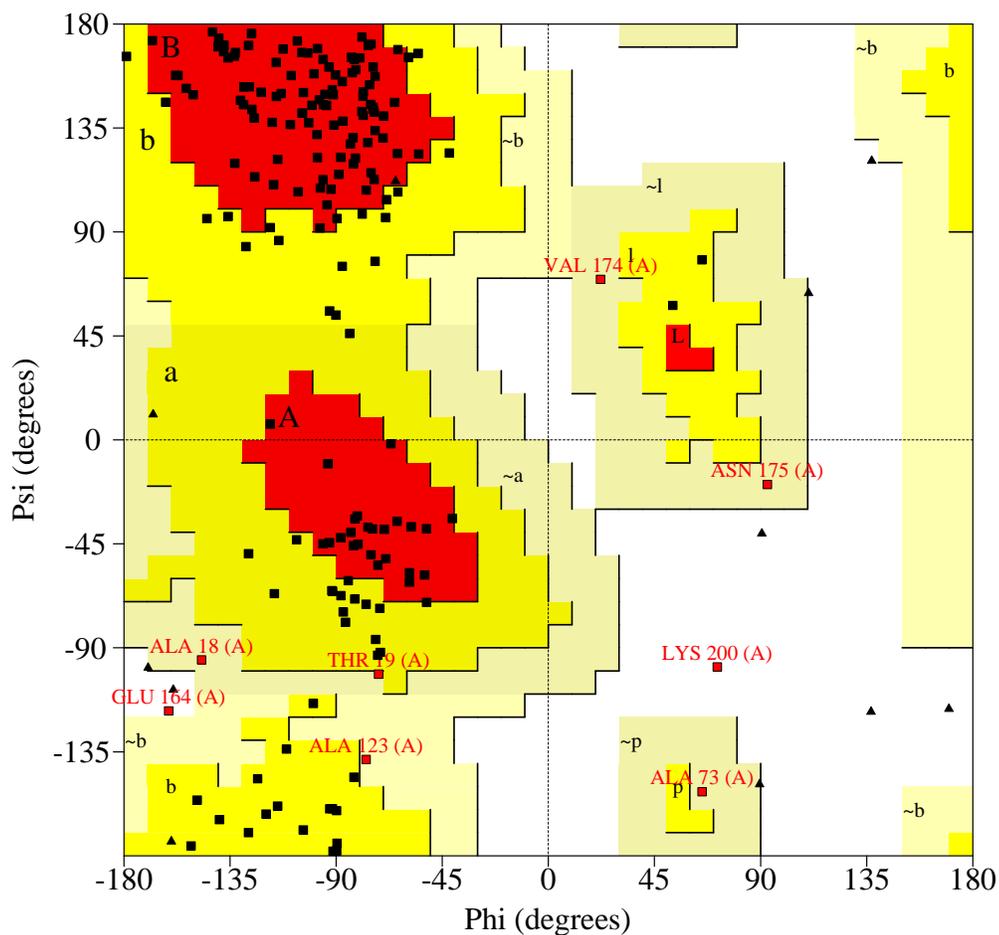


Figura 12. Gráfico de energías para cada residuo presente en el modelo molecular de PdKTI3S1S2A. La figura representa el resultado del análisis con ANOLEA. Los asteriscos rojos corresponden al sitio 1 mutado, y los negros al sitio 2 mutado. En verde, energías no enlazantes favorables, y en rojo no favorables. La línea punteada indica el sitio activo de la proteína.



Plot statistics

Residues in most favoured regions [A,B,L]	115	66.1%
Residues in additional allowed regions [a,b,l,p]	51	29.3%
Residues in generously allowed regions [~a,~b,~l,~p]	6	3.4%
Residues in disallowed regions	2	1.1%

Number of non-glycine and non-proline residues	174	100.0%
Number of end-residues (excl. Gly and Pro)	4	
Number of glycine residues (shown as triangles)	11	
Number of proline residues	12	

Total number of residues	201	

Figura 13. Gráfico de Ramachandran para PdKTI3 derivada de modelo con mutaciones. En rojo se indican las regiones de residuos más favorecidos, en amarillo y café los permitidos y en blanco los fuera de rango.

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 *S. cerevisiae*.

Con el objetivo de determinar la funcionalidad de los sitios de unión a Cu de PdKTI3, bajo condiciones de estrés por exceso de Cu, se utilizó una aproximación de mutagénesis sitio-dirigida de los nucleótidos correspondientes a los aminoácidos que componen dichos sitios de unión (Guerra et al., 2015). Para ello se utilizó la cepa mutante *cup2Δ*, sensible a Cu (Buchman et al., 1989). El crecimiento de las levaduras bajo la condición de estrés, inducida por la presencia de 60 μM CuSO₄, es mostrado en la **Fig. 14**. La cepa *wild-type* transformada con el vector de expresión vacío, fue utilizada como control positivo, creciendo en ambas condiciones. La cepa mutante *cup2Δ* transformada con el vector vacío, fue utilizada como control negativo, creciendo sólo en la condición control. Cuando la cepa mutante fue complementada con el gen *PdKTI3*, el fenotipo de la cepa *wild-type* fue recuperado, otorgando tolerancia a Cu. Por su parte, las cepas *cup2Δ* complementadas con el gen *PdKTI3*, con las mutaciones puntuales en el sitio 1 (PdKTI3S1Δ), sitio 2 (PdKTI3S2Δ), y en ambos sitios a la vez (PdKTI3S1S2Δ), no crecieron bajo estrés por Cu.

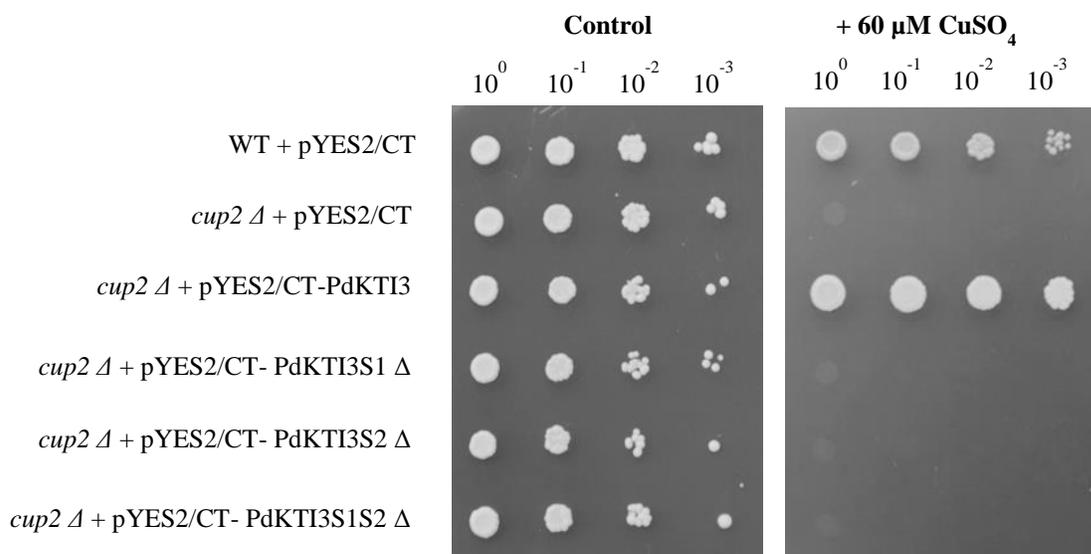


Figura 14. Evaluación funcional de los sitios de unión a Cu mutagenizados en *PdKTI3*, en levaduras mutantes sensibles a este metal (*cup2Δ*). PdKTI3S1 Δ: H92A, E29V, H27A. PdKTI3S2 Δ: S70A, M72V, S73A. PdKTI3S1S2 Δ: H92A, E29V, H27A, S70A, M72V, S73A. Las placas con las levaduras sembradas en spot fueron incubadas por 72 h a 28 °C.

III.7 PdKTI3 está localizada en el retículo endoplasmático y la vacuola.

Establecer la localización subcelular de PdKTI3 permitirá comprender de una mejor manera su posible mecanismo de acción, asociándolo a su función. Estos resultados potenciarán la caracterización de esta proteína en relación a su función con metales pesados.

Para ello, la localización de la proteína PdKTI3 fue realizada mediante dos protocolos distintos (punto 2.6). El primero, utilizó la técnica de bombardeo de partículas de oro sobre catáfilos de cebolla, con dos construcciones diferentes: con el gen *PdKTI3* insertado en el extremo amino de *GFP* (*35S::PdKTI3-GFP*) y con el gen *PdKTI3* insertado en el extremo carboxilo de *GFP* (*35S::GFP-PdKTI3*). Los resultados indicaron que la proteína podría no estar asociada a un organelo específico, y sugirieron que podría ser transportada vía retículo endoplasmático (**Fig. 15 d-f**). La presencia de un péptido señal, identificado previamente por análisis de secuencia, podría estar asociado con la formación de agregados proteicos cuando se expresó la construcción *35S::GFP-PdKTI3* (**Fig. 15 g-i**). Dado estos resultados, y con el objetivo de precisar la localización subcelular de la proteína PdKTI3, se utilizó una segunda aproximación, aplicando expresión transitoria en células epidermales de tabaco y marcadores subcelulares específicos (ver punto II.6.2). Los resultados de esta etapa indicaron que la señal de GFP se superpone con la señal de mCherry para el caso del marcador ER-rk (**Fig. 16 f**), y vac- rk (**Fig. 16 i**), lo que sugiere fuertemente que esta proteína se dirige hacia el retículo endoplasmático y a la vacuola. Cuando el marcador pm-rk fusionado a mCherry y PdKTI3-GFP se co-expresaron (**Fig. 16 c**), la fluorescencia de GFP y mCherry no se superpuso por completo, lo que sugiere que existe una asociación de la proteína a la membrana plasmática. Por otro lado, ensayos de co-localización de PdKTI3 con los marcadores mt- rk y G- rk, indicaron que no existió una superposición de señales de GFP y mCherry, lo que sugiere que esta proteína no estaría localizada ni en la mitocondria, ni el aparato de Golgi (**Fig. 17 i-l**).

