



VNIVERSITAT DE VALÈNCIA

Efectos de la sobreexpresión de transportadores de cobre de alta afinidad tipo Ctr en *Saccharomyces cerevisiae*, *Arabidopsis thaliana* y *Oryza sativa*.

Programa Doctorado de Biomedicina y Biotecnología

Memoria presentada por
Amparo Andrés Bordería

Para optar al título de Doctora por la Universidad de València

Dirigida por: Dra Lola Peñarrubia Blasco

Dr. Sergi Puig Todolí

Septiembre 2019

Aqui debería ir una cita importante, en mi caso lo único que me viene a la mente es la palabra más repetida por mi bicheta: "¡Hola!"

Dña. Lola Peñarrubia Blasco, Doctora en Ciencias Biológicas y Catedrática de Bioquímica y Biología Molecular de la Universitat de València, **D. Sergi Puig Todolí**, Doctor en Ciencias Químicas y Científico Titular del Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos del Centro Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), y **D. Pedro Miguel Carrasco Sorlí**, Doctor en Ciencias Químicas y Catedrático de Bioquímica y Biología Molecular de la Universitat de València,

INFORMAN:

Que **Dña. Amparo Andrés Bordería**, Licenciada en Ciencias Biológicas por la Universitat de València, ha realizado bajo la codirección de la Dra. Peñarrubia y el Dr. Puig y la tutela académica de la Dr. Carrasco, el trabajo de Tesis Doctoral que lleva por título "EFECTOS DE LA SOBREEXPRESIÓN DE TRANSPORTADORES DE COBRE DE ALTA AFINIDAD TIPO CTR EN *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*, *ARABIDOPSIS THALIANA* Y *ORYZA SATIVA*".

Revisado el presente trabajo, expresan su conformidad para la presentación del mismo por considerar que reúne los requisitos necesarios para ser sometido a discusión ante el tribunal correspondiente, para la obtención del grado de Doctor.

En Valencia, a 2 de septiembre de 2019

Dra. Lola Peñarrubia Blasco

Dr. Sergi Puig Todolí

Dr. Pedro Carrasco Sorlí

El presente trabajo ha sido realizado en el *Laboratorio de Plantas* del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, perteneciente a la ERI BIOTECMED de la Universidad de Valencia y el *Laboratorio de Homeostasis del Hierro* en el *Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos* (CSIC). Gracias al apoyo obtenido por los proyectos BIO2011-24848, BIO2014-56298-P y BIO2017-87828-C2-1-P del Ministerio de Economía y Competitividad, así como por el proyecto Aico2015/004 otorgado por la Generalitat Valenciana.

Agradecemos a los siguientes investigadores, laboratorios y servicios la ayuda prestada en las diferentes partes del trabajo experimental realizado en el presente trabajo:

- Dr. Gongke Zhou del Instituto Quindao de Bioenergética y Tecnología de Bioprocesos de la Academia China de Ciencias por facilitarnos las plantas CTH1^{OE}, CTH2^{OE}, *cth1cth2*(±).
- Dr. Manuel Talón y Dra. Concha Domingo del *Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias* (Generalitat Valenciana), por su ayuda para llevar a cabo la obtención de las plantas transgénicas de *Oryza sativa*, así como en el estudio de la expresión génica global realizado en *Oryza*.
- Dra. Amparo Sanz de la Universitat de València, por su participación en los ensayos realizados en este trabajo.
- Dr. Carlos García Ferris de la Universitat de València, por su apoyo en la realización de las medidas de consumo de oxígeno en plantas.
- *Servicio Central de Soporte a la Investigación Experimental* (SCSIE) de la Universitat de València, por los servicios de: Invernadero, Espectroscopía atómica y molecular, Secuenciación y Microscopía.
- A todos los miembros de los grupos de *Homeostasis del Cu en Arabidopsis* y *Homeostasis del Fe* que han ayudado a realizar este trabajo.

Agradecimientos:

A mis directores Lola y Sergi por la confianza depositada para llevar a cabo este trabajo, por la dedicación y apoyo recibido estos años. Es un placer trabajar con gente que te aporta tanto conocimiento y que le apasiona su trabajo.

A todos mis compañeros del *Laboratorio de Plantas*, han sido muchos los que han pasado por allí, pero a cada uno de ellos les agradezco ese apoyo moral necesario para sobrevivir a este mundo. A Toni, Paco Marco y Fran, porque la risa estaba garantizada. A las visitas argentinas, por endulzar de manera maravillosa cada una de sus visitas. A Paco Romero por ayudarme a instaurar el almuerzo en nuestras vidas. A Àngela por mantenerme con los pies en el suelo y aguantar mis quejas. A Nuria, la chica alegre que me enseñó que la ciencia te presenta gente maravillosa, que te acoge con los brazos abiertos, gracias por esos abrazos. A todo el grupo de IATA, hicisteis que el cambio fuera fácil y trabajar con vosotras ha sido una delicia: Pilar, Cristina, Tania, Lucia y Anto. Pero si hay alguien que ha hecho que mi cabeza aguante y haya llegado hasta aquí no es otra que mi post-doc personal, Ana. Gracias por ser TANTO, dentro y fuera del laboratorio, te debo mi cordura y este trabajo.

A todo el departamento de Bioquímica y Biología Molecular, habéis hecho que ir a trabajar sea como estar en casa. Al grupo de *Genómica Funcional de Levaduras*, que grupo más maravilloso, habéis sido mi gran apoyo durante los últimos años, no me puedo dejar a ninguno de vosotros: Fani, Toni, Daniel, Tian, Ana, María, Marta, Ester y Adri. Gracias por todo, el tiempo nos separó, pero sois geniales. Al *Laboratorio de Proteínas de Membrana* y al *Laboratorio de Ciclo Celular*, por estar ahí siempre que os necesité. Cada uno de vosotros me habéis ayudado a amar más si cabe este mundo de ciencia, que no es fácil, pero que engancha.

Pero para llegar aquí di muchas vueltas, mi paso por el Centro Príncipe Felipe me hizo darme cuenta que la ciencia era lo que me apasionaba. Gracias a todo el I-17, mis niñas: Laurita, Laura, Judith, Imelda, María, Maria Grazia y Lucia, vosotras

hicisteis que aquellos años los guarde con un cariño inmenso en mi memoria y siempre me disteis la confianza que yo no siempre tuve para llegar a donde estoy hoy. Lo que yo nunca pensé en conseguir esta aquí, una tesis. Os admiraba entonces y mucho más ahora que lo he hecho yo, Lucia tenías razón ihe podido! Pero no me puedo olvidar de Laura Ramírez, mi maestra de laboratorio, hiciste entrar el gusanillo y ahora no puede salir, me alegro que el mundo nos junte una y otra vez.

Gracias a mis compañeros del *Departamento de Patología* de la Facultad de Medicina y Odontología. Hizo que encontrara gente preciosa: Lara, Bea y Tere. Lo que ha unido Paris no lo separara nadie. Gracias por aguantar mis histerias en un momento de locura de mi vida.

También a mis compañeros de ahora, por ayúdame a sacar la escritura adelante. A mis jefes Carmen e Ibo, por darme la oportunidad de seguir en este mundo de ciencia que tanto me gusta. A Vincenzo, Lola, Ana, Andrea, Elo, Marina, Claudia, Andrea, Virginia y Paula (iya está, acabamos!) por soportar mis neuras de la fase final.

Sin duda tengo que agradecer a todo mi entorno fuera del laboratorio. Mis chicas de Biología porque vosotras me alegrasteis la vida mis primeros cinco años en Burjassot y cada rincón me recuerda a vosotras: Lorena, Irma, Carmen y Ana. Gracias Carmen por ser mi otro pilar durante estos años, gracias por no dejar que la distancia nos separara, por escuchar pacientemente, por los consejos y la amistad. iiiEres ÚNICA!!! A mi gente fuera de este mundo de ciencia, por intentar entender un trabajo difícil de entender: Carlos, Claudia, Cristina, Sandra, gracias por quererme como soy y apoyarme tanto, habéis hecho mucho más de lo que pensáis porque esto haya acabado tan bien.

A toda mi familia: tias, tios, primas y primo, porque me habéis soportado todo este tiempo, aunque no siempre estuviera en los momentos importantes.

Y como no a los míos; mis hermanas, mis sobrinos, mi cuñado, por fin ha llegado el final de esta etapa. Gracias, por tanto, por ayudarme a acabar este trabajo y mejorar mi vida. A mis padres porque sin ellos esto nunca habría empezado y sin duda no habría acabado, os debo TODO. ¡GRACIAS, GRACIAS, GRACIAS!

A mi marido, Sergio, eres y serás lo mejor que me dio la Biología. Gracias por hacer que aguante con la cabeza sobre los hombros, por poner perspectiva cuando la pierdo, por acompañarme a horas intempestivas al laboratorio porque me daba miedo ir sola.... ¡Por tanto...GRACIAS! TE QUIERO.

Y todo esto se lo dedico a mi gran creación, que no ha sido otro que el bichito que llegó hace dos años a mejorar y poner más patas arriba mi vida de lo que me imaginé, **EMMA**.

ÍNDICE

ÍNDICE	i
ABREVIATURAS.....	i
RESUMEN	vii
FIGURAS.....	ix
TABLAS	xiii
INTRODUCCIÓN	1
1. IMPORTANCIA DEL COBRE Y DEL HIERRO EN BIOLOGÍA.....	1
1.1. Deficiencia de cobre.....	2
1.2 Deficiencia de hierro.	3
1.3 Exceso de cobre.	4
1.4 Exceso de hierro.....	4
2 RED HOMEOSTÁTICA DEL COBRE.....	5
2.1. Incorporación del cobre en las células.	5
2.2. Distribución del cobre en el interior celular.....	6
2.3. Regulación de la expresión de los genes implicados en la homeostasis del cobre celular.	10
3. RED HOMEOSTÁTICA DEL HIERRO.	13
3.1. Incorporación del hierro en las células.	13
3.2. Distribución del hierro en el interior celular.	16
3.3. Regulación de la expresión de los genes de la homeostasis del hierro.	20
4. FAMILIA DE TRANSPORTADORES DE COBRE DE ALTA AFINIDAD CTR.....	28
4.1. Transportadores Ctr en <i>S. cerevisiae</i>	30
4.2. Transportadores COPT en <i>Arabidopsis</i>	31
4.3. Transportadores OsCOPT en <i>Oryza</i>	34
4.4 Efectos de la sobreexpresión de los transportadores de cobre....	35

OBJETIVOS	37
MATERIAL Y MÉTODOS	41
1. MATERIAL BIOLÓGICO Y CONDICIONES DE CRECIMIENTO.....	43
1.1. <i>Escherichia coli</i> y <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	43
1.2. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	45
1.3. <i>Arabidopsis thaliana</i> y <i>Oryza sativa</i>	48
2. TÉCNICAS GENERALES DE BIOLOGÍA MOLECULAR	50
2.1. Obtención de RNA total	50
2.2. Electroforesis de DNA y RNA	51
2.3. Tratamiento con DNAsa y síntesis de cDNA	52
2.4. RT-PCR semicuantitativa (sqPCR)	53
2.5. RT-PCR cuantitativa (qPCR)	54
2.6. Micromatrices de DNA	58
2.7. Técnica de inmunodetección de proteínas	60
2.8. Determinación del contenido endógeno de cobre y hierro	61
2.9. Triple Híbrido.....	62
3. TÉCNICAS DE ESTUDIO DE PARÁMETROS FISIOLÓGICOS.....	64
3.1. Medida de peso fresco y longitud de raíz.....	64
3.2. Determinación del contenido en clorofilas.....	64
3.3. Medida de hormonas.....	65
3.4. Tinción de Perl´s	65
3.5. Actividad ferroxidasa	65
3.6. Respiración.....	66
3.7. Estrés oxidativo	66
4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS.....	67
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	69
Resultados Capítulo 1.....	71
1. ESTUDIO DEL EFECTO DE LA ENTRADA DEL ION CUPROSO EN <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i>	73

1.1. Obtención y caracterización del mutante CTR1Δ300 con la entrada desregulada de cobre.	74
1.2. Caracterización de la respuesta del regulón de hierro en la cepa CTR1Δ300.	82
1.3. Estudio del papel del regulador <i>CTH2</i> en la respuesta de la cepa CTR1Δ300.	86
1.4. Regulación de la expresión proteínas con centros Fe-S en la cepa CTR1Δ300.	90
Discusión Capítulo 1	99
Resultados Capítulo 2	105
2. ESTUDIO DE LOS EFECTOS DE LA SOBREENPRESIÓN DEL TRANSPORTADOR DE COBRE DE ALTA AFINIDAD COPT1 EN <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i>	107
I-CARACTERIZACIÓN DEL FACTOR CTH2 EN <i>ARABIDOPSIS</i>	107
2.1 Selección de posibles dianas de la proteína Cth2 relacionados con la homeostasis de metales en base a la presencia de posibles AREs.	108
2.2 Estudio por triple híbrido de la interacción entre Cth2 y posibles dianas.	119
2.3 Caracterización de la expresión génica de los genes <i>CTH</i> en plantas de <i>Arabidopsis</i>	121
2.4 Estudio fenotípico de plantas con niveles alterados de CTHs. ...	123
2.5 Comprobación de la expresión de las proteínas con centros Fe-S en plantas de <i>Arabidopsis</i>	128
2.6 Relación de Cth2 de <i>Arabidopsis</i> con la regulación de los procesos de replicación del DNA y traducción de los mRNAs.	137
II-ESTUDIO DE LAS PLANTAS SOBREENPRESORAS COPT1 ^{OE} EN CONDICIONES DE DEFICIENCIA DE HIERRO.	143
2.7 Estudio fisiológico de plantas silvestres y sobreexpresoras de <i>COPT1</i> en condiciones de deficiencia de hierro.	143
2.8 Expresión de genes relacionados con la homeostasis del hierro en plantas de <i>Arabidopsis</i>	147
2.9 Caracterización de la ruta de los flavonoides en las plantas de <i>Arabidopsis</i> COPT1 ^{OE} en respuesta a la deficiencia de hierro. ...	152