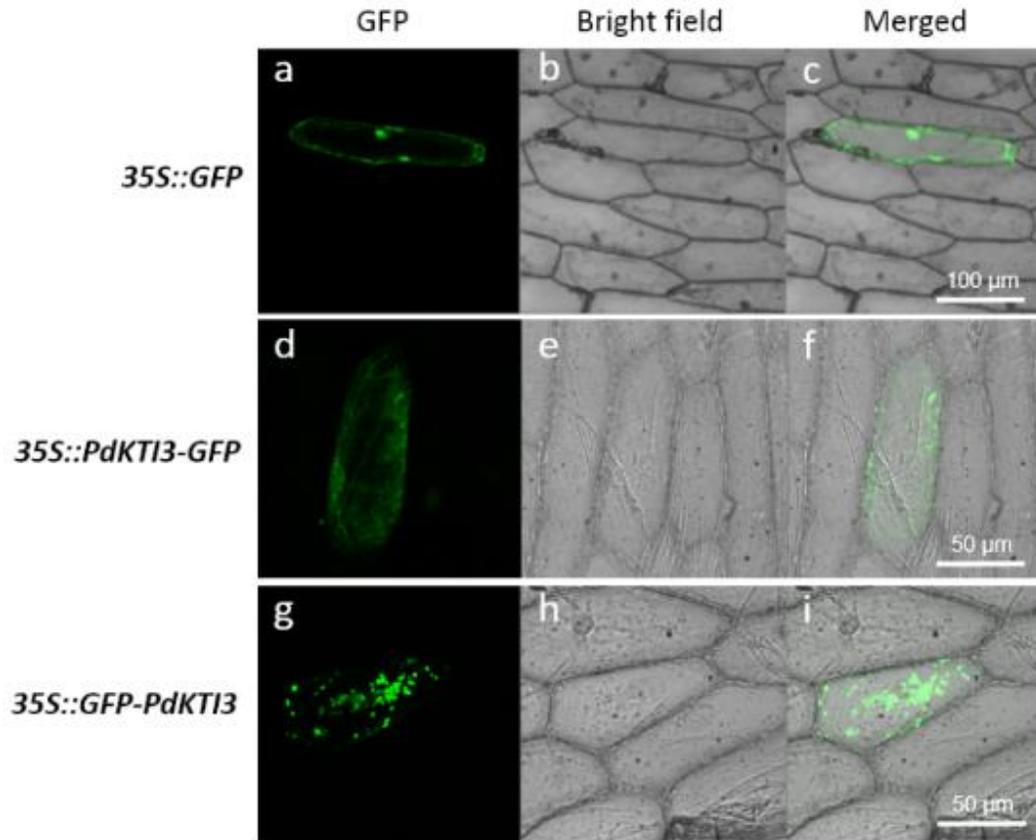


Figura 15. Expresión transiente de PdKTI3 en células epidermales de cebolla. (a-c), células transformadas con vector vacío (*35S::GFP*). (d-i), células transformadas con las construcciones *35S::PdKTI3-GFP* y *35S::GFP-PdKTI3*. Los tejidos transformados fueron analizados mediante microscopía confocal luego de 24 h del bombardeo.

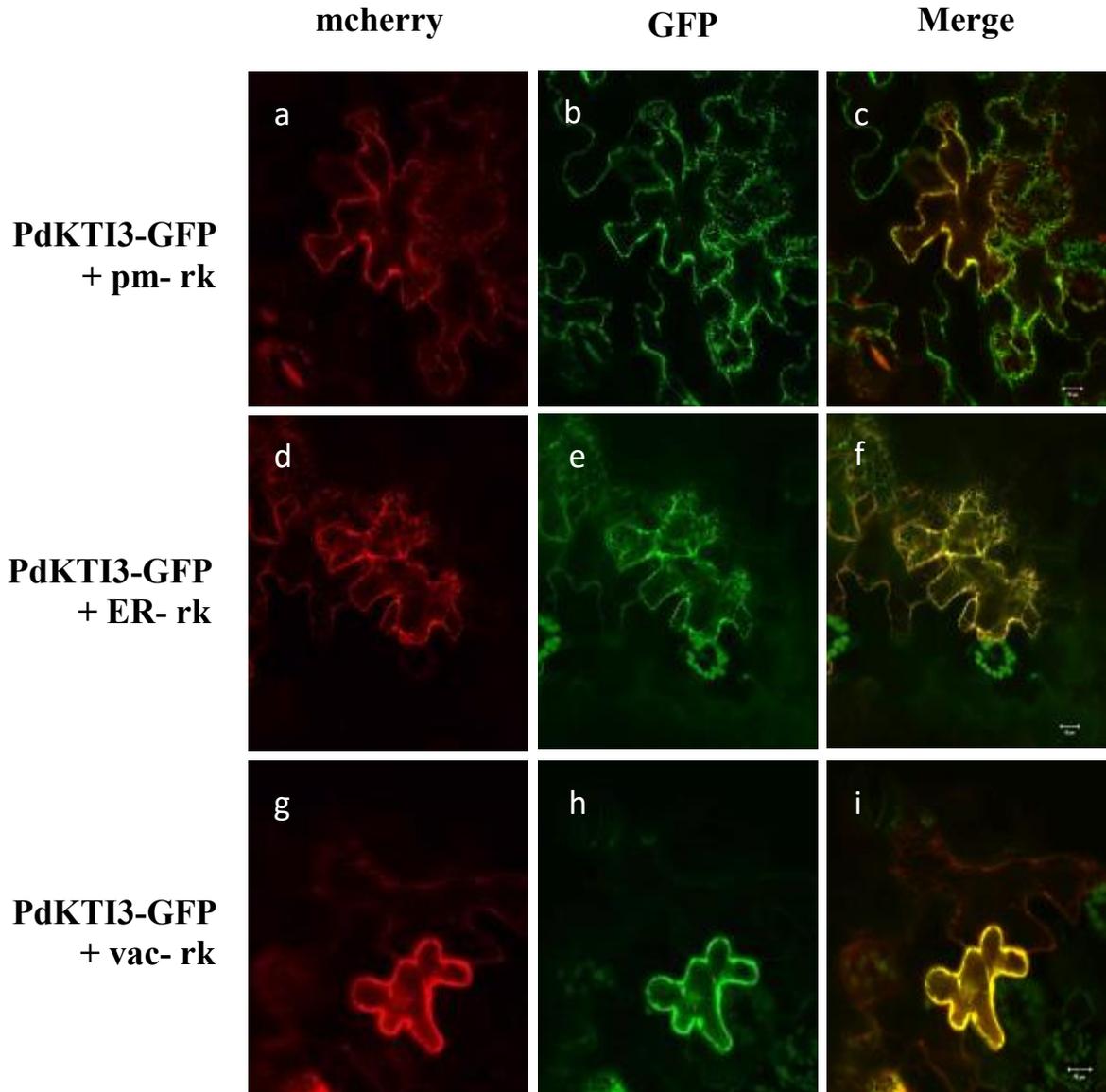


Figura 16. Localización subcelular de la proteína PdKTI3 fusionada a GFP, mediante expresión transitoria en células epidermales de hojas de *N. benthamiana*, utilizando los marcadores subcelulares pm-rk, ER-rk, y vac-rk. (a-c): PdKTI3-GFP co-localizada con marcador de membranda plasmática. (d-f): PdKTI3-GFP co-localizada con marcador de retículo endoplasmático. (g-i): PdKTI3-GFP co-localizada con marcador de vacuola. Barras indican 10 μ m.

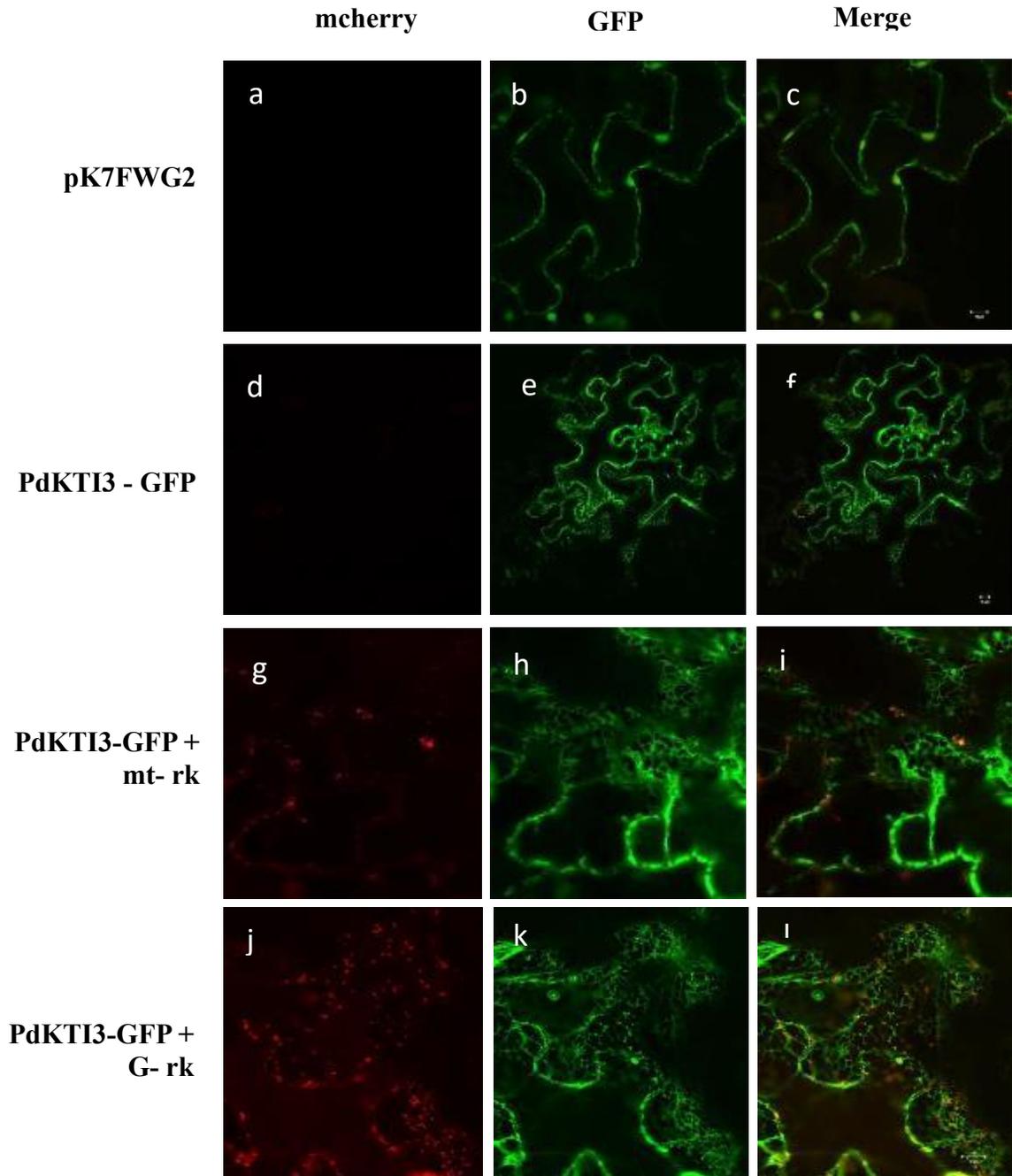


Figura 17. Localización subcelular de la proteína PdKTI3 fusionada a GFP, utilizando los marcadores subcelulares mt-rk, y g-rk. (a-c) vector vacío pK7FWG2 (GFP). (d-f) PdKTI3-GFP sin marcador de organelo. (g-i) PdKTI3-GFP co-localizada con marcador mitocondrial (mCherry). (j-l) PdKTI3-GFP co-localizada con marcador Golgi (mCherry). Barras indican 10 μ m.

IV. DISCUSIÓN

En este estudio, la proteína PdKTI3 fue analizada con el fin de comprender su función en el marco de la respuesta de las plantas frente a condiciones de estrés por exceso de Cu. En este sentido, se analizó el potencial de esta proteína para conferir tolerancia a Cu en *S. cerevisiae* y *A. thaliana*, el rol de los dos sitios de unión a Cu presentes en la proteína, descritos por Guerra et al., (2015), y su localización subcelular.

Ensayos de complementación en levaduras han sido desarrollados con el fin de evaluar la tolerancia a metales otorgada por la expresión heteróloga de genes (Blaudez et al., 2003, Yuan et al., 2012, Deliz-Aguirre, 2011). Específicamente, Shitan et al., (2007) demostró que la expresión de un inhibidor de proteasas en *S. cerevisiae* otorgaba tolerancia al exceso de Cd. También se ha reportado que la expresión ectópica de inhibidores de proteasas del tipo serina en *Pichia pastoris* permite tolerar el estrés por Cd y Hg (Joshi et al., 2014). En este contexto, los resultados del presente estudio demuestran que la expresión heteróloga de un inhibidor de tripsina en levaduras mutantes (*cup2Δ*), asociado tradicionalmente a la respuesta frente a estrés biótico (Major & Constabel, 2008), mejora la tolerancia a Cu (**Fig. 3**). Esta tolerancia estaría dada por la expresión de *PdKTI3* en la cepa mutante sensible a Cu, permitiéndole tolerar concentraciones de hasta 4 mM de CuSO₄, el doble de la concentración a la cual la cepa *wild-type* es inhibida (2 mM de CuSO₄) (**Fig. 3 a**). Esto sugiere que la capacidad de la proteína PdKTI3 para interactuar con este metal sería mediante la coordinación de iones de Cu con los residuos que constituyen los dos sitios de unión identificados. Para complementar estos resultados, se realizó un ensayo de cinética de crecimiento, lo que permitió corroborar de manera cuantitativa que a 2 mM de CuSO₄, las cepas *wild-type* y *cup2Δ* complementada con *PdKTI3*, son capaces de crecer (**Fig. 4 c**), mientras que a 4 mM de CuSO₄ sólo la cepa sensible complementada con el gen *PdKTI3* es capaz de desarrollarse (**Fig. 4 d**).

El rol defensivo de los inhibidores de tripsina en plantas está bien documentado en condiciones de estrés biótico. Por ejemplo, en especies del género *Populus* (*P. tremuloides* o *P. trichocarpa* x *P. deltoides*), genes que codifican para proteínas KTI son inducidos significativamente (en hojas), como mecanismo de defensa, frente al ataque de herbívoros

(Haruta et al., 2001; Christopher et al., 2004; Major & Constabel, 2008; Ramírez et al., 2009). También, se ha descrito que dos genes de *KTI* de garbanzo (*Cicer arietinum*) son inducidos por daño mecánico en los epicotilos y hojas (Jiménez et al., 2008). A esto, en los últimos años, nuevos mecanismos de tolerancia a herbivoría han sido relacionados con la absorción desde el suelo de los metales pesados y su hiperacumulación en tejidos vegetales (Howe & Herde, 2015). En *Populus*, Kieffer et al., (2008) y Guerra et al., (2009) demostraron que el tratamiento con Cd y Cu respectivamente, provocaba la inducción de genes que codifican proteínas vinculadas a estrés biótico, entre ellas *KTI3*.

Como ya ha sido señalado, el Cu es un micronutriente esencial que actúa como cofactor en muchos procesos metabólicos (Jonak et al., 2004; Schiavon et al., 2007; Lequeux et al., 2010). Sin embargo, en exceso puede ser tóxico para la mayoría de las plantas, provocando daño a nivel celular, reducción en el crecimiento, e inhibición de la elongación radicular (Schützendübel & Polle, 2002; Schiavon et al., 2007). En relación a esto último, se ha demostrado que entre los factores que afectan la arquitectura de la raíz de *Arabidopsis* se encuentran la baja disponibilidad de minerales como el fósforo (P) y Fe (López-Bucio et al., 2003), y la presencia de metales como el Cr (Ortiz-Castro et al., 2007; Martínez-Trujillo et al., 2013), Zn, Ni (Cañas-Navarro et al., 2012), y Cu (Martínez-Trujillo et al., 2009). La presencia de altos niveles de metales pesados, provoca un amplio rango de respuestas celulares, entre ellas destaca la activación de proteínas quinasas implicadas en la respuesta a exceso de metales en raíces. Jonak et al., (2004) reportaron la activación de al menos cuatro tipos de proteínas quinasas en respuesta a exceso de Cu en las raíces; lo que sugiere que el exceso de estos iones metálicos induce mecanismos de señalización celulares en raíces para regular diversas funciones biológicas en respuesta a estrés por metales pesados. En esta investigación, se evaluó el efecto del exceso de Cu en la elongación radicular en plantas de *A. thaliana* que expresaron constitutivamente el gen *PdKTI3*. Los resultados indicaron que a 50 μM CuSO_4 existió un crecimiento diferencial de la raíz primaria. En esta condición, las raíces de las líneas L27 y L30 fueron significativamente más largas que las del genotipo *wild-type* y la línea L21 (**Fig. 6 b-c**). Por otro lado, cuando las plántulas fueron tratadas con 75 μM CuSO_4 , se observó una gran diferencia en la coloración de las hojas de la roseta (**Fig. 6**

d). Esta coloración podría ser consecuencia de la acumulación de flavonoides, debido a su rol antioxidante en plantas (Keilig & Ludwig-Müller, 2009). Se ha reportado un alto nivel de antocianinas en plantas de *A. thaliana* cuando éstas fueron sometidas a estrés por exceso de Cu (Skórzyńska-Polit et al., 2010). Notablemente, a pesar de los altos niveles de expresión de *PdKTI3* que presentó la línea L21 (**Fig. 5**), ésta se comportó similar al genotipo *wild type*, presentando un largo radicular menor (**Fig. 6 b-c**), y un fenotipo aéreo (**Fig. 6 d**) diferente a las líneas L27 y L30, cuando éstas fueron sometidas a condiciones de estrés por exceso de Cu. Estos resultados sugieren que la tolerancia a Cu, evaluada en base a los criterios anteriormente referidos, estaría limitada a un determinado nivel de expresión del gen *PdKTI3*. Así, mientras las líneas L27 y L30 (**Fig. 5**), presentaron una moderada expresión de *PdKTI3* y fueron capaces de tolerar el exceso de Cu (**Fig. 6**), la línea L21, que presentó altos niveles de expresión de *PdKTI3* (**Fig. 5**), no mostró tolerancia al exceso de Cu, comportándose similar al genotipo *wild type* en lo que respecta a los criterios utilizados para estimar tolerancia a este metal. Una posible explicación, se encuentra en la multifuncionalidad que presentan estas proteínas (Grosse-Holz & van der Hoorn, 2016). Si bien es cierto *PdKTI3* ha sido asociada recientemente con tolerancia a Cu (Guerra et al., 2015), su principal función descrita está relacionada con la inhibición de proteasas, principalmente tripsina y quimiotripsina (Major & Constabel, 2008), actuando como una defensa inducible de la planta frente a herbívoros y patógenos (De Leo et al., 2002). Por esto, es probable que al sobrepasar cierto umbral de sobre expresión del gen *PdKTI3*, como es el caso de la línea L21, la alta cantidad de proteína activa sintetizada a partir de la sobreexpresión de este gen en presencia de su cofactor Cu^{+2} , altere procesos fisiológicos, como la muerte celular programada (Li et al., 2008; Boex-Fontvieille et al., 2015), presentando un efecto negativo sobre las características fenotípicas evaluadas.

Además de lo anterior, se observó una inhibición del crecimiento de la raíz primaria por efecto del aumento de la concentración del Cu ($75 \mu\text{M CuSO}_4$), lo que se ha correlacionado con la disminución de la actividad mitótica radicular (Martínez-Trujillo et al., 2009). A pesar del cese del crecimiento, las plántulas continuaron su desarrollo generando abundantes raíces laterales, de tal forma de modificar su arquitectura radicular, y de

sobrellevar de mejor manera la condición de estrés provocada por el exceso de Cu (**Fig. 7**). Similar estrategia ha sido observada en plantas de *Arabidopsis* sometidas a estrés por Cr, en las cuales se ha observado una estimulación del desarrollo de raíces laterales, lo que permitió tolerar las condiciones estresantes del medio (Ortiz-Castro et al., 2007). La estrategia de reorganización de la arquitectura del sistema radicular es parte de los mecanismos de adaptación frente la exposición a altas concentraciones de metales pesados, reflejando un alto grado de plasticidad fenotípica (Potters et al., 2009).

No obstante, resultados diferentes a los ya comentados se registraron al evaluar en plantas de *A. thaliana*, sometidas a estrés por exceso de Cu, otra característica fenotípica asociada a la tolerancia a este metal como es la acumulación de radicales superóxido. La **Fig. 8** indica que en la condición previa a la tinción existieron diferencias entre el genotipo *wild-type* y las líneas transgénicas cuando éstas fueron sometidas a 75 μM CuSO_4 en relación a su biomasa foliar. Luego, en la tinción con NBT, se observó una coloración azul en los tejidos vegetales generada por el formazán producido mediante la reacción del NBT con el radical anión superóxido (Rao & Davis, 1999). Bajo condiciones de 0 μM CuSO_4 dicha coloración fue notoria para todos los genotipos, lo que indica que, tanto para el genotipo *wild-type*, como para las líneas L21, L27, y L30, existe una producción basal de radicales superóxido. Esta condición es dada por la producción continua de ROS a nivel celular, como subproducto de diversas rutas metabólicas que se localizan en diferentes compartimentos celulares, tales como cloroplastos, mitocondrias y peroxisomas (Singh Gill & Tuteja, 2010). Bajo condiciones basales, las moléculas ROS generadas son contrarrestadas por diversos mecanismos de defensa antioxidante propios de la célula, sin embargo, este equilibrio entre la producción y reducción de ROS puede ser perturbado por diversos factores externos, como el estrés abiótico, el cual puede ser inducido por factores químicos como los metales pesados (Foyer & Noctor, 2005). El Cu es un micronutriente esencial para la planta, siendo cofactor de proteínas involucradas en el modelamiento de la pared celular (lacasa), y cadena transportadora de electrones (plastocianina; citocromo oxidasa); sin embargo, cuando se encuentra en exceso es altamente tóxico para la célula (Burkhead et al., 2009; Schulten & Krämer, 2018, Migocka & Malas, 2018). Este exceso de Cu induce un desbalance