2.10 Estudio de factores reguladores de la deficiencia de hierro.....	156
Discusión Capítulo 2.....	163
Resultados Capítulo 3.....	173
3. ESTUDIO DE LA SOBREENPRESIÓN DEL TRANSPORTADOR DE COBRE DE ALTA AFINIDAD DE <i>ARABIDOPSIS</i> (ATCOPT1) EN <i>ORYZA SATIVA</i>	175
3.1. Caracterización de la respuesta nutricional al cobre en <i>Oryza sativa</i>	175
3.2. Perfil transcriptómico de <i>Oryza</i> e influencia del cobre en la homeostasis del hierro.....	180
3.3. Análisis de la influencia de la expresión ectópica de <i>AtCOPT1</i> en la homeostasis del hierro.....	185
3.4. Fenotipo de las líneas transgénicas sobreexpresoras <i>AtCOPT1</i> en diferentes condiciones de cobre y hierro en el medio.....	193
Discusión Capitulo 3.....	199
DISCUSIÓN GENERAL.....	207
CONCLUSIONES.....	215
BIBLIOGRAFÍA.....	219

ABREVIATURAS

Abreviatura	Definición
3-AT	3-aminotriazol
<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
<i>A. tumefaciens</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
ABA	Ácido abscísico
ANOVA	Análisis de varianza
aRNA	RNA amplificado
ATP	Trifosfato de adenosina
BCS	Ácido batocuprinoico disulfónico
BPDS	Disulfonato de batofenantrolina
BPS	Sulfato de batofenantrolina
BSA	Albúmina de suero bovino
CaMV35S	Promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor
cDNA	DNA complementario
CEN	Centromérico
COL	Columbia
CTD	Dominio carboxilo terminal
Cys	Cisteína
d	Días
DE	Desviación estándar
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTPS	Desoxinucleótidos trifosfato
DTT	Ditioitritol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ácido etildiaminotetraacético
Ferrocina	3-(2-piridil)-5,6 bis (4-ácido fenol sulfónico)-1,2,4-triacina
gDNA	DNA genómico
GUS	β -glucuronidasa

h	Horas
HA	Epítipo de la hemaglutinina humana del virus de la influenza
His	Histidina
IATA	<i>Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos</i>
IBMCP	<i>Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas</i>
ICP-MS	Espectroscopia de masas con plasma de acoplamiento inductivo
IVIA	<i>Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias</i>
LB	Medio Luria-Bertani
LEU1	Leucina
MES	Ácido 4-morfolino-etano-sulfónico
MI	Membrana interna
MP	Membrana plasmática
MS	Medio Murashige-Skoog
OD ₆₀₀	Densidad óptica 600 nm
P.F.	Peso fresco
P.S.	Peso seco
p/v	peso / volumen
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PEG	Polietilenglicol
PMSF	Fluoruro de fenilmetanosulfonilo
qPCR	PCR cuantitativa
RE	Reticulo endoplasmático
RNA	Ácido ribonucleico
ROS	Especies reactivas del oxígeno
rpm	Revoluciones por minuto
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SAM	<i>S</i> -adenosilmetionina
SAP	Fosfatasa alcalina de gamba

SC	Medio sintético completo
SCSIE	<i>Servei Central de Suport a la Investigació Experimental</i>
SEM	Error estándar de la media
sqPCR	PCR semicuantitativa
TAE	Tris-acetato-EDTA
TAIR	Fuente de información de <i>Arabidopsis</i>
TBS	Solución salina tamponada con Tris
TCA	Ácido tricloroacético
TEMED	N, N, N', N'-tetrametiletilendinamina
TF	Factor de transcripción
TMD	Dominio transmembrana
Tris	2-amino-2 hidroximetil-1, 3-propanodiol
TTBS	Solución salina tamponada con Tris y Tween
URA3	Uracilo
UTR	Región no traducible
UV	Ultravioleta
V	Voltios
v/v	volumen/volumen
WT	Silvestre
YPD	Medio rico para crecimiento levadura

- Genes de *Saccharomyces cerevisiae*

Abreviatura Definición

<i>ACO1</i>	<i>Aconitasa</i>
<i>ACT1</i>	<i>Actina</i>
<i>BIO2</i>	<i>Biotina sintasa</i>
<i>CRS5</i>	<i>Metalotioneína</i>
<i>CTH1</i>	<i>Proteína de unión con dedo de zinc en tándem</i>
<i>CTH2</i>	<i>Proteína de unión con dedo de zinc en tándem</i>
<i>CTR1</i>	<i>Transportador de cobre de alta afinidad</i>
<i>CTR3</i>	<i>Transportador de cobre de alta afinidad</i>
<i>CUP1</i>	<i>Metalotioneína</i>
<i>FET3</i>	<i>Multicobre-oxidoreductasa de hierro</i>
<i>FIT1</i>	<i>Facilitador del transporte de hierro</i>
<i>FIT3</i>	<i>Facilitador del transporte de hierro</i>
<i>FTR1</i>	<i>Transportador de hierro de alta afinidad</i>
<i>HEM15</i>	<i>Ferroquelatasa, ruta de biosíntesis de grupos hemo</i>
<i>LEU1</i>	<i>Isopropilmalato isomerasa, ruta de biosíntesis de leucina</i>
<i>RLI1</i>	<i>Inhibidor de la RNAsa L, biogénesis de ribosomas</i>
<i>SDH4</i>	<i>Subunidad de succinato deshidrogenasa</i>
<i>TRX2</i>	<i>Tiorredoxina</i>

- Genes de *Arabidopsis thaliana*

Abreviatura Definición

<i>ACT</i>	<i>Actina</i>
<i>ARNP</i>	<i>Plantacianina</i>
<i>AtCOPT1</i>	<i>Transportador de cobre de alta afinidad de Arabidopsis</i>
<i>bHLH</i>	<i>Factor transcripcional tipo hélice vuelta hélice</i>
<i>BTS</i>	<i>Brutus, E3 ligasa</i>

<i>CAD8</i>	<i>Cinamoil-alcohol deshidrogenasa 8</i>
<i>CCR1</i>	<i>Cinamoil CoA reductasa 1</i>
<i>CTH</i>	<i>Proteína de unión a RNA con dedos de zinc en tándem</i>
<i>COPT</i>	<i>Transportador de cobre de alta afinidad</i>
<i>CRK21</i>	<i>RLK rico en cisteína- (receptor-like protein kinase) 21</i>
<i>F6´H1</i>	<i>2-oxoglutarato dioxigenasa dependiente de Fe(II)</i>
<i>FER</i>	<i>Ferritina</i>
<i>FIT</i>	<i>Factor de transcripción inducido por deficiencia de Fe</i>
<i>FRO</i>	<i>Óxido reductasa de hierro.</i>
<i>IRT1</i>	<i>Transportador de hierro</i>
<i>ISPG</i>	<i>4-hidroxi-3-metilbutano-2-enil difosfato sintasa</i>
<i>At-NEET</i>	<i>Proteína del grupo NEET</i>
<i>NIR1</i>	<i>Nitrito reductasa 1</i>
<i>RAD3</i>	<i>Respuesta hipersensibilidad a ultra violeta 3</i>
<i>RAD8D</i>	<i>Factor de elongación de la traducción EF-Tu</i>
<i>SDH2-2</i>	<i>Succinato deshidrogenasa 2-2</i>
<i>SOME-like</i>	<i>Proteína dedos de Zn en tándem CCCH, Factor TZF5</i>
<i>TSO</i>	<i>Subunidad pequeña de la ribonucleótido reductasa</i>
<i>UBQ</i>	<i>Ubiquitina</i>
<i>UPB</i>	<i>Factor de transcripción Upbeat</i>

- Genes de *Oryza sativa*

Abreviatura	Definición
--------------------	-------------------

<i>ACT1</i>	<i>Actina</i>
<i>OsATX1</i>	<i>Metalocarabina de cobre antioxidantes 1</i>
<i>OsCDGSH</i>	<i>Dominio Fe-S, homologa de At-NEET</i>
<i>OsCOPT</i>	<i>Transportador de cobre de alta afinidad de arroz</i>
<i>OsCSD</i>	<i>Superóxido dismutasa deCu/Zn</i>
<i>OsFSD</i>	<i>Superóxido dismutasa deFe</i>

<i>OsHRZ</i>	<i>Hemerythrin motif-containing really interesting new gene- and zinc-finger</i>
<i>OsIDEF1</i>	<i>Factor de unión 1: elemento que responde a la deficiencia de hierro</i>
<i>OsIRO2</i>	<i>Factor de Transcripción 2 relacionado con hierro</i>
<i>OsMTs</i>	<i>Metalotioneína</i>
<i>OsNAAT</i>	<i>Nicotianamina amino transferasa</i>
<i>OsNAS</i>	<i>Nicotianamina sintasa</i>

RESUMEN

En el presente trabajo se ha estudiado el efecto que tiene la desregulación de la entrada de Cu^+ mediante la alteración y sobreexpresión de transportadores de cobre de alta afinidad, tipo Ctr en tres organismos: *Saccharomyces cerevisiae*, *Arabidopsis thaliana* y *Oryza sativa*. Los resultados obtenidos confirman que las homeostasis del cobre y del hierro están relacionadas, ya que la alteración de la entrada de Cu^+ en las células afecta a diferentes aspectos de la percepción y el transporte de hierro.

En el caso de *Saccharomyces cerevisiae*, se ha comprobado que la falta de control en la entrada de cobre en la cepa mutante CTR1 Δ 300 provoca cambios en la expresión de genes como los que codifican la ferroxidasa Fet3 y el transportador de hierro Ftr1. Además, la cepa CTR1 Δ 300 presenta un mayor contenido de hierro que la cepa control. Sin embargo, los centros Fe-S se encuentran dañados y su expresión está alterada, produciéndose como consecuencia un menor consumo de O_2 en la cepa CTR1 Δ 300.

Los resultados obtenidos de la sobreexpresión de COPT1 en la planta modelo *Arabidopsis thaliana*, indican que la alteración de la entrada de cobre provoca cambios en la expresión de genes clave en la respuesta a la deficiencia de hierro. La incorporación del metal, tanto a través de la estrategia I, como mediante la secreción de cumarinas está inhibida en las plantas sobreexpresoras del transportador COPT1 que, como consecuencia, presentan menor contenido de hierro. Esta dificultad para la incorporación de hierro podría deberse a la falta de expresión de un factor de transcripción bHLH, *FIT*, y a la pérdida de actividad de la E3 ubiquitin ligasa, BTS, ya que ambos factores son clave en la activación de la respuesta a deficiencia de hierro.

Por último, en la planta de interés agronómico *Oryza sativa*, se ha comprobado que la sobreexpresión heteróloga del transportador COPT1 de *Arabidopsis* es funcional, lo que provoca una mayor entrada de Cu en la planta. Como consecuencia de dicha entrada, se altera la expresión de genes que codifican componentes de la homeostasis del hierro como la ferritina o los factores transcripcionales *IRO2* y *HRZ1*, produciendo un fenotipo interesante desde el punto de vista biotecnológico con mayor contenido de hierro en hojas jóvenes y semillas.