homeostático intracelular, provocando un aumento en la producción de ROS. El principal ROS producido es el radical hidroxilo, un radical altamente reactivo (Valko et al., 2005). Éste puede reaccionar potencialmente con todas las moléculas biológicas como ADN, proteínas y lípidos pudiendo conducir finalmente a la muerte celular. Por otro lado, bajo condiciones de estrés por exceso de Cu, la fotosíntesis neta disminuye debido al daño del metabolismo fotosintético. Se ha demostrado que el Cu afecta negativamente el fotosistema II, la estructura de la membrana tilacoidal y el contenido de clorofila (Vinit-Dunand et al., 2002). En este contexto, bajo condiciones estresantes de 75 μM CuSO_4 (**Fig. 8**), esta producción se redujo, tanto para el genotipo *wild-type*, como para las líneas transgénicas L21, L27 y L30, observándose una mínima coloración azul en los órganos analizados, indicando que la producción de radicales superóxido en estas plantas fue mínima. Una hipótesis para explicar los fenotipos observados a 75 μM CuSO_4 en la tinción con NBT para el caso del genotipo *wild-type*, se basa en la alta expresión del gen *CSD1* (**Fig. 9**), el cual codifica para una enzima antioxidante (superóxido dismutasa), la que estaría evitando la generación de radicales superóxido y su consecuente estrés oxidativo. Esto se ve reflejado en la mínima coloración azul de los tejidos, lo que implica una mínima producción de radicales superóxido. A diferencia del genotipo *wild-type*, la expresión del gen marcador de estrés *CSD1* (**Fig. 9**) para las líneas transgénicas L21, L27, y L30 fue significativamente menor, indicando que éstas han adquirido tolerancia al estrés oxidativo generado por exceso de Cu, como lo sugiere la similitud que estas líneas presentan con el fenotipo *wild type*, donde se ha activado la síntesis de la enzima superóxido dismutasa. Este fenotipo se podría atribuir a la expresión constitutiva del gen *PdKTI3* el cual es fuertemente expresado en las líneas transgénicas, y no así en el genotipo *wild-type* (**Fig. 5**). Es por esto, que se puede inferir que la expresión constitutiva del gen *PdKTI3* en *A. thaliana*, disminuye el estrés oxidativo, generado por la producción de ROS como el radical superóxido. Esta disminución estaría asociada a la quelación de iones de Cu por parte de la proteína PdKTI3, reduciendo su presencia como iones libres en el citoplasma, disminuyendo el efecto del estrés oxidativo, y complementando así la función antioxidante de la enzima superóxido dismutasa, codificada por el gen *CSD1*. La explicación anterior, es aplicable también al gen marcador de estrés *CCS*, ya que se observaron los mismos patrones de expresión relativa bajo estrés por Cu (**Fig. 9** y **Fig. 10**).

En el presente estudio los sitios de unión a Cu predichos por Guerra et al., (2015) fueron mutagenizados *in silico*, a fin de evaluar posibles cambios conformacionales en la estructura tridimensional de la proteína PdKTI3. Este tipo de cambios han sido evidenciados en otras proteínas, afectando el número de interacciones con el sustrato, como resultado de los residuos mutados en su sitio activo (Knape et al., 2011; Sonawane et al., 2013). El modelamiento de la proteína PdKTI3S1S2Δ reveló que las mutaciones del sitio 1 y 2 no alteran su estructura tridimensional en comparación a la proteína nativa (**Fig. 11**). Esto se ve reflejado en el análisis estructural del gráfico de Ramachandran (**Fig. 13**), en donde 98,8 % de los aminoácidos se encuentran bien modelados, en zonas favorables (66,1 %), permitidas (29,3 %) y generosamente permitidas (3,4 %). Sólo dos aminoácidos (1,1 % del total), Glu 164 y Lys 200, alejados de la zona de unión a Cu, se encuentran en zonas no permitidas del gráfico. Desde el punto de vista energético, la evaluación realizada da cuenta de la presencia de energías no enlazantes favorables en la mayor parte de la proteína, incluyendo el sitio activo (**Fig. 12**). Sin embargo, el sitio 2 de unión a Cu predicho por Guerra et al., (2015) presentó un mayor número de aminoácidos con energía desfavorable. Esto sugiere un posible efecto negativo sobre la coordinación con el ión Cu (no cuantificado), que probablemente *in vivo* afectarían sólo la estabilidad de la coordinación del ión Cu en dicho sitio de unión, y no en otro dominio estructural o funcional de la proteína PdKTI3.

Por otro lado, el efecto de la mutación en la coordinación del ión Cu con los aminoácidos Ala y Val de los sitios de unión de la proteína PdKTI3 no fue determinado *in silico*, ya que para evaluar la interacción específica de Cu en los sitios de interés se requieren estudios de química cuántica más acabados. Sin embargo, es probable que la sustitución por los aminoácidos Ala y Val provocara una nula interacción del ion Cu con los sitios de unión, dada las propiedades de los aminoácidos seleccionados. Ala y Val se caracterizan por tener en su cadena lateral un hidrocarburo alifático, específicamente un grupo metilo (-CH₃) y un grupo isopropilo [(CH₃)₂CH-], respectivamente. Ambos grupos son poco reactivos y fuertemente hidrofóbicos, por lo que no serían capaces de coordinar la unión con Cu en los sitios de la proteína PdKTI3, perdiendo la capacidad de interacción con el metal. Esta capacidad de interacción si existe en los sitios de unión sin mutar, ya que en el sitio 1 el Cu

es coordinado por la cadena lateral de ambas His, mientras que en el Sitio 2 por ambas Ser (Guerra et al., 2015). Por su parte, la His se caracteriza por tener un grupo aromático imidazol ($C_3N_2H_4$) que permite donar electrones gracias al nitrógeno que posee, y es considerada como uno de los aminoácidos más frecuentes que participan en la coordinación del Cu. En cambio, la Ser posee un grupo hidroxilo (-OH) en su cadena lateral, responsable de la reactividad del aminoácido (Reyes L, 2014).

Métodos de mutagénesis sitio dirigida han sido empleados con el fin de examinar la importancia de residuos específicos en la estructura y función de proteínas (Van Dyke et al., 1992; Edelheit et al., 2009; Wright et al., 2016). En esta investigación se utilizó la cepa mutante *cup2Δ*, sensible a Cu. Esta cepa se caracteriza por ser sensible a Cu, debido a que no codifica una proteína de unión a DNA (activada por este metal), que a su vez regula la expresión de MT (Buchman et al., 1989). De acuerdo a los resultados obtenidos, la cepa *cup2Δ* toleró exitosamente la condición estresante de 60 μ M $CuSO_4$, cuando ésta fue complementada con el gen *PdKTI3*. Situación contraria ocurrió cuando la cepa mutante fue complementada con *PdKTI3* mutada en el sitio 1 (*PdKTI3S1Δ*), sitio 2 (*PdKTI3S2Δ*), y en ambos sitios a la vez (*PdKTI3S1S2Δ*) (**Fig. 14**). Es interesante destacar que levaduras mutantes *cup2Δ*, transformadas con el gen *KTI3S1Δ* o *KTI3S2Δ*, a diferencia de la transformada con *KTI3S1S2Δ*, no fueron capaces de crecer en medio con exceso de 60 μ M $CuSO_4$. Esto sugiere que bajo exceso de Cu, cada sitio por sí sólo no estaría asociado a tolerancia a Cu, y por lo tanto, existiría un efecto cooperativo entre ambos sitios en la quelación de iones de Cu, y en la tolerancia a este metal. Un aspecto importante a evaluar en futuras investigaciones es la concentración mínima inhibitoria para los casos de *KTI3S1Δ* o *KTI3S2Δ*, de forma similar a lo demostrado en este estudio respecto de las levaduras *cup2Δ* complementadas con *PdKTI3*. Todo lo anterior, confirma que la conferencia de tolerancia a exceso por Cu, demostrada anticipadamente por Guerra et al., (2015), es ahora relacionada funcionalmente a la presencia de a lo menos dos sitios de unión a Cu, los cuales son determinantes al momento de realizar la quelación del metal. Sin embargo, para probar esta hipótesis se requieren estudios posteriores.

La localización de la proteína KTI depende de la especie vegetal y su función. Algunos inhibidores de proteasa, con un rol de defensa contra patógenos, son almacenados en la vacuola (Srinivasan et al., 2009), así como también en la pared celular de tejidos vasculares (Hernández-Nistal et al., 2009). Análisis de secuencia de PdKTI3 permitieron identificar un péptido señal hacia el retículo endoplasmático (Guerra et al., 2015). Los experimentos de localización subcelular de PdKTI3 realizados mediante bombardeo en catáfilos de cebolla, indicaron la formación de agregados proteicos cuando el gen se insertó en la parte carboxilo de GFP (35S::GFP-PdKTI3). Esta inserción provocó una alteración del péptido señal, dada la presencia de GFP en el extremo N-terminal de la proteína de fusión (**Fig. 15 g-i**). Sin embargo, cuando el gen se insertó en la parte amino de GFP no existió formación de agregados proteicos, y el patrón de localización fue similar a una proteína asociada al retículo endoplasmático (**Fig. 15 d-f**). Adicionalmente, los experimentos de co-localización con diferentes marcadores de organelos permitieron especificar su ubicación. Para el caso de la mitocondria y el Golgi, no existió una co-localización entre éstos y la proteína PdKTI3 (**Fig. 17**), descartando la relación de la proteína con estos organelos. Por su parte, la fluorescencia de GFP y mCherry sugirió una posible asociación (no hubo superposición completa entre las señales de ambas proteínas) de la proteína a la membrana plasmática (**Fig. 16 c**). Sin embargo, lo que si se observó claramente fue una co-localización directa para los marcadores de vacuola (**Fig. 16 i**) y retículo endoplasmático (**Fig. 16 f**), lo que indica que la proteína PdKTI3 es direccionada hacia estos dos organelos. Por tanto, estos resultados son compatibles con el mecanismo de compartimentalización propuesto en la hipótesis, ya que PdKTI3 puede ser localizado en el retículo endoplasmático, donde finalizaría su plegamiento estructural mediante la formación de sus puentes disulfuro (Feige & Hendershot, 2011; Patil et al., 2015); y también localizado en la vacuola, donde compartimentalizaría el exceso de iones de Cu favoreciendo su homeostasis intracelular. En este equilibrio participan proteínas citoplasmáticas quelantes de Cu como MT o proteínas chaperonas como ATX1. Mientras que la compartimentalización en la vacuola en su forma monovalente (Cu^+) es mediada por proteínas transportadoras HMA, específicamente HMA4 y HMA5. Por otro lado, la principal proteína de eflujo en el tonoplasto corresponde al transportador COPT5 (Printz et al., 2016; Migocka & Malas, 2018; Schulten & Krämer,

2018). Similar estrategia es utilizada por otras proteínas, como las MTPs que juegan un rol en la tolerancia a Zn (Gustin et al., 2009) y Ni (Persant et al., 2001), compartimentalizando los metales en la vacuola. Recientemente, se reportó la presencia de un inhibidor de proteasa del tipo Kunitz, AtWSCP (Water Soluble Chlorophyll Protein), el cual inhibe a una cisteína proteasa a nivel vacuolar, RD21 (Responsive to Desiccation-21) (Rustgi et al., 2018). RD21 ha sido descrita como una proteína vacuolar (Shindo et al., 2012), cuyo mecanismo de inhibición por AtWSCP es estándar, al igual que PdKTI3. El complejo inhibidor - proteasa se formaría en la vacuola, de una manera similar con la que PdKTI3 compartimentalizaría iones de Cu, siendo ambos inhibidores de la misma familia. AtWSCP presenta una estructura secundaria y terciaria similar a otros miembros de la familia Kunitz, sin embargo, posee algunas características que difieren de un típico inhibidor de esta familia. Entre éstas están: (1) su secuencia aminoacídica del 4° y 5° loop, la cual no es conservada con otros miembros de la familia; (2) y posee sólo 2 residuos de Cys conservados, a diferencia de la gran mayoría de la familia Kunitz que posee 4 residuos (Rustgi et al., 2018). Aunque recientemente se reportó un nuevo inhibidor de tripsina del tipo kunitz en *Curcuma longa*, el cual posee 6 residuos de Cys formando tres puentes disulfuro (Chan et al., 2017). A pesar de ser un inhibidor de proteasa del tipo Kunitz, AtWSCP sólo ha sido relacionada con RD21 en plantas etioladas, protegiendo los brotes apicales, y permitiendo así su apertura sin daños ocasionados por herbívoros. Es decir, ha sido asociada a estrés biótico como la mayoría de los inhibidores de proteasas, exceptuando PdKTI3, el cual está siendo propuesto en esta tesis como una proteína asociada a la tolerancia a exceso de Cu.

Estudios complementarios del gen *PdKTI3*, como por ejemplo un análisis de su región promotora, la obtención de genotipos mutantes deficientes en la síntesis de inhibidores de proteasa (PdKTI3) en *Arabidopsis*, así como la complementación de los mismos, bajo estrés por Cu y otros elementos, contribuirán a una mejor caracterización del rol de esta proteína frente a metales pesados. Teniendo en cuenta los resultados, PdKTI3 es una proteína candidata para ser utilizada en el marco del desarrollo de sistemas de fitorremediación para metales pesados, por ejemplo, a través de la generación de plantas transgénicas (álamo) y/o microorganismos que sobre expresen el gen *PdKTI3*. Esta estrategia permitiría contar con

una herramienta biotecnológica útil para el mejoramiento de suelos (y residuos) con presencia de niveles excesivos de Cu.

V. CONCLUSIONES

1. La expresión de PdKTI3 en *S. cerevisiae* sensible a Cu, complementa la mutación confiriendo niveles de tolerancia al metal superior a la exhibida por el genotipo *wild-type*.
2. La expresión constitutiva del gen *PdKTI3* en *A. thaliana* permitió relacionar su expresión con la tolerancia a exceso de Cu. Esta tolerancia está asociada a un determinado nivel de expresión del gen *PdKTI3*.
3. La expresión constitutiva del gen *PdKTI3* en *A. thaliana* disminuye el estrés oxidativo asociado a la producción de ROS, como por ejemplo, la de radicales superóxido.
4. La presencia de la proteína PdKTI3 está asociada a la membrana plasmática, y localizada en la vacuola y retículo endoplasmático.
5. La proteína PdKTI3 posee dos sitios de unión a Cu, los cuales son requeridos simultáneamente para conferir tolerancia al exceso de Cu.

VI. BIBLIOGRAFÍA

Ali, H., Khan, E., Anwar, M., 2013. Phytoremediation of heavy metals: concepts and applications. *Chemosphere* 91, 869-881.

Alkorta, I., Hernández-Allica, J., Becerril, J., Amezaga, I., Albizu, I., Garbisu, C., 2004. Recent findings on the phytoremediation of soils contaminated with environmentally toxic heavy metals and metalloids such as zinc, cadmium, lead, and arsenic. *Rev. Environ. Sci. Bio/Tech.* 3, 71–90.

Andrés-Colás, N., Sancenón, V., Rodríguez-Navarro, S., Mayo, S., Thiele, D., Ecker, J., 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, 225-236.

Andrés-Colás, N., Perea-García, A., Mayo de Andrés, S., Garcia-Molina, A., Dorcey, E., Rodríguez-Navarro, S., Pérez-Amador, M., Puig, S., Peñarrubia, L., 2013. Comparison of global responses to mild deficiency and excess copper levels in *Arabidopsis* seedlings. *Metallomics* 5, 1234-1246.

Baker, AJM., Brooks, RR., 1989. Terrestrial higher plants which hyperaccumulate metallic elements. A review of their distribution, ecology and phytochemistry. *Biorecovery* 1, 81–126.

Balandin, T., Castresana, C., 2002. AtCOX17, an *Arabidopsis* homolog of the yeast copper chaperone COX17. *Plant Physiol.* 129,1852-7.

Blaudez, D., Kohler, A., Martin, F., Sanders, D., Chalot, M., 2003. Poplar metal tolerance protein 1 confers zinc tolerance and is an oligomeric vacuolar zinc transporter with an essential leucine zipper motif. *Plant Cell* 15, 2911–2928.

Boex-Fontvieille, E., Rustgi, S., Reinbothe¹, S., Reinbothe, C., 2015. A Kunitz-type protease inhibitor regulates programmed cell death during flower development in *Arabidopsis thaliana*. J. Exp. Bot. doi:10.1093/jxb/erv327.

Bothe, H., 2011. Plants in heavy metal soils. In: Sherameti I, Varma A. (Eds.), Detoxification of Heavy Metals, Soil Biology, vol. 30. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, pp. 35–57.

Bringezu, K., Lichtenberger, O., Leopold, I., Neumann, D., 1999. Heavy metal tolerance of *Silene vulgaris*. J. Plant Physiol. 154, 536-546.

Buchman, C., Skroch, P., Welch, J., Fogel, S., Karin, M., 1989. The CUP2 gene product, regulator of yeast metallothionein expression, is a copper-activated DNA-binding protein. Mol. Cell. Biol. 9, 4091-4095.

Burkhead, J., Gogolin, K., Abdel-Ghany, S., Cohu, C., Pilon, M., 2009. Copper homeostasis. New Phytol. 182, 799-816.

Cançado, G., Nogueira, F., Camargo, S., Drummond, L., Jorge, R., Menossi, M., 2008. Gene expression profiling in maize roots under aluminum stress. Biol. Plantarum 52, 475-485.

Cañas-Navarro, M., Carreón-Abud, Y., Martínez-Trujillo, M., 2012. Evaluación de la toxicidad ocasionada por el exceso de micronutrientes en plantas de *Arabidopsis thaliana*. Biológicas 14, 30-36.

Chan, S-N., Bakar, NA., Mahmood, M., Ho, Ch-L., Dzaki, NM., Shaharuddin, NA., 2017. Identification and expression profiling of a novel Kunitz trypsin inhibitor (KTI) gene from turmeric, *Curcuma longa*, by real-time quantitative PCR (RT-qPCR). Acta Physiol Plant 39:12.

Clough, S.J., Bent, A.F., 1998. Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium* mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 16, 735-43.

Cobbett, C., 2000. Phytochelatins and Their Roles in Heavy Metal Detoxification. *Plant Physiol.* 123, 825-832.

Cobbett, C., Goldsbrough, P., 2002. Phytochelatins and metallothioneins: roles in heavy metal detoxification and homeostasis. *Annu. Rev. Plant Biol.* 53, 159–182.

Coutsias, E.A., Seok, C., Dill, K.A., 2004. Using quaternions to calculate RMSD. *J. Comput. Chem.* 15, 1849–1857.

Charity, J.A., Anderson, M.A., Bittisnich, D.J., Whitecross, M., Higgins, T.J.V., 1999. Transgenic tobacco and peas expressing a protease inhibitor from *Nicotiana glauca* has increased insect resistance. *Mol. Breeding* 5, 357-365.

Chan, S.N., Abu Bakar, N., Mahmood, M., Ho, Ch-L., Mohamad, N., Azmi, N., 2017. Identification and expression profiling of a novel Kunitz trypsin inhibitor (KTI) gene from turmeric, *Curcuma longa*, by real-time quantitative PCR (RT-qPCR). *Acta Physiol Plant* 39, 12.

Chaudhary, K., Agarwal, S., Khan, S., 2018. Chapter 2 Role of phytochelatins (PCs), metallothioneins (MTs), and heavy metal ATPase (HMA) genes in heavy metal tolerance. *Mycoremediation and Environmental Sustainability*. Páginas 39-60.

Choudhury, S., Panda, P., Sahoo, L., Kumar, S., 2013. Reactive oxygen species signaling in plants under abiotic stress. *Plant Signal. Behav.* 8, 4.

Christeller, J.T., 2005. Evolutionary mechanisms acting on proteinase inhibitor variability. *FEBS J.* 272, 5710–5722.

Christopher, ME., Miranda, M., Major, IT., Constabel, CP., 2004. Gene expression profiling of systemically wound-induced defenses in hybrid poplar. *Planta* 219, 936–947.

Da Silva, DS., de Oliveira, CFR., Parra, JRP., Marangoni, S., Macedo, MLR., 2014. Short and long-term antinutritional effect of the trypsin inhibitor ApTI for biological control of sugarcane borer. *J. Insect Physiol.* 61, 1–7.

Das, K., Das, S., Dhundasi, S., 2008. Nickel, its adverse health effects and oxidative stress. *Indian J. Med. Res.* 128, 412–425.

De Leo, F., Volpicella, M., Licciulli, F., Liuni, S., Gallerani, R., Ceci, LR., 2002. PLANT-Pis: a database for plant protease inhibitor and their genes. *Nucleic Acid Res.* 1, 347-348.

Del Pozo, T., Cambiazo, V., González, M., 2010. Gene expression profiling analysis of copper homeostasis in *Arabidopsis thaliana*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 393, 248–252.

Deliz-Aguirre, R., Atkin, A., Kebaara, B., 2011. Copper tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* nonsense-mediated mRNA decay mutants. *Curr. Genet.* 57, 421–430.

Dombrowski, JE., 2003. Sodium chloride stress activation of wound related genes in tomato plants. *Plant Physiol.* 132, 2098-2107.

Dos Reis, RA., Keunen, E., Mourato, MP., Martins, LL., Vangronsveld, Jaco., Cuypers, Ann., 2018. Accession-specific life strategies affect responses in leaves of *Arabidopsis thaliana* plants exposed to excess Cu and Cd. *J. Plant Physiol.* <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2018.01.008>

Drażkiewicz, M., Skórzyńska-Polit, E., Krupa, Z., 2004. Copper-induced oxidative stress and antioxidant defense in *Arabidopsis thaliana*. *BioMetals* 17, 379-387.