FIGURAS

- Figura I.1 Reacciones de Haber-Weiss y Fenton.
- Figura I.2 Homeostasis del cobre en *S. cerevisiae*.
- Figura I.3 Esquema representativo de la homeostasis del cobre en plantas.
- Figura I.4 Esquema de la función del Factor SPL7 en función del cobre presente en el medio.
- Figura I.5 Homeostasis del hierro en la levadura *S. cerevisiae*.
- Figura I.6 Estrategias de adquisición del hierro en plantas.
- Figura I.7 Transportadores de hierro en los órganos en la célula de *A. thaliana*.
- Figura I.8 Regulación de la expresión génica en la homeostasis de hierro en *Saccharomyces cerevisiae*.
- Figura I.9 Reguladores transcripcionales en deficiencia de hierro en plantas.
- Figura I.10 Estructura de las proteínas BTS y HRZ1/2.
- Figura I.11 Esquema de la respuesta a deficiencia de hierro en plantas.
- Figura I.12 Esquema de la acción de los factores de regulación génica IDEF1 y HRZ de *O. sativa* en función del hierro del medio.
- Figura I.13 Transportadores de alta afinidad Ctr.
- Figura I.14 Esquema representativo de los transportadores Ctr de *Saccharomyces*.
-
- Figura M.1 Esquema representativo del ensayo de triple híbrido para testar la interacción de la proteína Cth2 con el fragmento 3'UTR del RNA.
- Figura M.2 Fragmentos del extremo 3'UTR clonados de los genes *Plantacianina (ARPM)* y *Lacasa 17 (LAC17)*.
- Figura M.3 Combinaciones de las transformaciones realizadas para llevar a cabo el ensayo de triple híbrido.
-
- Figura R1.1 Esquema representativo de la estructura del transportador de cobre de alta afinidad Ctr1 silvestre (WT) y mutante (CTR1Δ300) en condiciones de exceso de cobre en el medio.
- Figura R1.2 Caracterización de la cepa CTR1Δ300 en diferentes medios sólidos mediante ensayos de gotas.
- Figura R1.3 Curvas de crecimiento de las cepas WT y CTR1Δ300 en medio líquido.
- Figura R1.4 Viabilidad de la levadura WT y CTR1Δ300 en medio sólido suplementado con CuSO₄.
- Figura R1.5 Contenido de cobre de la levadura silvestre y la cepa mutante CTR1Δ300.
- Figura R1.6 Expresión génica mediada por exceso de cobre en las cepas WT y CTR1Δ300.
- Figura R1.7 Contenido de hierro de la levadura silvestre y la cepa mutante CTR1Δ300.
- Figura R1.8 Expresión de genes del regulón de hierro en la levadura silvestre y la cepa mutante CTR1Δ300.

- Figura R1.9 Expresión génica de la cepa WT y CTR1Δ300.
- Figura R1.10 Expresión de *CTH2* en la cepa WT y CTR1Δ300.
- Figura R1.11 Esquema de las transformaciones utilizadas para caracterizar el papel de Cth2.
- Figura R1.12 Expresión génica en la cepa *cth1Δcth2Δ*.
- Figura R1.13 Expresión de genes implicados en transferencia de electrones y con centros Fe-S.
- Figura R1.14 Comprobación del daño en los centros Fe-S.
- Figura R1.15 Estudio de la respiración en la cepa de *S. cerevisiae* CTR1Δ300.
- Figura R1.16 Caracterización del transportador CTR1Δ300 en medio sólido con quelante de hierro.
- Figura R1.17 Estudio estrés oxidativo en la cepa CTR1Δ300.
-
- Figura R2.1 Alineamiento de la región de los dedos de zinc de las proteínas tipo Cth de levadura y de *Arabidopsis*.
- Figura R2.2 *Funciones Moleculares* enriquecidas en los genes con secuencias ARE en *Arabidopsis thaliana*.
- Figura R2.3 Ensayo de interacción proteína-RNA por triple híbrido en levadura.
- Figura R2.4 Expresión del gen *CTH2* en plantas de *Arabidopsis* en diferentes condiciones de metales.
- Figura R2.5 Características fisiológicas de las plantas con la expresión de *CTH1* y *CTH2* alteradas.
- Figura R2.6 Expresión génica posibles dianas de Cth2 en plantas con genes *CTH* alterados.
- Figura R2.7 Expresión del gen *CTH2* en plantas de *Arabidopsis thaliana* silvestres y sobreexpresoras de COPT1.
- Figura R2.8 Consumo de O₂ en las raíces de plantas de *Arabidopsis*.
- Figura R2.9 Expresión de los genes con centros Fe-S en escala de hierro en plantas WT y C1^{OE}.
- Figura R2.10 Expresión génica en plantas WT y C1^{OE} de genes con centros Fe-S.
- Figura R2.11 Expresión de los genes *IPSG* y *RAD3* en plantas WT y C1^{OE}.
- Figura R2.12 Expresión génica del factor TZF *SOME-like*.
- Figura R2.13 Expresión del gen *TSO2* en plantas de *Arabidopsis thaliana* con diferente aporte de metales en el medio de crecimiento.
- Figura R2.14 Expresión de los genes *CRK21* y *RAD8-D* en plantas WT y C1^{OE}.
- Figura R2.15 Caracterización fisiológica de las plantas C1^{OE} en deficiencia de hierro.
- Figura R2.16 Contenido de hierro de las plantas WT y C1^{OE}.
- Figura R2.17 Expresión de los genes que codifican ferritinas en plantas WT.
- Figura R2.18 Caracterización de la expresión y actividad de la ferroxidasa en plantas de *Arabidopsis thaliana*.
- Figura R2.19 Expresión del transportador de hierro *IRT1*.

- Figura R2.20 Fluorescencia de las raíces de las plantas de *Arabidopsis* en respuesta a la deficiencia de hierro.
- Figura R2.21 Longitud de la raíz de plantas de *Arabidopsis* en medios con diferente aporte de hierro y pH.
- Figura R2.22 Expresión de los genes de la ruta de las cumarinas y las ligninas.
- Figura R2.23 Expresión génica del factor *UPBEAT1* en plantas sobreexpresoras de C1^{OE}.
- Figura R2.24 Expresión del factor *UPBEAT1* en diferente aporte de FeSO₄ en el medio de crecimiento.
- Figura R2.25 Expresión génica del factor *BTS* en plantas sobreexpresoras de C1^{OE}.
- Figura R2.26 Expresión de los factores bHLH en plantas silvestres con diferentes concentraciones de FeSO₄ en el medio.
- Figura R2.27 Expresión génica de los factores reguladores de la transcripción tipo bHLH: *FIT1* y el grupo Ib.
- Figura D2.1 Esquema representativo del efecto del cobre en la respuesta del sensor BTS en plantas C1^{OE}.
- Figura R3.1 Caracterización de plantas de *O. sativa* cultivadas en medios con diferentes concentraciones de cobre.
- Figura R3.2 Concentración de hormonas en plantas de *O. sativa*.
- Figura R3.3 Expresión de genes implicados en la homeostasis metálica a diferentes concentraciones de cobre.
- Figura R3.4 Expresión génica en plantas WT con diferente aporte de cobre.
- Figura R3.5 Expresión génica en plantas WT con diferente aporte de cobre.
- Figura R3.6 Expresión de *AtCOPT1* en plantas transgénicas de *O. sativa*.
- Figura R3.7 Longitud del brote y la raíz de *O. sativa* en plántulas WT y C1^{OE}.
- Figura R3.8 Concentración de metales en plantas de *O. sativa* C1^{OE} cultivadas en medios con diferente contenido de cobre.
- Figura R3.9 Expresión relativa de los genes *OsCOPT1*, *OsCOPT7*, *OsMT1c*, *OsFd1*, *OsFER2*, *OsHRZ1*, *OsHRZ2* y *OsIRO2* en plantas de arroz WT y las sobreexpresoras C1^{OE}.
- Figura R3.10 Expresión de los genes SOD en plantas de arroz WT y sobreexpresoras C1^{OE}.
- Figura R3.11 Caracterización de plantas C1^{OE} de *O. sativa* cultivadas en medio con diferente contenido de cobre y hierro.
- Figura R3.12 Caracterización de plantas C1^{OE} de *O. sativa* cultivadas en invernadero.
- Figura R3.13 Concentración de metales de plantas de arroz WT y sobreexpresoras C1^{OE}.
- Figura R3.14 Tinción de Perl's de granos de arroz sin pulir de plantas WT y C1^{OE}.
- Figura R3.15 Concentración de metales en plantas C1^{OE} de *O. sativa* cultivadas en invernadero.
- Figura D3.1 Esquema representativo del efecto del cobre en la respuesta del sensor HRZ en plantas C1^{OE}.

TABLAS

- Tabla I.1 Principales características de los transportadores tipo Ctr de *Arabidopsis*.
- Tabla I.2 Características principales de los transportadores tipo Ctr de *O. sativa*.
- Tabla M.1 Listado de plásmidos utilizados.
- Tabla M.2 Cepas de *Saccharomyces cerevisiae* utilizadas
- Tabla M.3 Listado de cebadores utilizados en sqPCR
- Tabla M.4 Listado de cebadores utilizados en *S. cerevisiae* en qPCR
- Tabla M.5 Listado de cebadores utilizados en plantas en qPCR
- Tabla R2.1 Número de secuencias ARE en los genes de Arabidopsis.
- Tabla R2.2 Genes de *Arabidopsis thaliana* que codifican proteínas relacionadas con el Fe con secuencias ARE
- Tabla R2.3 Genes de *Arabidopsis thaliana* que codifican proteínas relacionadas con el Cu que poseen secuencias ARE.
- Tabla R2.4 Genes con centros Fe-S estudiados en el presente trabajo.
- Tabla R2.5 Genes de *Arabidopsis thaliana* con dos motivos *Tandem Zinc Finger*.
- Tabla R2.6 Genes que codifican las diferentes subunidades RNR en *Arabidopsis thaliana*.
- Tabla R2.7 Genes relacionados con hierro que se encuentran alterados en el análisis de expresión génica global.
- Tabla R3.1. Genes expresados diferencialmente bajo exceso de Cu.
- Tabla DG.1 Comparación de los cambios observados por la sobreexpresión del transportador de Cu de alta afinidad tipo Ctr entre *S. cerevisiae* y *A. thaliana*.
- Tabla DG.2 Comparación de las características observadas en las plantas de *A. thaliana* y *O. sativa* al sobreexpresar el transportador de Cu COPT1.
- Tabla DG.3 Comparación de la expresión de los genes reguladores de respuesta a deficiencia de hierro y sus dianas en las plantas de *A. thaliana* y *O. sativa* en respuesta a los niveles de Cu del medio.
- Tabla DG.4 Resumen de la expresión de los genes reguladores y de sus dianas en plantas de *A. thaliana* y *O. sativa* sobreexpresoras de COPT1.

INTRODUCCIÓN





1. IMPORTANCIA DEL COBRE Y DEL HIERRO EN BIOLOGÍA.

El cobre (Cu) y el hierro (Fe) son metales de transición con propiedades redox. Ambos presentan una configuración electrónica que les permite formar complejos de coordinación con moléculas orgánicas, actuando como cofactores esenciales en numerosas proteínas (Lippard y Berg, 1994). La biodisponibilidad de ambos metales ha cambiado a lo largo de la evolución de la atmósfera. En el origen de la vida, las condiciones anaeróbicas generaron una atmósfera reductora donde el Cu se encontraba en forma insoluble (Cu^+) y el Fe en su forma soluble (Fe^{+2}), siendo éste último utilizado como principal cofactor. Sin embargo, la aparición de la fotosíntesis oxigénica, llevada a cabo por los microorganismos fotosintéticos, y el subsecuente aumento del O_2 desencadenaron el cambio de las condiciones de la atmósfera que pasaron a ser oxidantes. Con ello, se produjo el cambio de la biodisponibilidad del Fe que pasó a la forma insoluble (Fe^{+3}), mientras que el Cu pasó a la forma soluble (Cu^{+2}). Así, se propició el aumento en la biodisponibilidad del Cu para ser utilizado como cofactor, pasando a realizar algunas funciones previamente desarrolladas por el Fe (Crichton y Pierre, 2001). De hecho, en *Arabidopsis thaliana* se ha observado que en condiciones de deficiencia de Cu se lleva a cabo la sustitución de algunas proteínas de Cu prescindibles, por otras metaloproteínas de Fe, que cumplen la misma función biológica, como la superóxidodismutasa de Cu/zinc que es sustituida por la de Fe (Abdel-Ghany *et al.*, 2005a).

La esencialidad del Cu y el Fe se debe a que forman parte de los sitios catalíticos de numerosas enzimas imprescindibles implicadas en la transferencia electrónica, característica que también hace que sean potencialmente tóxicos para las células. La capacidad de transferencia de electrones provoca que si estos metales se encuentran libres en la célula puedan facilitar la formación de especies reactivas del oxígeno (ROS) mediante las reacciones acopladas de Haber-Weiss y Fenton (Figura I.1). Las ROS producen daños a diferentes niveles, ya que son capaces de reaccionar con las proteínas, el DNA o los lípidos de las membranas celulares, alterando la función de las mismas (Halliwell y Gutteridge, 1984). Por esta razón,

Introducción

la entrada de ambos metales en la célula ha de estar muy bien regulada para evitar que se produzcan dichos daños.

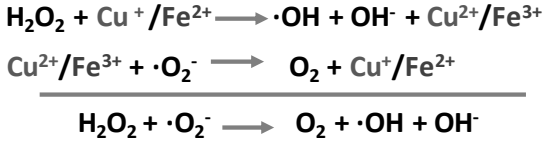


Figura I.1. Reacciones de Haber-Weiss y Fenton. Reacción acoplada que puede dar lugar a la formación de especies reactivas del oxígeno por la interacción del agua oxigenada (H₂O₂) con el Cu y el Fe en estado reducido.

Cabe destacar la importancia de la regulación de la homeostasis de ambos metales, tanto a nivel celular, como del organismo completo y por las implicaciones que tiene en agricultura y en la salud.

1.1. Deficiencia de cobre.

La deficiencia de Cu en el suelo se suele producir por un lavado excesivo de suelos arenosos pobres en Cu, un exceso de cal, un aumento de pH o la presencia de materia orgánica que dificulte la captación del Cu (Märschner, 2012). La deficiencia de Cu produce múltiples problemas en agricultura porque afecta principalmente a la fase reproductiva, aumentando la esterilidad, disminuyendo la formación de frutos y reduciendo la viabilidad de las semillas (Märschner, 2012). Las plantas con deficiencia de Cu son en general más pequeñas y presentan menos actividad fotosintética, ya que se encuentra alterada la cadena de transporte electrónico (Märschner, 2012). Por lo tanto, la deficiencia de Cu en plantas provoca pérdidas en agricultura al disminuir la productividad y el valor nutricional de los cultivos.

En humanos, la deficiencia de Cu se puede producir por la falta de ingesta, problemas en la absorción o trastornos hereditarios. Un ejemplo de enfermedad hereditaria es la enfermedad de Menkes, ligada al cromosoma X, por una mutación en el gen que codifica la ATPasa de Cu, ATP7A (Schlief *et al.*, 2006). La deficiencia

de Cu provoca anemia, problemas cardiacos o defectos neurológicos (Uauy *et al.*, 1998; Ross *et al.*, 2014).

1.2 Deficiencia de hierro.

La deficiencia de Fe en los suelos no se debe a la falta del metal en la corteza terrestre, ya que es uno de los más abundantes, sino a su baja biodisponibilidad. Esto se debe a que se encuentra en su estado oxidado, y al igual que con el Cu, en los suelos alcalinos se encuentra mucho menos disponible, ya que a $\text{pH} > 7$ su solubilidad disminuye, siendo aún más difícil su absorción (Alloway, 1995). Así pues, la deficiencia de Fe es frecuente y provoca graves síntomas en las plantas, el más conocido de los cuales es la clorosis foliar y la reducción de la fertilidad. Al mismo tiempo, se reduce el rendimiento de los cultivos y la materia seca producida. Además de la falta de absorción, existen otras causas que pueden provocar la deficiencia de Fe, como son la sustitución por otros metales, como el Cu, ya que éste puede ocupar el lugar del Fe en las uniones a enzimas, cambiando su función, siendo detectado por los organismos como una falta de Fe (Alloway, 1995).

En humanos, la deficiencia de Fe provoca uno de los desórdenes nutricionales más extendidos del mundo: la anemia ferropénica. Según la organización mundial de la salud, el 25 % de la población mundial padece anemia ferropénica (<http://www.who.int/es/>). La anemia afecta a más de dos mil millones de personas en el mundo, con mayor prevalencia en las mujeres que en los hombres, y siendo las poblaciones más sensibles los niños y mujeres embarazadas, cuyo requerimiento de hierro es mayor (<https://www.who.int/nutrition>). Dentro de la distribución mundial, las zonas más afectadas son el sudeste asiático, África y la zona este del área mediterránea (<https://www.who.int/nutrition>). Se han descrito otras enfermedades neurodegenerativas relacionadas con la deficiencia de Fe como la ataxia de Friedreich o la ceruloplasminemia (Rampey *et al.*, 2006).

1.3 Exceso de cobre.

El exceso de Cu en plantas puede producirse de forma natural en los suelos de cultivo o inducida por el uso excesivo de fungicidas o por la acción industrial y urbana (Märschner, 2012). Las plantas presentan diferente tolerancia a la cantidad de Cu en el medio de crecimiento, pero en todas ellas un nivel elevado de Cu conlleva una disminución del crecimiento de las raíces. Se han desarrollado diferentes estrategias para detoxificar los suelos con elevadas concentraciones de Cu. Una mayor cantidad de Cu en el suelo implica una mayor incorporación del mismo a las plantas. Por ello, las plantas desarrollan diversas estrategias para combatir el efecto tóxico del Cu, desde acumularlo en la vacuola, a limitar la entrada del mismo o quelarlo mediante fitoquelatinas o metalotioneínas que minimicen la producción de especies reactivas del oxígeno (Märschner, 2012).

En los humanos, el exceso de Cu puede producirse por exposición prolongada al metal o por enfermedades hereditarias como la enfermedad de Wilson, provocada por mutaciones en la ATPasa ATP7B, homóloga a la ATPasa de la enfermedad de Menkes, que provoca una acumulación de Cu en los hepatocitos y, posteriormente, en el resto del organismo (Reddy *et al.*, 2000; Schlieff *et al.*, 2006). La alteración de otras cuproproteínas también provoca patologías, como enfermedades neurodegenerativas, tales como el Alzheimer o la enfermedad de Creutzfeldt-Jacob (Crouch *et al.*, 2007; Westergard *et al.*, 2007).

1.4 Exceso de hierro.

El exceso de Fe es un problema que se suele producir sobretodo en plantas que crecen en suelos anegados. Por lo tanto, es uno de los problemas asociados al cultivo del arroz. El exceso de Fe provoca daño en los tejidos fotosintéticos debido a la formación de ROS en los cloroplastos (Märschner, 2012).

En humanos, al igual que en plantas, el exceso de Fe provoca estrés oxidativo, debido a la formación de radicales libres que acaban dañando tejidos y provocando

fibrosis. Diversas enfermedades tanto genéticas como adquiridas pueden producir la acumulación de Fe, como por ejemplo la hemocromatosis, que ocasiona cambios patológicos (Beutler *et al.*, 2003).

2 RED HOMEOSTÁTICA DEL COBRE.

2.1. Incorporación del cobre en las células.

2.1.1 LEVADURAS

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* es un excelente modelo de estudio, ya que es un organismo eucariota, a partir del cual se han podido identificar proteínas homólogas en humanos.

Dado que el Cu es un metal que tiene gran capacidad de donar y aceptar electrones, lo que lo hace al mismo tiempo, esencial y potencialmente tóxico, la entrada del metal en la célula está muy regulada. Generalmente, al encontrarse en forma oxidada como Cu^{+2} , el Cu puede entrar en el interior celular a través de los transportadores de cationes divalentes como Fet4 (Hassett *et al.*, 2000). Pero para controlar de forma específica la entrada de Cu^{+} , en esta levadura, se incorpora a través de los transportadores de alta afinidad tipo Ctr (Copper transporter). Principalmente, la entrada de Cu se produce mediante dos transportadores conocidos como Ctr1 y Ctr3 (Labbé y Thiele, 1999). Estos transportadores introducen el Cu en forma de Cu^{+} , por lo que es necesario que el Cu^{+2} sea reducido a Cu^{+} en el exterior celular antes de ser introducido en el citosol a través de Ctr. Existen diversas metalorreductasas en la membrana plasmática, conocidas como Fre1 y Fre2, que llevan a cabo dicha función reductora (Dancis *et al.*, 1994; Knight *et al.*, 1996; Georgatsou *et al.*, 1997).

2.1.2 PLANTAS

Al igual que ocurre en la levadura *S. cerevisiae*, el Cu se encuentra en forma de Cu^{+2} en el suelo, en esta forma puede entrar a través de los transportadores de cationes divalentes tipo ZIP (Wintz *et al.*, 2003). Pero en condiciones de deficiencia de metal y para lograr especificidad, en plantas el Cu es introducido por los transportadores de alta afinidad tipo Ctr, llamados COPT (del inglés *copper transporter*), para lo que ha de ser reducido a Cu^+ (Sancenón *et al.*, 2003; Peñarrubia *et al.*, 2015). Para ello, las plantas también poseen metalorreductasas, conocidas como FRO. Se han caracterizado 8 miembros en *A. thaliana*, entre ellas FRO3 participa en la adquisición de Cu y Fe del suelo (Wu *et al.*, 2005; Mukherjee *et al.*, 2006).

En todo este proceso, juegan también un papel importante las ATPasas tipo AHA (*Arabidopsis* H^+ -ATPasas), presentes en la membrana plasmática y la pared celular, ya que secretan protones que acidifican el pH del exterior para ayudar a la solubilización del Cu y a su asimilación (Santi y Schmidt, 2009).

2.2. Distribución del cobre en el interior celular.

2.2.1. LEVADURAS

Una vez en el interior celular, el Cu ha de ser acomplejado por diversas metalocarabinas para evitar que produzcan daños mediante la formación de ROS, y llevarlo a las proteínas y a los compartimentos donde es necesario (Figura I.2). El Cu es movilizado hasta la mitocondria, para poder llegar a la citocromo C oxidasa, donde es necesario para poder llevar a cabo la transferencia de electrones (Glerum *et al.*, 1996; Labbé y Thiele, 1999). A través de la metalocarabina Atx1, el Cu llega a compartimentos de la ruta de secreción, interacciona con una ATPasa tipo P denominada Ccc2, en la membrana de la red *trans*-Golgi, que bombea el Cu al interior del compartimento donde es necesario, entre otros procesos, para unirse a la multicobre-ferroxidasa y que Fet3 llegue a la membrana plasmática (Lin *et al.*, 1997; Pufahl *et al.*, 1997; Labbé y Thiele, 1999).

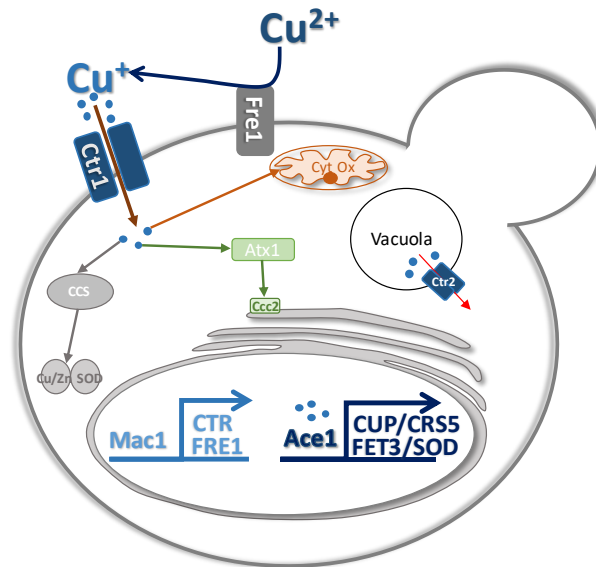


Figura I.2. Homeostasis del cobre en *S. cerevisiae*. Esquema representativo de la homeostasis del Cu en la levadura *S. cerevisiae*, donde se indica la entrada de Cu a través del transportador de Cu de alta afinidad Ctr1 y la distribución a los diferentes compartimentos a través de las diferentes metalocarabinas: Atx1 y CCS. Se muestran también los factores reguladores Mac1 y Ace1, así como sus dianas.

Otro de los destinos del Cu son las superóxido dismutasas de Cu/Zinc (Cu/Zn SOD) del citosol, a las cuales llega a través de la chaperona de Cu CCS (Culotta *et al.*, 1997; Labbé y Thiele, 1999). La forma en la que cada una de las metalocarabinas interacciona con el Cu es diferente, y la eliminación de alguna de ellas provoca problemas únicamente en la ruta en la que participa, por lo que los papeles que ejercen dentro de la homeostasis del Cu en la levadura no son intercambiables (Labbé y Thiele, 1999) (Figura I.2).

La vacuola es uno de los reservorios de Cu. No se conoce cómo llega a ella ni cómo es introducido al lumen vacuolar, pero en condiciones de escasez, el Cu

almacenado en la vacuola es liberado al citosol por el transportador de Cu de alta afinidad Ctr2 (Rees *et al.*, 2004).

2.2.2. PLANTAS

Del mismo modo que en la levadura, en plantas, una vez en el interior celular, dada su gran reactividad y capacidad para formar ROS, el Cu es acompañado por metalocarbinas para evitar daños en la célula, mientras es llevado a los compartimentos diana donde es necesario (Robinson y Winge, 2010) (Figura I.3). Al igual que en levadura, ATX1 es una cuprocarbina que transporta el Cu^+ a RAN1, una ATPasa homóloga a Ccc2 que lo bombea al lumen del retículo endoplásmico (RE), donde formará parte de las cuproproteínas de la ruta de secreción (Hirayama *et al.*, 1999). CCH es otra metalo-carbina que acompaña el Cu y lo lleva a ATPasas de la membrana para ser expulsado (Mira *et al.*, 2001). CCS cede el Cu a la superóxido dismutasa de Cu/Zn (Cu/Zn SOD), tanto del citosol como del cloroplasto (La Fontaine *et al.*, 2002; Pilon *et al.*, 2006). Finalmente, COX17 proporciona el Cu necesario al complejo citocromo C oxidasa en la mitocondria (Balandin y Castresana, 2002). Existen diferentes ATPasas tipo P de metales pesados implicadas en el transporte de Cu a diferentes compartimentos. Entre ellas las ATPasas tipo P transportadoras de Cu^+ , como HMA5, que se localiza en la membrana plasmática de la raíz y exporta el Cu^+ al xilema desde donde se reparte a otros órganos. En condiciones de exceso de Cu, sirve como método de detoxificación, tanto en *Arabidopsis* como en *Oryza sativa* (Andrés-Colás *et al.*, 2006; Kobayashi *et al.*, 2008; Deng *et al.*, 2013). Como hemos mencionado, RAN1

transporta el Cu al interior del ER, donde llegará al receptor de etileno ETR1

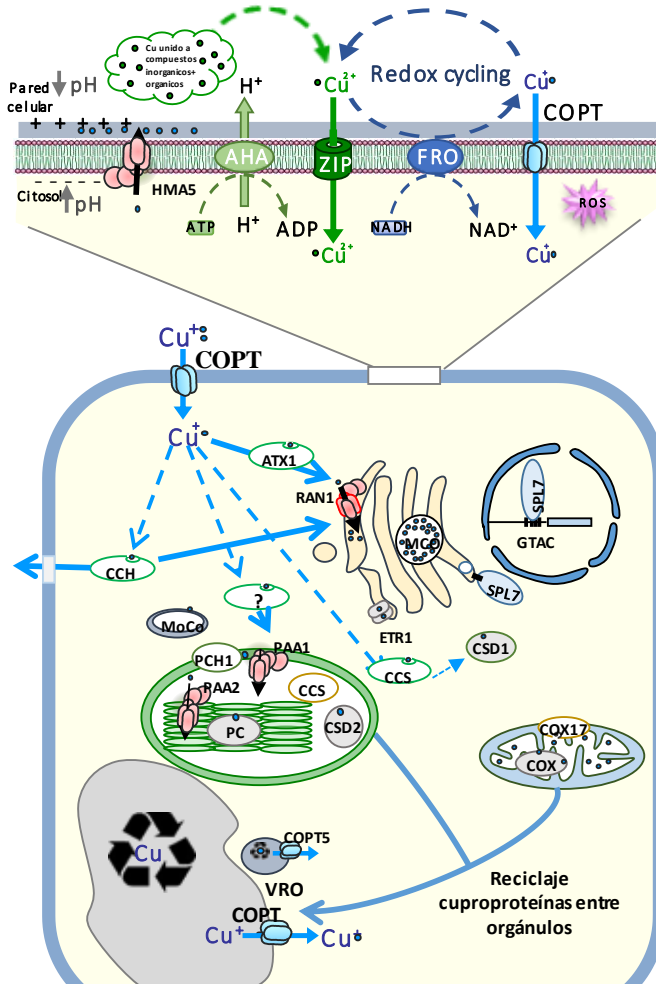


Figura I.3. Esquema representativo de la homeostasis del cobre en plantas.