Dubrovsky, JG., Forde, B., 2012. Quantitative analysis of lateral root development: pitfalls and how to avoid them. *Plant Cell* 24, 4-14.

Duvigneaud, P., Denaeyer-De, S., 1963. Cuivre et végétation au Katanga. *Bulletin de la Société royale de botanique de Belgique* 96, 31-93.

Ebbs, SD., Kochian, LV., 1997. Toxicity of Zn and Copper to *Brassica* species: Implication for phytoremediation. *J. Environ. Qual.* 26, 776-781.

Edelheit, O., Hanukoglu, A., Hanukoglu, I., 2009. Simple and efficient site-directed mutagenesis using two single-primer reactions in parallel to generate mutants for protein structure-function studies. *BMC Biotechnology* 9, 61.

Emamverdian, A., Ding, Y., Mokhberdoran, F., Xi, Y., 2015. Heavy metal stress and some mechanisms of plant defense response. *Scientific World J.* doi: 10.1155/2015/756120.

Foyer, CH., Noctor, G., 2005. Redox homeostasis and antioxidant signaling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses. *Plant Cell* 17, 1866-1875.

Galaev, IY., Kumar, A., Agarwal, R., Gupta, MN., Mattiasson, B., 1997. Imidazole: a new ligand for metal affinity precipitation. Precipitation of Kunitz soybean trypsin inhibitor using Cu (II)-loaded copolymers of 1-vinylimidazole with N-vinylcaprolactam or N-isopropylacrylamide. *Appl. Biochem. Biotech.* 68, 121–133.

Gechev, T., Van Breusegem, F., Stone, J., Denev, I., Laloi, C., 2006. Reactive oxygen species as signals that modulate plant stress responses and programmed cell death. *BioEssays* 28, 1091–1101.

Ghosh, S., 2010. Wetland macrophytes as toxic metal accumulators. *Int. J. Environ. Sci.* 1, 523-528.

Ginocchio, R., Narváez, J., 2002. Importancia de la forma química y de la matriz del sustrato en la toxicidad por cobre en *Noticastrum sericeum* (Less.) Less. Ex Phil. Rev. Chil. Hist. Nat. 75, 603-612.

Ginocchio, R., Rodríguez, P., Badilla-Ohlbaum, R., Allen, H., Lagos, G., 2002. Effect of soil copper content and pH on copper uptake of selected vegetables grown under controlled conditions. Environ. Toxicol. Chem. 21, 117-125.

Gosti, F., Bertauche, N., Vartanian, N., Giraudat, J., 1995. Abscisic acid-dependent and -independent regulation of gene expression by progressive drought in *Arabidopsis thaliana*. Mol. Genet. Genomics 246, 10-18.

Greipsson, S., 2011. Phytoremediation. Nat. Educ. Knowl. 2, 7.

Grellet, C., Díaz-Ricci, J., 2010. Quantitative determination of superoxide in plant leaves using a modified NBT staining method. Phytochem. Analysis 22, 268-271.

Grosse-Holz, FM., van der Hoorn, RAL., 2016. Juggling jobs: roles and mechanisms of multifunctional protease inhibitors in plants. New Phytol. doi:10.1111/nph.13839.

Guerra F. 2008. Identificación de genes asociados a mecanismos moleculares de tolerancia a cobre en *Populus* spp. Tesis Programa de Doctorado en Ciencias mención Ingeniería Genética Vegetal, Universidad de Talca. Talca, Chile. 188 p.

Guerra, F., Duplessis, S., Kohler, A., Martin, F., Tapia, J., Lebed, P., Zamudio, F., González, E., 2009. Gene expression analysis of *Populus deltoides* roots subjected to copper stress. Environ. Exp. Bot. 67, 335-344.

Guerra, F., Reyes L., Vergara-Jaque, A., Campos-Hernández, C., Gutiérrez, A., Pérez-Díaz, J., Pérez-Díaz, R., Blaudez, D., Ruíz-Lara, S., 2015. *Populus deltoides* Kunitz trypsin

inhibitor 3 confers metal tolerance and binds copper, revealing a new defensive role against heavy metal stress. *Environ. Exp. Bot.* 115, 28–37.

Gustin, J.L., Loureiro, M.E., Kim, D., Na, G., Tikhonova, M., Salt, D.E., 2009. MTP1-dependent Zn sequestration into shoot vacuoles suggests dual roles in Zn tolerance and accumulation in Zn-hyperaccumulating plants. *Plant J.* 57, 1116-27.

Hänsch, R., Mendel, R., 2009. Physiological functions of mineral micronutrients (Cu, Zn, Mn, Fe, Ni, Mo, B, Cl). *Curr. Opin. Plant Biol.* 12, 259-266.

Haq, S.K., Atif, S.M., Khan, R.H., 2004. Protein proteinase inhibitor genes in combat against insects, pests, and pathogens: natural and engineered phytoprotection. *Arch. Biochem. Biophys.* 431, 145-159.

Haruta, M., Major, I.T., Christopher, M.E., Patton, J.J., Constabel, C.P., 2001. A Kunitz trypsin inhibitor gene family from trembling aspen (*Populus tremuloides* Michx.): cloning, functional expression, and induction by wounding and herbivory. *Plant Mol. Biol.* 46, 347-359.

Haydon, M., Cobbett, C., 2007. Transporters of ligands for essential metal ions in plants. *New Phytol.* 174, 499-506.

Hernández-Nistal, J., Martín, I., Jiménez, T., Dopico, B., Labrador, E., 2009. Two cell all Kunitz trypsin inhibitors in chickpea during seed germination and seedling growth. *Plant Physiol. Bioch.* 47, 181-187.

Hildermann, T., Ebner, M., Corth, H.P., Serrano, J.J.S., Willmitzer, L., Prat, S., 1992. General roles of abscisic and jasmonic acids in gene activation as a result of mechanical wounding. *Plant Cell* 4, 1157-1170.

Howe, G., Herde, M., 2015. Interaction of plant defense compounds with the insect gut: new insights from genomic and molecular analyses. *Curr. Opin. Insect Sci.* 9, 62–68.

Humphrey, W., Dalke, A., Schulten, K., 1996. VMD: visual molecular dynamics. *J. Mol. Graphics* 14, 33-38.

Huang, Y., Xiao, B., Xiong, L., 2007. Characterization of a stress responsive protease inhibitor gene with positive effect in improving drought resistance in rice. *Planta* 226, 73-85.

Järup, L., 2003. Hazards of heavy metal contamination. *Brit. Med. Bull.* 68, 167–182.

Jabeen, R., Ahmad, A., Iqbal, M., 2009. Phytoremediation of heavy metals: physiological and molecular mechanisms. *Bot. Rev.* 75, 339-364.

Jiménez, T., Martín, I., Hernández-Nistal, J., Labrador, E., Dopico, B., 2008. The accumulation of a Kunitz trypsin inhibitor from chickpea (TPI-2) located in cell walls is increased in wounded leaves and elongating epicotyls. *Physiol. Plant.* 132, 306–317.

Jofuku, KD., Goldberg, R., 1989. Kunitz trypsin inhibitor genes are differentially expressed during the soybean life cycle and in transformed tobacco plants. *Plant Cell* 1, 1079-1093.

Jonak, C., Nakagami, H., Hirt, H., 2004. Heavy Metal Stress. Activation of distinct mitogen-activated protein kinase pathways by copper and cadmium. *Plant Physiol.* 136, 3276–3283.

Joshi, RS., Tanpure, RS., Singh, RK., Gupta, VS., Giri, AP., 2014. Resistance through inhibition: ectopic expression of serine protease inhibitor offers stress tolerance via delayed senescence in yeast cell. *Biochem. Bioph. Res. Co.* 452, 361-8.

Kabata-Pendias, A., 1995. Agricultural problems related to extensive trace metal contents of soils. En: Salomons W, U Förstner & P Mader (eds) Heavy metals, problems and solutions: 3-18. Springer-Verlag, Berlin, Germany. 412 pp.

Kang, SG., Choi, JH., Suh, SG., 2002. A leaf-specific 27 kDa protein of potato Kunitz-type protease inhibitor is induced in response to abscisic acid, ethylene, methyl jasmonate, and water deficit. *Mol. Cell* 13, 144-147.

Karban, R., Myers, J., 1989. Induced plant responses to Herbivory. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 20, 331-348.

Karimi, M., Inzé, D., Depicker, A., 2002. Gateway vectors for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Trends Plant Sci.* 7, 193-195.

Keilig, K., Ludwig-Müller, J., 2009. Effect of flavonoids on heavy metal tolerance in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Bot. Stu.* 50, 311-318.

Khan, S., Hesham, A., Qiao, M., Rehman, S., He, JZ., 2010. Effects of Cd and Pb on soil microbial community structure and activities. *Environ. Sci. Pollut. R.* 17, 288–296.

Kieffer, P., Dommès, J., Hoffmann, L., Hausman, J., Renaut, J., 2008. Quantitative changes in protein expression of cadmium-exposed poplar plants. *Proteomics* 8, 2514-2530.

Knape, K., Linder, T., Wolschann, P., Beyer, B., Stary-Weinzinger, A., 2011. *In silico* analysis of conformational changes induced by mutation of aromatic binding residues: consequences for drug binding in the hERG K⁺ channel. *PLOS One* 12, e28778- e28778.

Konno, H., Nakato, T., Nakashima, S., Katoh, K., 2005. *Lygodium japonicum* fern accumulates copper in the cell wall pectin. *J. Exp. Bot.* 56, 1923-1931.

Krämer, U., Clemens, S., 2005. Functions and homeostasis of zinc, copper, and nickel in plants. In: Tamás, M., Martinoia, E. (Eds.): Molecular biology of metal homeostasis and detoxification. Topics in Current Genetics, Vol. 14. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, Germany.

Krpata, D., Peintner, U., Langer, I., Fitz, W., Schweiger, P., 2008. Ectomycorrhizal communities associated with *Populus tremula* growing on a heavy metal contaminated site. Mycol. Res. 112, 1069-1079.

Kumar, K., Dayananda, S., Subramanyam, C., 2005. Copper alone, but not oxidative stress, induces copper–metallothionein gene in *Neurospora crassa*. FEMS Microbiol. Lett. 242, 45–50.

Kunitz, M., 1946. Isolation of a crystalline protein compound of trypsin and of soybean trypsin-inhibitor. J. Gen. Physiol. 30, 311-320.

Lange, B., Van der Ent, A., Martin-Baker, A.J., Echevarria, G., Mahy, G., Malaisse, F., Meerts, P., Pourret, O., Verbruggen, N., Faucon, M.P., 2016. Copper and cobalt accumulation in plants: a critical assessment of the current state of knowledge. New Phytol. doi: 10.1111/nph.14175.

Laskowski, M., Kato, I., 1980. Protein inhibitors of proteinases. Annu. Rev. Biochem. 49, S9J-626.