El Cu entra al interior celular principalmente a través de los transportadores COPT, gracias a la acción de la ATPasa AHA y las reductasas FRO presentes en la membrana plasmática. Una vez en el interior es acomplejado por cupro-carabinas: ATX1 que lo transporta hacia el RE; CCH que los transporta hacia el exterior celular; CCS que lo transporta hacia las CSD (citosol y cloroplasto). El Cu^+ es incorporado a los diferentes compartimentos mediante ATPasas como RAN1 al RE; PAA1 al cloroplasto o HMA5 hacia el exterior celular. Figura modificada de Peñarubia *et al.*, 2015.

(Hirayama *et al.*, 1999) y a las cuproproteínas de la ruta de secreción. Por último, las ATPasas tipo P de *Arabidopsis* PAA1 y PAA2 (localizadas en la membrana interna y en la del tilacoide, respectivamente) bombean el Cu al estroma del cloroplasto y el lumen tilacoidal. El cloroplasto es el órgano que más Cu consume en la planta, donde será incorporado a la plastocianina (PC) y la Cu/Zn SOD (Shikanai *et al.*, 2003; Abdel-Ghany *et al.*, 2005b; Ravet y Pilon, 2013) (Figura I.3).

Además de la distribución intracelular, se ha de producir el transporte a larga distancia de los metales a las diferentes partes de las plantas. Se han identificado compuestos que forman complejos estables con diversos metales, como la nicotianamina (NA) que interacciona con Fe^{+2} , Co^{+2} , Zn^{+2} , Ni^{+2} o Cu^{+2} (Curie *et al.*, 2009). Estos complejos son estables a pH 6,5, un pH aproximado al del xilema, de manera que probablemente el NA actúa como quelante de Cu en éste para su transporte desde la raíz a la parte aérea (Curie *et al.*, 2009). De hecho, la sobreexpresión de la nicotianamina sintasa (NAS) en tabaco produce un aumento en la concentración de Fe, Zn y Cu en hojas y flores (Takahashi *et al.*, 2003). Se han descrito 8 miembros de la familia de transportadores YSL en *Arabidopsis*, de los cuales, YSL1 y YSL3 estarían implicados en llevar el Fe y el Cu, procedente de los tejidos vasculares, hasta las semillas (Waters *et al.*, 2006; Yruela, 2009).

2.3. Regulación de la expresión de los genes implicados en la homeostasis del cobre celular.

2.3.1. LEVADURAS

La regulación de los genes implicados en la adquisición de Cu está determinada por el factor transcripcional Mac1. La proteína Mac1 es una proteína localizada en el núcleo celular, que se une a los elementos *cis*, conocidos como CuRE (Elementos de Respuesta a Cu: TTTGCTC (Labbé *et al.*, 1997), presentes en los genes de la maquinaria de adquisición de Cu. Mac1 posee un dominio de unión a DNA en el extremo amino terminal, además de residuos de cisteínas repartidos a lo largo de su secuencia y dos elementos en tándem en la región carboxilo terminal, que

contienen 5 cisteínas y 1 histidina (C5H) (Jungmann *et al.*, 1993; Graden y Winge, 1997; Labbé y Thiele, 1999). Por lo tanto, en condiciones de deficiencia de Cu, la unión de Mac1 a los CuRE provoca la activación, tanto de las reductasas de la membrana *FRE1* y *FRE7* como de los transportadores de alta afinidad *CTR1* y *CTR3* (Labbé *et al.*, 1997; Yamaguchi-iwai *et al.*, 1997; Jensen *et al.*, 1998; Joshi *et al.*, 1999) (Figura I.2).

En caso de exceso de Cu, Mac1 es degradado y por tanto deja de inducir la maquinaria de adquisición. Por otro lado, se activa el factor transcripcional Ace1 que induce la expresión de otro conjunto de genes destinados a acomplejar el Cu libre (Zhu *et al.*, 1998). Entre los genes cuya expresión activa Ace1 se encuentran las metalotioneínas *CUP1* y *CRS5*, la superóxido dismutasa de Cu/Zn *SOD1* y la multicobre-ferroxidasa *FET3* (Gralla *et al.*, 1991; Jensen *et al.*, 1998; Zhu *et al.*, 1998; Gross *et al.*, 2000; Gaspar-Cordeiro *et al.*, 2018). Todos ellos hacen que el Cu⁺ deje de estar libre en la célula, minimizando el efecto tóxico que puede llegar a producirse por la formación de ROS.

2.3.2. PLANTAS

En plantas la deficiencia de Cu implica la regulación de muchos procesos metabólicos encaminados a destinar el poco Cu presente para su uso en las proteínas esenciales, como la plastocianina (PC). En esta regulación está implicado el factor de transcripción con dedos de zinc SQUAMOSA-PROMOTER BINDING-LIKE PROTEIN 7 (SPL7). SPL7 se une a las secuencias consenso GTAC presentes en los promotores de diversos genes que se expresan en condiciones de deficiencia de Cu (Nagae *et al.*, 2008; Yamasaki *et al.*, 2009). SPL7 regula entre otros a diferentes miRNAs relacionados con el control de genes que codifican a proteínas que utilizan Cu, como *miR398*, *miR397*, *miR408* y *miR857* (Burkhead *et al.*, 2009; Pilon *et al.*, 2009; Yamasaki *et al.*, 2009; Bernal *et al.*, 2012; Garcia-Molina *et al.*, 2013). De

este modo los *miRNAs* ayudan a regular genes no esenciales en momentos de deficiencia de Cu, intercambiando funciones llevadas a cabo por proteínas con Cu por otras proteínas que unen Fe, como es el caso de la superóxidodismutasa de

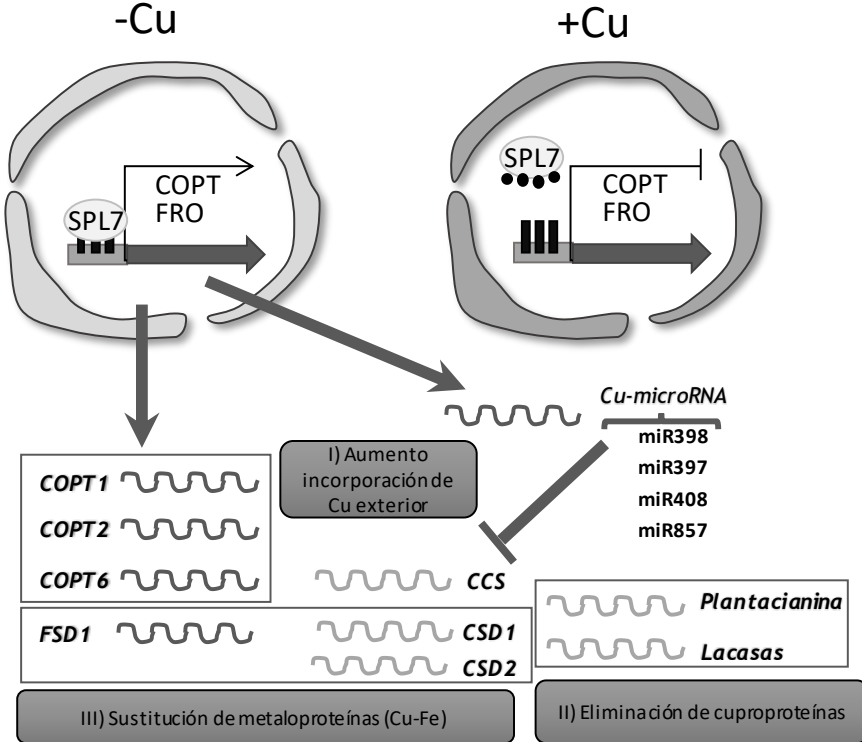


Figura I.4. Esquema de la función del factor transcripcional SPL7 en función del cobre presente en el medio. Esquema de cómo el factor transcripcional SPL7 en condiciones de deficiencia de Cu en el medio (izquierda) se une a las secuencias GTAC presente en los promotores de diversos genes implicados en la adquisición de Cu del exterior celular, como los transportadores COPT y las reductasas de la membrana tipo FRO. A la derecha como en condiciones de suficiencia o exceso del Cu en el medio, éste se une a los dedos de Zn del factor SPL7 impidiendo que pueda unirse a las secuencias de los promotores y activar la transcripción de los mismos. En condiciones de deficiencia se activa la expresión de: I) genes de aumento de la incorporación de Cu desde el exterior (*COPT1*, *COPT2* y *COPT6*); II) eliminación de cuproproteínas no esenciales (*Plantacianina* y *Lacasas*); III) sustitución de metaloproteínas de Cu por las de Fe (*FSD1*, *CSD1* ó *CSD2*). Figura modificada de Perea-García, 2013.

Cu/Zn (CSD) que es sustituida por la superóxidodismutasa de Fe (FSD) gracias al *miR398* que degrada las CSD, o el *miR408* que inhibe la expresión de diversas lacasas (Abdel-Ghany *et al.*, 2005a; Yamasaki *et al.*, 2007; Abdel-Ghany y Pilon, 2008; Ravet y Pilon, 2013; Peñarrubia *et al.*, 2015).

En exceso de Cu, éste desplaza al Zn de los dedos de Zn del factor transcripcional SPL7, impidiendo así la unión al DNA y la transcripción de los genes citados anteriormente, disminuyendo la incorporación y evitando así el efecto tóxico que el metal puede producir (Sommer *et al.*, 2010) (Figura I.4).

3. RED HOMEOSTÁTICA DEL HIERRO.

3.1. Incorporación del hierro en las células.

El Fe es un micronutriente imprescindible para todos los seres vivos y es muy abundante en la corteza terrestre (Märschner, 2012). Sin embargo, el problema de su incorporación reside en que, como se ha descrito en el apartado 1, el Fe se encuentra en su estado oxidado (Fe^{+3}), siendo muy poco soluble a pH fisiológico. Por lo tanto, los organismos han tenido que desarrollar diversas estrategias para incrementar la biodisponibilidad del Fe del medio. En el caso de las plantas, una dificultad añadida es que gran parte de los suelos cultivables son alcalinos, lo que dificulta aún más la biodisponibilidad del Fe presente en la corteza terrestre (Märschner, 2012). A continuación, se explican los métodos empleados para adquirir el Fe por los organismos utilizados en este trabajo.

3.1.1. LEVADURAS

En la levadura *S. cerevisiae*, el Fe puede entrar al interior celular mediante tres sistemas: sistema de reducción de alta afinidad, un sistema de transportadores de sideróforos, o un sistema de baja afinidad (Figura I.5).

- *Sistema reductivo de alta afinidad:* la levadura *S. cerevisiae* posee las metalorreductasas Fre2/Fre3 en la membrana plasmática, que se encargan de reducir el Fe^{+3} a Fe^{+2} , y el Cu^{+2} a Cu^{+} (Gross *et al.*, 2000).

Introducción

Una vez en ese estado, el Fe es introducido a través del complejo Fet3/Frt1 específico del Fe^{+2} . Fet3 se encarga de volver a oxidar el Fe^{+2} a Fe^{+3} y en este estado es introducido en la célula por la permeasa Frt1 (Sanvisens y Puig, 2011).

- *Sistema de transportadores de sideróforos*: la levadura *S. cerevisiae* no posee la capacidad de sintetizar sideróforos (PS) que acomplejen el Fe^{+3} , pero sí posee los transportadores Arn1-4 que son capaces de transportar al interior celular distintos complejos Fe^{+3} -PS (Sanvisens y Puig, 2011).

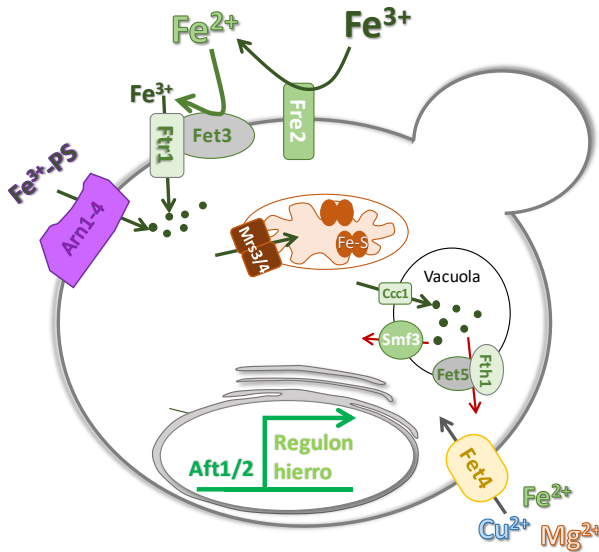


Figura I.5. Homeostasis del hierro en la levadura *S. cerevisiae*. Esquema de los transportadores de Fe en las diferentes membranas de la levadura *S. cerevisiae*: sistema de alta afinidad (en verde) con la reductasa Fre2 y el complejo de transporte Fet3/Frt1; sistema de baja afinidad (amarillo) Fet4; sistema de transportadores de sideróforos (morado) Arn1-4; transportador hacia la mitocondria (naranja) Mrs3/4; transportadores de la vacuola: Ccc1, Smf3 y Fth1/Fet5. El factor de transcripción Aft1/2 regula la activación del regulón de hierro.

- *Sistema de baja afinidad*: en condiciones anaerobias, la multicobre-ferroxidasa Fet3 no puede funcionar, ya que en el proceso de

oxidación del Fe reduce una molécula de oxígeno a agua (De Silva *et al.*, 1995). Por ello, en estas condiciones el Fe entra a través de la permeasa Fet4, que es capaz de introducir el Fe⁺², así como otros metales divalentes como Cu⁺², magnesio o Zn⁺².

3.1.2. PLANTAS

Clásicamente se han descrito dos rutas de adquisición del Fe en plantas (Figura I.6), denominadas:

- *Estrategia I:* se encuentra principalmente en plantas dicotiledóneas y, como en levaduras, se basa en la reducción del Fe⁺³ a Fe⁺². Al igual que en la adquisición del Cu, la planta mediante la ATPasa tipo AHA secreta protones al exterior celular para mejorar la solubilidad del metal. En condiciones de alcalinidad de los suelos, se ha demostrado que *Arabidopsis* secreta productos de la ruta de los fenilpropanoides, conocidos como cumarinas que ayudan a la movilización y adquisición del Fe (Jeong *et al.*, 2017). Posteriormente, las reductasas de la familia FRO, presentes en la membrana plasmática, en concreto FRO2, se encargan de reducir el Fe en las raíces (Robinson *et al.*, 1999). Una vez como Fe⁺², puede ser incorporado al interior celular a través de los transportadores de cationes divalentes tipo ZIP, como IRT1 (Jeong y Guerinot, 2009).
- *Estrategia II:* se encuentra principalmente en plantas monocotiledóneas y se basa en la quelación del metal para incorporarlo. Para ello, estas plantas secretan fitosideróforos (PS), como el ácido mugineico (MA), que acompleja el Fe⁺³ y lo introduce a través de los transportadores de la familia *Yellow Stripe* (YS), como YS1 (Curie *et al.*, 2009).

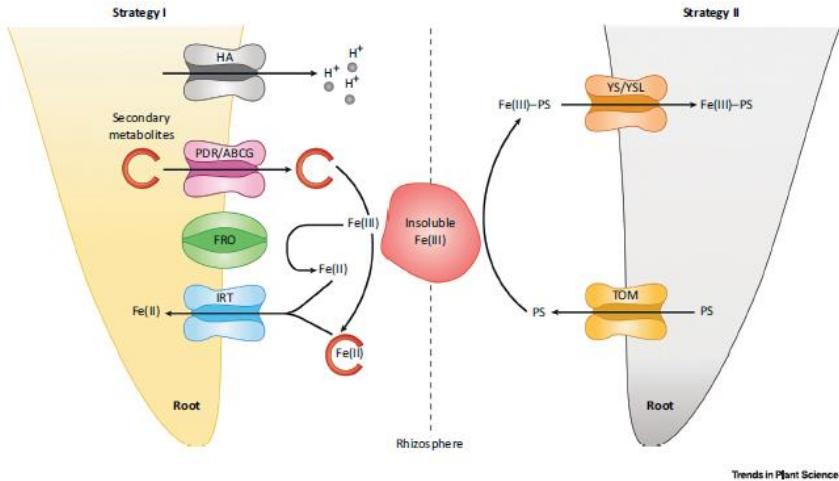


Figura I.6. Estrategias de adquisición del hierro en plantas. Estrategia I (izquierda) de reducción del Fe por FRO2 y posterior incorporación mediante el transportador IRT1 en plantas dicotiledóneas y la Estrategia II (derecha) de la adquisición de Fe mediante quelación con fitosideróforos (PS) e incorporación a través del transportador YS1 en plantas monocotiledóneas (Tomada de Schmidt, 2017).

Sin embargo, en ciertas plantas monocotiledóneas, concretamente en el arroz, se ha observado que pueden utilizar ambas estrategias para la captación de Fe del suelo. Posiblemente se deba al ambiente de anoxia generando en los suelos anegados donde crecen las plantas de arroz, lo que propicia que el Fe se encuentre reducido y favorece la entrada a través del transportador IRT1 (Ishimaru *et al.*, 2006).

3.2. Distribución del hierro en el interior celular.

3.2.1. LEVADURAS

Una vez en el interior celular, el Fe⁺³ ha de ser distribuido a los diferentes compartimentos donde va a ser necesario o almacenado.

- La vacuola es el gran reservorio de Fe. Cuando el Fe se encuentra en suficiencia o exceso es introducido en el lumen vacuolar por el transportador Ccc1. En condiciones de deficiencia de Fe, se inducen diferentes transportadores capaces de liberarlo. Entre ellos, se encuentra una metalorreductasa, Fre6 situada en la membrana vacuolar que reduce el hierro Fe⁺³ a Fe⁺², y posteriormente es liberado en el citosol a través de un sistema de alta afinidad compuesto por Fet5/Fth1, análogos de Fet3/Ftr1 (Urbanowski y Piper, 1999; Singh *et al.*, 2007). También existe un sistema de baja afinidad, Smf3, que se encarga de transportar el Fe y otros metales divalentes (Hassett *et al.*, 2000) (Figura I.5).
- Las mitocondrias son, por otro lado, el orgánulo que más Fe necesita debido a que en ellas se localiza la cadena de transporte de electrones que lleva a cabo la respiración, donde el Fe forma parte de los grupos hemo y los centros Fe-S que se sintetizan en la matriz mitocondrial, pudiendo al mismo tiempo actuar como reservorio de Fe. El Fe entra en la mitocondria a través del transportador Mrs3/Mrs4 (Philpott y Protchenko, 2008; Sanvisens y Puig, 2011).

3.2.2. PLANTAS

Una vez en el interior celular, el Fe ha de ser distribuido por los diferentes compartimentos subcelulares y a toda la planta a través del xilema y el floema viaja hacia las hojas y las semillas, para lo cual es acompañado por el citrato o la NA.

En la membrana de las células del periciclo y la vasculatura existe un miembro de la familia de transportadores de salida de toxinas y multidroga (MATE) denominada FRD3 (del inglés *Ferric reductase defective3*) que funciona introduciendo el citrato en el xilema, por lo que participa en trasladar el Fe desde las raíces a las partes aéreas (Jeong y Guerinot, 2009).

Introducción

La NA se forma por las NAS a partir de S-adenosyl-L-methionine (SAM) y es también un compuesto quelante de Fe y otros metales divalentes (Ishimaru *et al.*, 2010). La NA quela el Fe y lo transporta a través del floema, ya que las plantas deficientes en NAS presentan clorosis en las hojas jóvenes de las plantas (Ling *et al.*, 1999). El Fe-NA se moviliza a los diferentes órganos mediante los transportadores tipo YSL (Curie *et al.*, 2009).

Además, la distribución de los niveles de Fe dentro de las células es importante. Los compartimentos que necesitan más Fe son el cloroplasto y la mitocondria, porque es donde se lleva a cabo la respiración, y junto a la vacuola, son reservas de Fe (Figura I.7). Para mediar el tráfico de Fe a los compartimentos intracelulares existen diferentes transportadores:

- La vacuola es el mayor reservorio de Fe para las semillas en germinación. El transportador que incorpora el Fe^{2+} al interior de la vacuola es VIT1, mientras que de la liberación del Fe

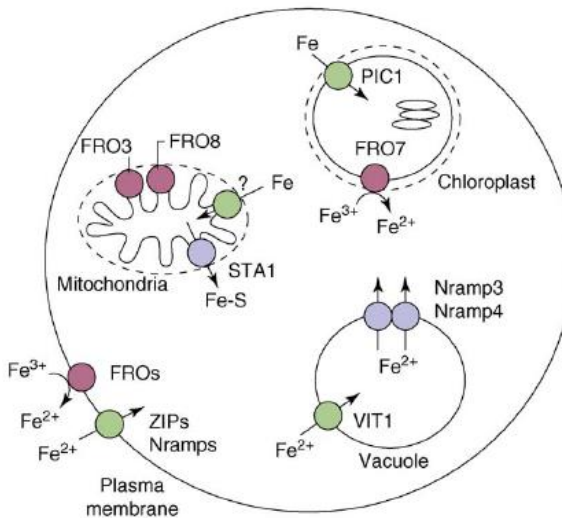


Figura I.7. Transportadores de hierro en los órganos en la célula de *A. thaliana*. Esquema de los transportadores de Fe presentes en las membranas internas de la vacuola, cloroplasto y mitocondria en células de *Arabidopsis*. Tomada de Jeong y Guerinoṡ, 2009.

almacenado se encargan dos transportadores de la familia NRAMP (del inglés *Natural Resistance Associated Macrophage Protein*), NRAMP3 y NRAMP4 (Jeong y Guerinot, 2009) (Figura I.7).

- En el cloroplasto, el Fe forma parte de la cadena de transporte electrónico, la biosíntesis de clorofila, el ensamblaje de los grupos Fe-S, la biosíntesis de los grupos hemo, entre otros procesos. Debido a la posibilidad de formación de ROS, el Fe es acomplejado por la proteína ferritina (FER) que une hasta 4500 átomos de Fe (Jeong *et al.*, 2017). Se han identificado 4 genes *FER* en *Arabidopsis*, aunque *FER1* es el de expresión más abundante (Petit *et al.*, 2001). No se han encontrado transportadores de metales divalentes tipo ZIP en la membrana del cloroplasto. Sin embargo, se ha caracterizado una proteína del tipo permeasa de cianobacterias, la permeasa del cloroplasto 1 (PIC1), que complementa el fenotipo de la levadura *fet3fet4*, y que, por tanto, es un transportador de Fe (Duy *et al.*, 2007) (Figura I.7).
- La mitocondria requiere gran cantidad de Fe, ya que se utiliza como cofactor en la cadena de transporte electrónico y para la biosíntesis de los grupos Fe-S, entre otros procesos. Las ferritinas de la mitocondria también acomplejan el Fe para que no se formen ROS (Zancani *et al.*, 2004). Aunque en *Arabidopsis* se han identificado 3 ortólogos de *S. cerevisiae* de transportadores ABC de la mitocondria 1 (ATM1), todavía no se ha determinado su función en el transporte de Fe a la mitocondria (Jeong y Guerinot, 2009) (Figura I.7).