Laskowski, R.A., MacArthur, M.W., Moss, D.S., Thornton, J.M., 1993. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. J. Appl. Crystallogr. 26, 283-291.

Lefèvre, F., Rémy, MH., Masson, JM., 1997. Alanine-stretch scanning mutagenesis: a simple and efficient method to probe protein structure and function. *Nucleic Acids Res.* 25, 447-448.

Leitenmaier, B., Küpper, H., 2013. Compartmentation and complexation of metals in hyperaccumulator plants. *Front. Plant Sci.* 4, 1-13.

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, 673-682.

Li, YM., Chaney, R., Brewer, E., Roseberg, R., Angle, JS., Baker, A., Reeves, R., Nelkin, J., 2003. Development of a technology for commercial phytoextraction of nickel: economic and technical considerations. *Plant Soil* 249, 107–115.

Li, J., Brader, G., Palva, E.T., 2008. Kunitz Trypsin Inhibitor: An Antagonist of Cell Death Triggered by Phytopathogens and Fumonisin B1 in *Arabidopsis*. *Mol. Plant* 1, 482-495.

Linder, MC., Goode, CA., 1991. *Biochemistry of copper*. Springer. New York, NY, USA.

Liu, D., Lu, Y., Cheng, H., Hou, W., 2005. Immobilized zinc affinity chromatography of pectin hydroxamic acids for purification of trypsin inhibitors from soybean and sweet potato. *J. Agric. Food Chem.* 53, 10219-10223.

López, F., Vansuyt, G., Derancourt, J., Fourcroy, P., Casse-Delbart, F., 1994. Identification by 2D-page analysis of sodium chloride-stress induced proteins in radish (*Raphanus sativus*). *Cell. Mol. Biol.* 40, 85-90.

Lopes, A., Juliano, M., Juliano, L., Terra, W., 2004. Coevolution of insect trypsins and inhibitors. *Arch. Insect Biochem.* 55, 140–152.

López-Bucio, J., Cruz-Ramírez, A., Herrera-Estrella, L., 2003. The role of nutrient availability in regulating root architecture. *Curr. Opin. Plant Biol.* 6, 280–287.

Ma, L., Komar, K., Tu, C., Zhang, W., Cai, Y., Kennelley, E., 2001. A fern that hyperaccumulates arsenic. *Nature* 409, 579.

Ma, Y., Zhao, Q., Lu, M-Z., Wang, J., 2011. Kunitz-type trypsin inhibitor gene family in *Arabidopsis* and *Populus trichocarpa* and its expression response to wounding and herbivore in *Populus nigra*. *Tree Genet. Genomes* 7, 431-441.

MacKerell, A.D., Bashford, D., Bellott, M., Dunbrack, R.L., Evanseck, J.D., Field, M.J., Fischer, S., Gao, J., Guo, H., Ha, S., Joseph-McCarthy, D., Kuchnir, L., Kuczera, K., Lau, F.T., Mattos, C., Michnick, S., Ngo, T., Nguyen, D.T., Prodhom, B., Reiher, W.E., Roux, B., Schlenkrich, M., Smith, J.C., Stote, R., Straub, J., Watanabe, M., Wiorkiewicz-Kuczera, J., Yin, D., Karplus, M., 1998. All-atom empirical potential for molecular modeling and dynamics studies of proteins. *J. Phys. Chem-Us* 102, 3586-3616.

Major, IT., Constabel, CP., 2008. Functional analysis of the Kunitz trypsin inhibitor family in poplar reveals biochemical diversity and multiplicity in defense against herbivores. *Plant Physiol.* 146, 888–903.

Malik, N., Biswas, AK., 2012. Role of higher plants in remediation of metal contaminated sites. *Sci. Revs. Chem. Commun.* 2, 141–146.

Martínez-Trujillo, M., Sántiz-Gómez, M., Ortiz-Castro, R., Carreón-Abud, Y., 2009. Efecto del cobre en el crecimiento y la arquitectura de la raíz de *Arabidopsis thaliana* L. *Biológicas* 11, 122-131.

Martínez-Trujillo, M., Solís-Guzmán, G., Jiménez-Saragoz, JC., López-Hernández, D., Carreón- Abud, Y., Ríos-Chávez, P., 2013. Respuestas morfogénicas de las raíces de

Arabidopsis thaliana (Magnoliophyta: Brassicales) al estrés de Cr (VI). Rev. Chil. Hist. Nat. 86, 207-219.

Mattiasson, B., Kumar, A., Ivanov, A., Galaev, I., 2007. Metal-chelate affinity precipitation of proteins using responsive polymers. Nat. Protoc. 2, 213-220.

Melo, F., Devos, D., Depiereux, E., Feytmans, E., 1997. ANOLEA: a www server to assess protein structures. Proc. Int. Conf. Intell. Syst. Mol. Biol. 5, 187-90.

Memon, AR., Schröder, P., 2009. Implications of metal accumulation mechanisms to phytoremediation. Environ. Sci. Pollut. R. 16, 162-175.

Merchant, SS., Allen, MD., Kropat, J., Moseley, JL., Long, JC., Tottey, S., Terauchi, AM., 2006. Between a rock and a hard place: trace element nutrition in *Chlamydomonas*. Biochim. Biophys. Acta. 1763, 578-594.

Migeon, A., Blaudez, D., Wilkins, O., Montanini, B., Campbell, M., Richaud, P., Thomine, S., Chalot, M., 2010. Genome-wide analysis of plant metal transporters, with an emphasis on poplar. Cell. Mol. Life Sci. 67, 3763–3784.

Migliolo, L., de Oliveira, AS., Santos, EA., Franco, OL., de Sales, MP., 2010. Structural and mechanistic insights into a novel non-competitive Kunitz trypsin inhibitor from *Adenanthera pavonina* L. seeds with double activity toward serine- and cysteine-proteinases. J. Mol. Graph. Model. 29, 148–156.

Migocka, M., Malas, K., 2018. Chapter 4 – Plant Responses to Copper: Molecular and regulatory mechanisms of copper uptake, distribution and accumulation in plants. Plant Micronutrient Use Efficiency. Molecular and Genomic Perspectives in Crop Plants. Páginas 71–86.

Mira, H., Martínez-García, F., Peñarrubia, L., 2001. Evidence for the plant-specific intercellular transport of the *Arabidopsis* copper chaperone CCH. *Plant J.* 25, 521–528.

Mosa, K., Saadoun, I., Kumar, K., Helmy, M., Dhankher, OP., 2016. Potential biotechnological strategies for the cleanup of heavy metals and metalloids. *Front. Plant Sci.* 7, 303.

Mudipalli, A., 2008. Metals (micro nutrients or toxicants) and global health. *Indian J. Med. Res.* 128, 331–334.

Murphy, A., Taiz, L., 1995. Comparison of metallothionein gene expression and nonprotein thiols in ten *Arabidopsis* ecotypes. *Plant Physiol.* 109, 945–54.

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, 1687–1696.

Nelson, B., Cai, X., Nebenfu, A., 2007. A multicolored set of in vivo organelle markers for co-localization studies in *Arabidopsis* and other plants. *Plant J.* 51, 1126-1136.

Nielsen, J., Engelbrecht, J., Brunak, S., Heijne, G., 1997. Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein Eng.* 10, 1–6.

Odjegba, VJ., Fasidi, IO., 2004. Accumulation of trace elements by *Pistia stratiotes*: implications for phytoremediation. *Ecotoxicology* 7, 637-46.

O'Halloran, TV., Culotta, VC., 2000. Metallochaperones, an intracellular shuttle service for metal ions. *J. Biol. Chem.* 275, 25057-25060.

Oliva, ML., Souza-Pinto, JC., Batista, IF., Araujo, MS., Silveira, VF., Auerswald, EA., Mentele, R., Eckerskorn, C., Sampaio, MU., Sampaio, CA., 2000. *Leucaena leucocephala* serine proteinase inhibitor: primary structure and action on blood coagulation, kinin release and rat paw edema. *Biochim. Biophys. Acta.* 1477, 64–74.

Ortiz-Castro, R., Martínez-Trujillo, M., López-Bucio, J., Cervantes, C., 2007. Effects of dichromate on growth and root system architecture of *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Plant Sci.* 172, 684-691.

Palmer C, Guerinot M. 2009. Facing the challenges of Cu, Fe and Zn homeostasis in plants. *Nat. Chem. Biol.* 5, 333-340.

Patil, N., Tailhades, J., Hughes, R., Separovic, F., Wade, J., Hossain, M., 2015. Cellular disulfide bond formation in bioactive peptides and proteins. *Int. J. Mol. Sci.* 16, 1791-1805.

Paul, A., Daugherty, C., Bihn, E., Chapman, D., Norwood, K., Ferl, R., 2001. Transgene expression patterns indicate that spaceflight affects stress signal perception and transduction in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 126, 613-621.

Peng, X., Ding, X., Chang, T., Wang, Z., Liu, R., Zeng, X., Cai, Y., Zhu, Y., 2014. Overexpression of a vesicle trafficking gene, OsRab7, enhances salt tolerance in rice. *Scientific World J.* ID 483526, 7.

Persant, MW., Nieman, K., Salt, DE., 2001. Functional activity and role of cation-efflux family members in Ni hyperaccumulation in *Thlaspi goesingense*. *Plant Biol.* 98, 9995–10000.

Phillips, J.C., Braun, R., Wang, W., Gumbart, J., Tajkhorshid, E., Villa, E., Chipot, C., Skeel, R.D., Kale, L., Schulten, K., 2005. Scalable molecular dynamics with NAMD. *J. Comput. Chem.* 26, 1781-1802.

Philippe, R., Ralph, S., Külheim, C., Jancsik, S., Bohlmann, J., 2009. Poplar defense against insects: genome analysis, full-length cDNA cloning, and transcriptome and protein analysis of the poplar Kunitz-type protease inhibitor family. *New Phytol.* 184, 865-884.

Pilon-Smits, E., 2005. Phytoremediation. *Annu. Rev. Plant Biol.* 56, 15-39.

Potters, G., Pasternak, T., Guisez, Y., Jansen, M., 2009. Different stresses, similar morphogenic responses: integrating a plethora of pathways. *Plant Cell Environ.* 32, 158-169.

Prasad, MNV., 2005. Nickelophilous plants and their significance in phytotechnologies. *Braz. J. Plant Physiol.* 17, 113–128.

Printz, B., Lutts, S., Hausman, J-F., Sergeant, K., 2016. Copper trafficking in plants and its implication on cell wall dynamics. *Front. Plant Sci.* 7, 601.

Puig, S., Andres-Colas, N., Garcia-Molina, A., Penarrubia, L. 2007. Copper and iron homeostasis in *Arabidopsis*: responses to metal deficiencies, interactions and biotechnological applications. *Plant Cell Environ.* 30, 271–290.

Pulford, I., Watson, C., 2003. Phytoremediation of heavy metal contaminated land by trees - a review. *Environ. Int.* 29, 529-540.