3.3. Regulación de la expresión de los genes de la homeostasis del hierro.

3.3.1. LEVADURAS

La regulación de la homeostasis del Fe en *S. cerevisiae* es un proceso bien caracterizado. En condiciones de deficiencia de Fe, los factores Aft1 y Aft2 inducen la expresión de un conjunto de genes conocidos como el regulón de hierro, mediante la unión a las secuencias FeRE (elementos de respuesta a hierro),

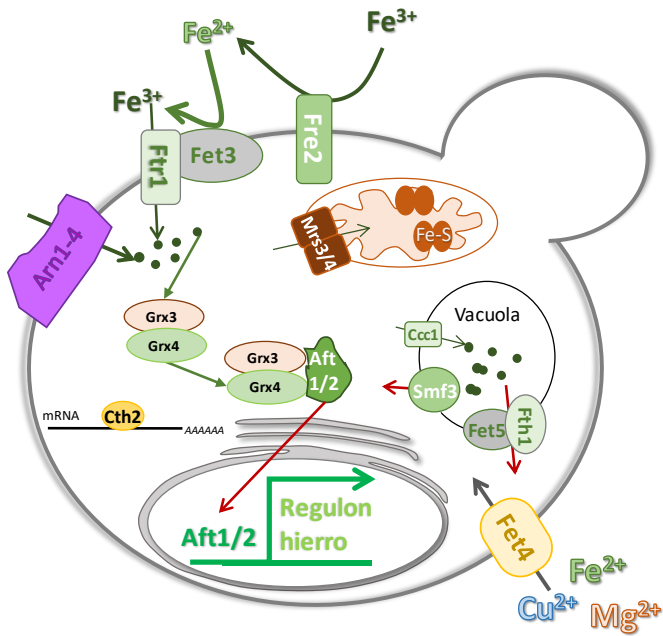


Figura I.8. Regulación de la expresión génica en la homeostasis de hierro en *Saccharomyces cerevisiae*. Regulación de los genes implicados en la homeostasis del Fe en la levadura en función del contenido del metal en el medio. En condiciones de suficiencia de Fe, las glutarredoxinas $Grx3$ y $Grx4$ dimerizan e interaccionan con el factor transcripcional $Aft1/2$, impidiendo que éste entre en el núcleo y active la transcripción de los genes del regulón. En condiciones de deficiencia el factor $Cth2$ se une a la región 3' UTR de genes con secuencias ARE, propiciando la degradación de los mismos y disminuyendo el uso de Fe.

presentes en el promotor de estos genes. Entre los genes que se activan se incluyen las metalorreductasas *FRE2* y *FRE3* y los sistemas de transporte, como *FET3*, *FTR1* y *ARN1-4*. Todo ello está encaminado a aumentar la entrada de Fe al citosol, tanto desde el exterior celular como de los reservorios internos (Figura I.8) (Sanvisens y Puig, 2011).

Cuando aumenta el Fe, la disociación del factor Aft1 del DNA y se para la expresión de los genes del regulón del hierro (Lill *et al.*, 2012).

En condiciones de deficiencia de Fe, la levadura activa una serie de respuestas para remodelar el metabolismo y maximizar así el metal disponible. Los estudios realizados demuestran que se minimizan los procesos no esenciales que requieren Fe, para optimizar el Fe disponible en los procesos imprescindibles. Una de las proteínas implicadas en la regulación del metabolismo del Fe es el factor de regulación postranscripcional Cth2. Cth2 es una proteína con dos dedos de Zn en tándem, perteneciente al grupo de proteínas TZF (del inglés *Tandem Zinc Fingers*), altamente conservados en los eucariotas (Wang *et al.*, 2008). Estas proteínas interaccionan con el RNA y llevan a cabo su regulación postranscripcional. Concretamente se unen a secuencias ricas en AU en el extremo 3'UTR de los mensajeros, conocidas como secuencias ARE y reclutan la maquinaria necesaria para degradar los *mRNAs* (Jang, 2016).

En levadura hay 2 genes identificados conocidos como *CTH1* y *CTH2*, ambos con dos TZF $Cx_8Cx_5Cx_3H$ (Thompson *et al.*, 1996). El factor Cth2 se une a las secuencias ARE de los mensajeros de genes que codifican proteínas implicadas en procesos celulares dependientes de Fe y propicia su degradación e inhibe su traducción (Puig *et al.*, 2005; Ramos-Alonso *et al.*, 2018). El factor Aft1 se une a secuencias FeRE presentes en el promotor del gen *CTH2*, propiciando la activación transcripcional del mismo en condiciones de deficiencia de Fe. Cth2 degrada los mensajeros diana, optimizando el uso del Fe destinado a proteínas imprescindibles. Entre otros, Cth2 inhibe la expresión de sus mRNAs de genes implicados en:

- La cadena de transporte electrónico mitocondrial, inhibiendo principalmente al nivel de los complejos II, III y IV, la aconitasa y la

síntesis de grupos hemo. También produce la inhibición de la síntesis de ácidos grasos insaturados y esteroides, múltiples aminoácidos y cofactores como la biotina o el ácido lipoico, todos ellos procesos dependientes de hierro (Puig *et al.*, 2005).

- El almacenamiento de Fe en las reservas, degradando el mRNA del transportador de Fe hacia la vacuola, *Ccc1* (Puig *et al.*, 2005).
- La síntesis y reparación del DNA. En concreto, *Cth2* provoca la degradación de *WTM1*, que codifica un inhibidor de la enzima ribonucleótido reductasa, activando de esta forma la función de esta enzima dependiente de Fe (Sanvisens *et al.*, 2011).

3.3.2. PLANTAS

La regulación de la deficiencia de hierro en plantas es compleja ya que se lleva a cabo a múltiples niveles y todavía no se conoce completamente (Kobayashi, 2019; Rodríguez-Celma *et al.*, 2019). Se han descrito diferentes tipos de factores reguladores de la deficiencia de Fe en plantas, sobretodo perteneciente a dos familias:

- Los factores transcripcionales bHLH. Los dominios bHLH están compuestos por dos segmentos diferentes; un dominio de 10 a 15 aminoácidos predominantemente básicos y un dominio de alrededor 40 aminoácidos que forman dos α -hélices de carácter anfipático, separadas por una vuelta de longitud variable (HLH) (Pires y Dolan, 2010). Los análisis estructurales muestran que la región básica es la que interacciona con el DNA, mientras que las dos hélices participan en la formación de homo o heterodímeros entre proteínas bHLH, como requisito previo para que se produzca la interacción con el DNA (Jones, 2004). Están muy conservados y se encuentran en la mayoría de los eucariotas, aunque fueron originalmente descritos en animales (Murre *et al.*, 1989). Las proteínas con estos dominios regulan multitud de procesos en levaduras (Robinson y Lopes, 2000), animales (Massari y Murre,

2000; Jones, 2004) o plantas (Ramsay y Glover, 2005; Castillon *et al.*, 2007; Pires y Dolan, 2010).

Arabidopsis posee 158 proteínas con dominios clasificados como bHLH, mientras que en *Oryza* el número de proteínas con éste dominio asciende a 173 (Pires y Dolan, 2010). En plantas se han identificado un total de 26 subfamilias (Pires y Dolan, 2010). En *Arabidopsis* varios miembros bHLH están implicados en la respuesta a deficiencia de Fe. El factor transcripcional FIT (*FER like iron deficiency induced transcription factor*), es una proteína del tipo bHLH (bHLH29) que se une al DNA, homóloga del gen FER, primer gen identificado en la respuesta de deficiencia de Fe en plantas (Ling *et al.*, 2002; Colangelo y Guerinot, 2004; Yuan *et al.*, 2005) FIT necesita otros factores bHLH, concretamente bHLH38 y bHLH39, para inducir la respuesta a deficiencia de Fe (Yuan *et al.*, 2008). Entre los genes que se activan ante la escasez de Fe se encuentran la reductasa *FRO2*, la nicotianamina sintasa 1 (*NAS1*) o el transportador Irt1 a nivel de proteína (Colangelo y Guerinot, 2004). Se han descrito otros dos factores bHLH: *bHLH100* y *bHLH101*, que responden a la deficiencia de Fe de modo independiente de FIT (Sivitz *et al.*, 2012).

En arroz, el homólogo de bHLH38y bHLH39, conocido como OsIRO2, regula la expresión de genes implicados en la homeostasis del Fe, activando la expresión de los genes de las nicotianamina sintasas 1 y 2 (*OsNAS1* y *OsNAS2*) y del precursor de la biosíntesis de estas, *OsNAAT1*, o el transportador OsIrt1 a nivel de proteína, al igual que ocurre en *Arabidopsis* (Ogo *et al.*, 2006; Ogo *et al.*, 2007; Ogo *et al.*, 2011) (Figura I.9). *IRO2* se encuentra regulado por el factor transcripcional IDEF1 (*IDE-binding factor 1*), que se expresa de forma constitutiva y se une a los elementos *cis* IDE presentes en *IRO2* (Kobayashi y Nishizawa, 2012).

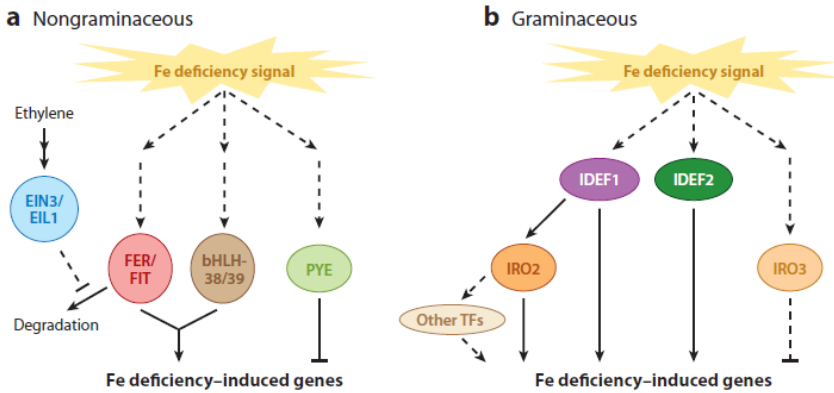


Figura I.9. Reguladores transcripcionales en deficiencia de hierro en plantas. Esquema de los reguladores implicados en la respuesta a deficiencia de Fe en gramináceas y no gramináceas. a) En las no gramináceas la señal de deficiencia de Fe activa la expresión de los reguladores transcripcionales FER/ FIT y bHLH que inducen la expresión de los genes implicados en la adquisición de Fe. b) En las gramináceas la señal de deficiencia de Fe activa la expresión de los reguladores transcripcionales IDEF1 e IDEF2. IDEF1 a su vez activa la expresión del factor IRO2, induciendo todos ellos la activación de los genes de adquisición de Fe. Tomado de Kobayashi y Nishizawa, 2012.

En *Arabidopsis* existen otros reguladores de tipo bHLH, conocidos como POPEYE (PYE) y ILR3 (bHLH105), que se encuentran inducidos en deficiencia de Fe. La formación de heterodímeros PYE-IRL3 tiene un efecto negativo sobre la expresión de genes implicados en el transporte de Fe hacia los orgánulos de almacenaje (Darbani *et al.*, 2013; Tissot *et al.*, 2019) (Figura I.11 y I.12).

- Las ubiquitin ligasas que desestabilizan proteínas como. Las proteínas de arroz *HEMERYTHRIN MOTIF- CONTAINING REALLY INTERESTING NEW GENE- AND ZINC-FINGER* (OsHRZ) y BRUTUS (BTS) de *Arabidopsis* están implicadas en la homeostasis del Fe a nivel postraduccional, con un efecto negativo sobre la estabilidad de sus dianas ya que funcionan como E3 ubiquitin ligasas (Long *et*

al., 2010; Matthiadis y Long, 2016; Kobayashi *et al.*, 2019). Presentan una configuración característica con diversos dominios muy conservados: 3 dominios hemeritrina (HHE), un dominio *Zinc Finger* CHY y CTCHY, un dominio dedo de Zn tipo RING (*Really Interesting New Gene*) y un dominio de rubredoxina (Figura I.10) (Kobayashi *et al.*, 2013). El dominio HHE une Fe^{+2} y O_2 , actuando en el transporte de oxígeno en invertebrados (Stenkamp, 1994). El dominio dedo de Zn tipo *RING* está presente en muchas proteínas E3 ligasas, similares a la proteína FBXL5 humana, implicada en ubiquitinación de las proteínas (Vierstra, 2009; Hua y Vierstra, 2011). Los dominios dedos de Zn CHY- y CTCHY-, interaccionan con DNA, RNA, proteínas o lípidos (Gamsjaeger *et al.*, 2007) y el dominio rubredoxina, que une grupos Fe-S para su transferencia a proteínas diana como la ferredoxina (Sieker *et al.*, 1986) (Figura RI.10).

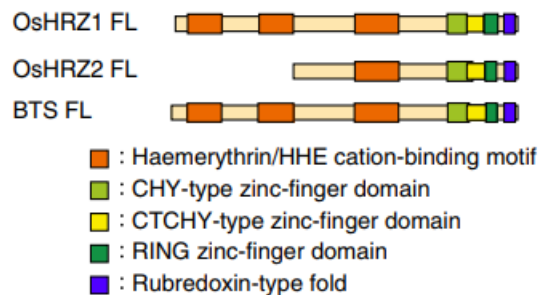


Figura I.10. Estructura de las proteínas BTS y HRZ1/2. Esquema representativo de los dominios de las proteínas BTS y HRZ. Modificada de Kobayashi *et al.*, 2013.

En *Arabidopsis*, BTS regula de negativamente al factor ILR3 (de tipo bHLH). A su vez, la unión de ILR3 con PYE inhibe la expresión de genes de la homeostasis del Fe (Selote *et al.*, 2015; Tissot *et al.*, 2019), como se ha descrito anteriormente, por lo que en ausencia de BTS la represión se exagera.