R Core Team, 2014. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>.

Ramírez, C., Guerra, F., Zúñiga, R., Cordero, C., 2009. Differential expression of candidate defense genes of poplars in response to aphid feeding. *J. Econ. Entomol.* 102, 1070-1074.

Rao, M., Davis, K., 1999. Ozone-induced cell death occurs via two distinct mechanisms in *Arabidopsis*: the role of salicylic acid. *Plant J.* 17, 603-14.

Ravet, K., Pilon, M., 2013. Copper and iron homeostasis in plants: the challenges of oxidative stress. *Antioxid. Redox Sign.* 19, 9.

Rascioa, N., Navari-Izzo, F., 2011. Heavy metal hyperaccumulating plants: How and why do they do it? And what makes them so interesting?. *Plant Sci.* 180, 169–181.

Remans, T., Smeets, K., Opdenakker, K., Mathijsen, D., Vangronsveld, J., Cuypers, A., 2008. Normalisation of real-time RT-PCR gene expression measurements in *Arabidopsis thaliana* exposed to increased metal concentrations. *Planta* 227, 1343–1349.

Reyes, L., 2014. Predicción y caracterización estructural de sitios de unión a cobre (Cu²⁺) en la proteína Kunitz trypsin inhibitor3 (KTI3) expresada en Álamos. Tesis de pregrado. Escuela de Ingeniería en Bioinformática. Facultad de Ingeniería. Universidad de Talca, Chile.

Rustgi, S., Boex-Fontvieille, E., Reinbothe, C., von Wettstein, D., Reinbothe, S., 2018. The complex world of plant protease inhibitors: Insights into a Kunitz-type cysteine protease inhibitor of *Arabidopsis thaliana*. *Commun. Integr. Biol.* 11, 1.

Ryngajllo, M., Childs, L., Lohse, M., Giorgi, F., Lude, A., Selbig, J., Usadel, B., 2011. SLocX: predicting subcellular localization of *Arabidopsis* proteins leveraging gene expression data. *Front Plant Sci* 2, 1-19.

Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York, NY, USA.

Sambrook, J., Russell, D., 2001. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor. NY.

Sancenón, V., Puig, S., Mira, H., Thiele, D., Peñarrubia, L., 2003. Identification of a copper transporter family in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.* 51, 577-587.

Sarma, H. 2011. Metal hyperaccumulation in plants: a review focusing on phytoremediation technology. *J. Environ. Sci. Technol.* 4, 118–138.

Sauvé, S., Hendershot, W., Allen, H., 2000. Solid solution partitioning of metals in contaminated soils: dependence on pH and total metal burden. *Envir. Sci. Tech.* 34, 1125-1131.

Schiavon, M., Zhang, L., Abdel-Ghany, S., Pilon, M., Malagolia, M., Pilon-Smits, E., 2007. Variation in copper tolerance in *Arabidopsis thaliana* accessions Columbia, Landsberg erecta and Wassilewskija. *Physiol. Plant.* 129, 342–350.

Schulten, A., Krämer, U., 2018. Interactions between copper homeostasis and metabolism in plants. *Prog. Bot.* 79, 111-146.

Schützendübel, A., Polle, A., 2002. Plant responses to abiotic stresses: heavy metal-induced oxidative stress and protection by micorrhization. *J. Exp. Bot.* 53, 1351-1365.

Sessa, D., Haney, JK., Nelsen, TC., 1990. Inactivation of soybean trypsin inhibitors with ascorbic acid plus copper. *J. Agric. Food Chem.* 38, 1469-1474.

Sharma, S., Dietz, K., 2009. The relationship between metal toxicity and cellular redox imbalance. *Trends Plant Sci.* 14, 43-50.

Sharma, P., Bhushan, A., Shanker, R., Pessarakli, M., 2012. Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. *J. Bot.* 2012, 1-26.

Sherameti, I., Varma, A., 2010. *Soil Heavy Metals*. Springer Science & Business Media. 492pp.

Sheoran, V., Sheoran, A., Poonia, P., 2011. Role of hyperaccumulators in phytoextraction of metals from contaminated mining sites: a review. *Crit. Rev. Env. Sci. Tec.* 41, 168–214.

Shindo, T., Misas-Villamil, J., Hörger, A., Song, J., van der Hoorn, R., 2012. A role in immunity for *Arabidopsis* cysteine protease RD21, the ortholog of the tomato immune protease C14. *PLOS One* 7, 1-9.

Shitan, N., Horiuchi, K., Sato, F., Yazaki, K., 2007. Bowman–Birk proteinase inhibitor confers heavy metal and multiple drug tolerance in yeast. *Plant Cell Physiol.* 48, 193–197.

Singh Gill, S., Tuteja, N., 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiol. Bioch.* 48, 909-930.

Singh, S., Parihar, P., Singh, R., Singh, VP., Prasad, SM., 2016. Heavy metal tolerance in plants: Role of transcriptomics, proteomics, metabolomics, and ionomics. *Front. Plant Sci.* 6, 1143.

Skórzyńska-Polit, E., Drażkiewicz, M., Krupa, Z., 2010. Lipid peroxidation and antioxidative response in *Arabidopsis thaliana* exposed to cadmium and copper. *Acta Physiol Plant* 32, 169–175.

Snowden, K., Richards, K., Cardner, R., 1995. Aluminum induced genes. Induction by toxic metals, low calcium, and wounding and pattern of expression in root tips. *Plant Physiol.* 107, 341-348.

Sonawane, P., Patel, K., Vishwakarma, R., Singh, S., Khan, BM, 2013. In Silico mutagenesis and docking studies of active site residues suggest altered substrate specificity and possible physiological role of Cinnamoyl CoA Reductase 1 (LI-CCR1). *Bioinformation* 9, 224-232.

Song, HK., Suh, SW., 1998. Kunitz-type soybean trypsin inhibitor revisited: Refined structure of its complex with porcine trypsin reveals an insight into the interaction between a homologous inhibitor from *Erythrina caffra* and tissue-type plasminogen activator. *J. Mol. Biol.* 275, 347–363.

Srinivasan, T., Rajesh, K., Bharadwaja, K., 2009. Constitutive expression of a trypsin protease inhibitor confers multiple stress tolerance in transgenic tobacco. *Plant Cell Physiol.* 50, 541-553.

Stintzi, A., Heitz, T., Prasad, V., Wiedemann-Merdinoglu, S., Kauffmann, S., Geoffroy, P., Legrand, M., Fritig, B. 1993. Plant 'pathogenesis-related' proteins and their role in defense against pathogens. *Biochimie.* 75, 687-706.

Tangahu, BV., Abdullah, SRS., Basri, H., Idris, M., Anuar, N., Mukhlisin, M., 2011. A review on heavy metals (As, Pb, and Hg) uptake by plants through phytoremediation. *Int. J. Chem. Eng.* doi:10.1155/2011/939161.

Taylor, K., Ellis, D., Paiva, L., 2002. Purification of a zinc binding protein from xylem of *Citrus jambhiri*. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 127, 718-723.

Thakur, S., Singh, L., Wahid, ZA., Siddiqui, M., Atnaw, SM., Din, MFM., 2016. Plant-driven removal of heavy metals from soil: uptake, translocation, tolerance mechanism, challenges, and future perspectives. *Environ. Monit. Assess* 188, 206.

Telang, M., Srinivasan, A., Patankar, A., Harsulkar, A., Joshi, V., Damle, A., Deshpande, V., Sainani, M., Ranjekar, P., Gupta, G., Birah, A., Rani, S., Kacholec, M., Giri, A., Gupta, V., 2003. Bitter gourd protease inhibitors: potential growth inhibitors of *Helicoverpa armigera* and *Spodoptera litura*. *Phytochemistry* 63, 643-652.

Tong, J., Kneer, R., Zhu, Y., 2004. Vacuolar compartmentalization: a second-generation approach to engineering plants for phytoremediation. *Trends. Plant. Sci.* 9, 7-9.

Van Dyke, BR., Bakan, DA., Glover, KA., Hegenauer, JC., Saltman, P., Springer, BA., Sligar SG., 1992. Site-directed mutagenesis of histidine residues involved in Cu (II) binding and reduction by sperm whale myoglobin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89, 8016-8019.

Van Hoof, N., Hassinen, V., Hakvoort, H., Ballintijn, K., Schat, H., Verkleij, J., Ernst, W., Karenlampi, S., Tervahauta, A., 2001. Enhanced copper tolerance in *Silene vulgaris* (Moench) Garcke populations from copper mines is associated with increased transcript levels of a 2b-type metallothionein gene. *Plant Physiol.* 126, 1519-27.

Vinit-Dunand, F., Epron, D., Alaoui-Sosse, B., Badot, P-M., 2002. Effects of copper on growth and on photosynthesis of mature and expanding leaves in cucumber plants. *Plant Sci.* 163, 53-58.

Wang, J., Evangelou, V., 1995. Metal tolerance aspects of plant cell wall and vacuole. In: Pessaraki, M. *Handbook of plant and crop physiology.* Marcel Dekker, Inc., USA, pp. 695-717.

Williams, L., Mills, R., 2005. P1B-ATPases – an ancient family of transition metal pumps with diverse functions in plants. *Trends Plant Sci.* 10, 491-502.

Wright, T., Vallée, M., Davis, B., 2016. From chemical mutagenesis to post-expression mutagenesis: A 50 year odyssey. *Angew. Chem. Int. Ed.* 55, 5896-5903.

Wuana, RA., Okieimen, FE., 2011. Heavy metals in contaminated soils: a review of sources, chemistry, risks and best available strategies for remediation. *ISRN Ecology* 1-21.

Xu, R., Li, Q., 2008. Protocol: Streamline cloning of genes into binary vectors in *Agrobacterium* via the Gateway® TOPO vector system. *Plant Methods* 4, 4.

Yadav, S., 2010. Heavy metals toxicity in plants: An overview on the role of glutathione and phytochelatins in heavy metal stress tolerance of plants. *S. Afr. J. Bot.* 76, 167-179.

Yang, X., Feng, Y., He, Z., Stoffella, P., 2005. Molecular mechanisms of heavy metal hyperaccumulation and phytoremediation. *J. Trace Elem. Med Biol.* 18, 339–353.

Yruela, I., 2009. Copper in plants: acquisition, transport and interactions. *Funct. Plant Biol.* 36, 409-430.

Yuan, L., Yang, S., Liu, B., Zhang, M., Wu, K., 2012. Molecular characterization of a rice metal tolerance protein, OsMTP1. *Plant Cell Rep.* 31, 67–79.

Zhou, J., Goldsbrough, P., 1994. Functional homologs of fungal metallothionein genes from *Arabidopsis*. *Plant Cell* 6, 875–884.

Zolórzano, E., Peteira, B., 2000. Inhibidores de proteasas en plantas. *Rev. Protección Veg.* 15, 7-15.