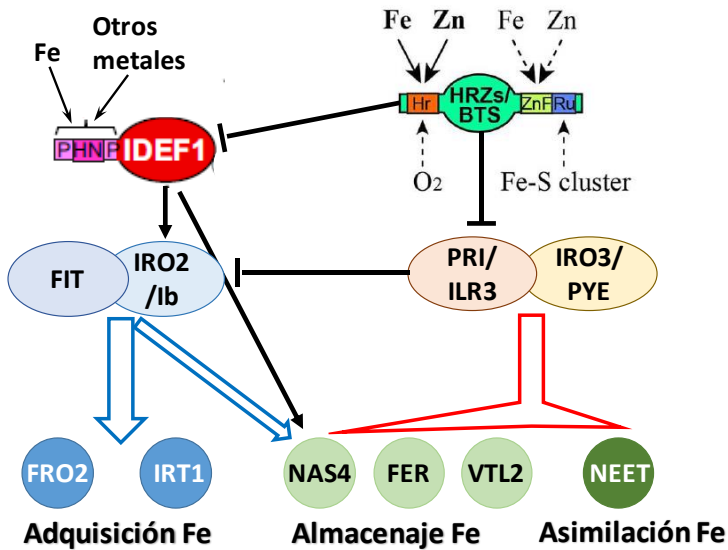
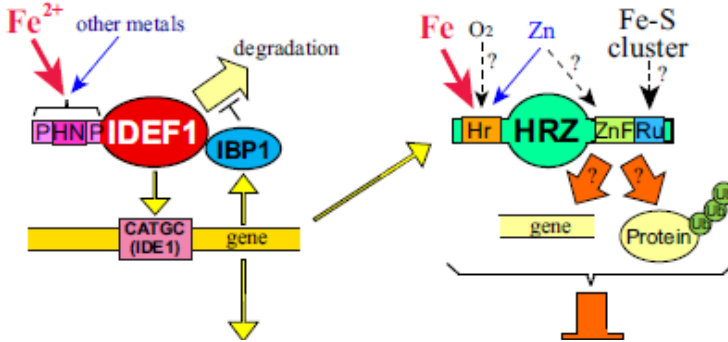


Figura I.11. Esquema de la respuesta a deficiencia de hierro en plantas. Esquema de la respuesta de los factores activadores IDEF1 y FIT en plantas de *Oryza* y *Arabidopsis*, que activan la expresión de los genes de adquisición de Fe (*IRT1* y *FRO2*) y de almacenaje (*NAS4*). Los factores sensores negativos HRZ/BTS inhiben a los factores bHLH Ivc *PRI/ILR3*, evitando así la represión de los genes de almacenaje (*NAS4*, *FER*, *VTL2*) y de asimilación de Fe (*AtNEET*).

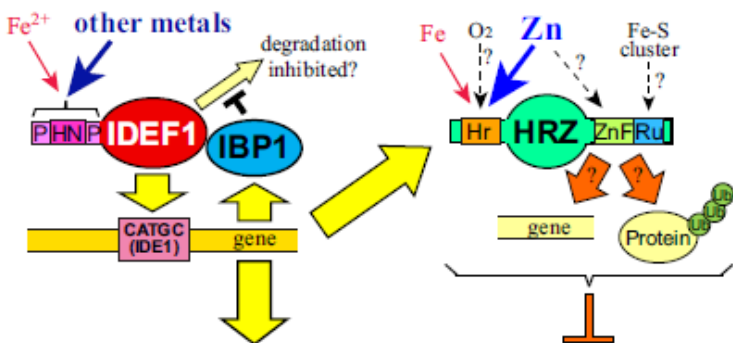
En arroz, al igual que en *Arabidopsis*, OsHRZ es un regulador negativo de la expresión en deficiencia de Fe (Kobayashi *et al.*, 2013).

Suficiencia de Fe



Genes inducibles en deficiencia de Fe: expresión OFF

Deficiencia de Fe



Genes inducibles en deficiencia de Fe: expresión ON

Figura I.12. Esquema de la acción de los factores de regulación génica IDEF1 y HRZ de *O. sativa* en función del hierro del medio. En respuesta a la suficiencia (panel de arriba) y deficiencia (panel de abajo) de Fe. El grosor de las flechas indica la mayor o menor expresión o cantidad de los genes y o metales presentes. Modificada de Kobayashi y Nishizawa, 2014.

De hecho, la regulación en deficiencia de Fe en arroz tiene lugar tanto a nivel transcripcional (mediada por IDEF1), como a nivel postraduccional (mediada por

HRZ). En condiciones de suficiencia de Fe, éste se uniría a las repeticiones de histidina y asparragina (HN) haciendo que IDEF1 no se una a las secuencias *IDE* de los genes de la respuesta a deficiencia de Fe. Al mismo tiempo, la unión de Fe en los dominios hemeritina en HRZ potencia su actividad y, por lo tanto, se reprime la expresión de los genes de deficiencia (Figura I.11 y I.12) (Kobayashi y Nishizawa, 2014). En condiciones de deficiencia de Fe, éste no se uniría a los dominios HN de IDEF1, permitiendo la unión de otros metales, pudiendo producirse la unión de IDEF1 a los dominios *IDE* y activando así la expresión de genes de deficiencia de Fe. Se ha postulado que, tanto en *Arabidopsis* como en arroz, la escasez de Fe activaría a HRZ/BTS, degradando a sus proteínas diana, entre ellas ILR3 o IRO3 que forman parte de complejos reguladores negativos (PYE-ILR3/PIR-IRO3), y de esta manera, la falta de éstos hace que se puedan activar los genes de respuesta a deficiencia de Fe (Figura I.12) (Kobayashi y Nishizawa, 2014; Kobayashi *et al.*, 2019).

4. FAMILIA DE TRANSPORTADORES DE COBRE DE ALTA AFINIDAD CTR.

La familia de proteínas Ctr está conservada en eucariotas y media la adquisición de Cu en las células (Puig y Thiele, 2002). Recientemente, se ha obtenido la estructura por difracción de rayos X del transportador Ctr1 de *Salmo solar* (Ren *et al.*, 2019) (Figura I.13). Estas proteínas contienen 3 segmentos transmembrana (TM), el extremo amino-terminal en el espacio extra citosólico y el extremo carboxilo-terminal en el citosol (Figura I.13). En su mayoría, las proteínas tipo Ctr contienen en el extremo amino-terminal dominios ricos en metioninas que forman centros de unión a Cu. El metal es transportado a través de un poro constituido por los TM2 ricos en metioninas, que forman un homotrímero o heterotrímero. El Cu es llevado hasta el extremo citosólico, que contiene residuos de cisteínas, que lo ceden a metalocarabinas y lo transportan hasta las cuproproteínas diana. Una

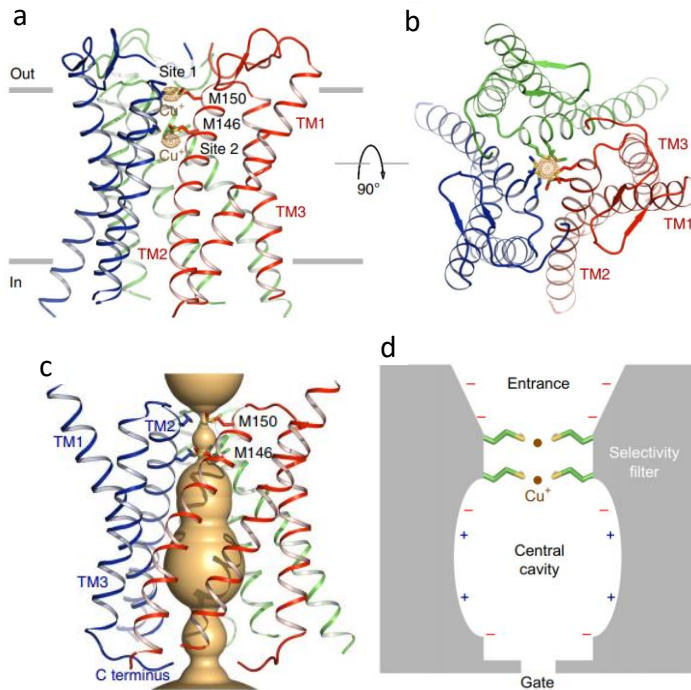


Figura I.13. Estructura de transportador de alta afinidad Ctr. a) Esquema de la estructura de rayos X del transportador Ctr formado por un trímero (cada monómero en un color). Se observan los tres dominios transmembrana (TM) de cada monómero y el sitio de unión del Cu^+ en los residuos metionina (M146 y M150) del TM2. b) Vista ortogonal de la figura representada en la a. c) Poro central de conducción del ion Cu^+ mostrado como superficie naranja y d) Mecanismo propuesto para la selectividad y permeación del Cu^+ . Se muestran sólo dos subunidades. Modificado de Ren *et al.*, 2019.

vez en el interior celular, el Cu es bombeado a los compartimentos intracelulares a través de ATPasas de tipo P (Figura R2.13) (Puig y Thiele, 2002; Peñarrubia *et al.*, 2015; Ren *et al.*, 2019).

4.1. Transportadores Ctr en *S. cerevisiae*.

En la levadura *S. cerevisiae* se han identificado 3 miembros de la familia Ctr. El primero en identificarse fue Ctr1 (Dancis *et al.*, 1994) que posee los tres TMD y 8 motivos extracelulares ricos en metioninas (Met), siguiendo la secuencia consenso Met-X₂-Met-X-Met (donde X representa cualquier amino ácido, aa). (Labbé y Thiele, 1999). Estudios posteriores identificaron un segundo transportador, Ctr3, que mantenía la capacidad de transportar el Cu en cepas mutantes $\Delta ctr1$ (Knight *et al.*, 1996). Estos datos indican que son redundantes en el transporte de alta afinidad de Cu, pero Ctr3 no se expresa en la mayoría de cepas de *S. cerevisiae* por la presencia de un transposón (Knight *et al.*, 1996). Ctr3 contiene varios residuos de cisteínas (Cys), tanto en la región N-terminal, como C-terminal. Las Cys y Met son unos excelentes ligandos del Cu⁺, que hacen que estos transportadores sean de alta afinidad (Labbé y Thiele, 1999). Ambos transportadores se inducen en condiciones de deficiencia de Cu en el medio de crecimiento, aunque presentan poca homología a nivel de sus secuencias proteicas (Figura I.14).

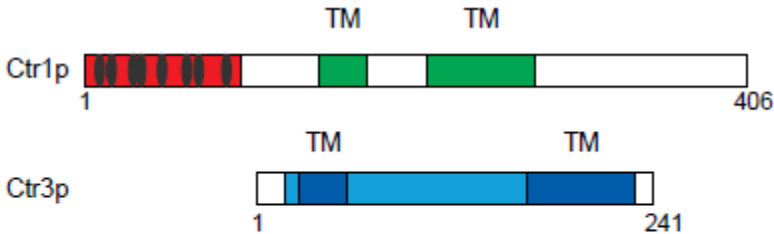










Figura I.14. Esquema representativo de los transportadores Ctr de *Saccharomyces*. Esquema representativo de los dominios de los transportadores de levadura. Se marcan en gris los 8 motivos Met-X₂-Met-X-Met, en rojo el extremo amino-terminal, TM indica los dominios transmembrana. Modificado de Pipes y Labbé 1999.

El último miembro de la familia Ctr de *S. cerevisiae* fue identificado por la similitud de su secuencia con el transportador de Cu de alta afinidad de *Arabidopsis*, COPT1 (Kampfenkel *et al.*, 1995). Se encuentra localizado en la membrana de la vacuola y se encarga de liberar el Cu de ésta (Rees *et al.*, 2004).

4.2. Transportadores COPT en *Arabidopsis*.

En la planta modelo *A. thaliana* se han identificado 6 genes que codifican miembros de la familia de transportadores de Cu de alta afinidad SLC31 (CTR), anotados como *COPT1-6* (Tabla I.1) (Sancenón *et al.*, 2003; Garcia-Molina *et al.*, 2013).

Tabla I.1. Principales características de los transportadores tipo Ctr de *Arabidopsis*. MP- Membrana Plasmática, MI- Membranas internas. Esquema de patrón de expresión modificado de Puig *et al.*, 2014.

	COPT1	COPT2	COPT3	COPT4	COPT5	COPT6
Localización	MP	MP	MI	---	MI	MP
Complementación $\Delta ctr1ctr3$	Si	Si	No	---	No	Si
Regulación transcripcional por Cu	Si	Si	No	---	No	Si
Patrón expresión en flores						
Patrón expresión tallo y raíz						

La caracterización de estos transportadores se ha realizado mediante diferentes aproximaciones experimentales:

- La regulación transcripcional por los niveles de Cu, en la que se ha observado que *COPT1*, *COPT2* y *COPT6* se inducen en deficiencia de Cu, mientras que *COPT3* y *COPT5*, no se regulan por los niveles del metal (Sancenón *et al.*, 2003; Garcia-Molina *et al.*, 2011). La expresión temporal de estos transportadores sigue ritmos circadianos y se

necesitan reguladores temporales para adecuar su expresión (Andrés-Colás *et al.*, 2018).

- La localización subcelular en protoplastos de *A. thaliana*, que permite la división de la familia COPT en transportadores de la membrana plasmática (COPT1, COPT2 y COPT6) y transportadores intracelulares (COPT3 y COPT5) (Andrés-Colás *et al.*, 2010; Garcia-Molina *et al.*, 2011; Garcia-Molina *et al.*, 2013; Perea-García *et al.*, 2013; Andrés-Colás *et al.*, 2018).
- La complementación funcional en cepas de *S. cerevisiae* deficientes en la asimilación de Cu, que permite dividir la familia en dos subgrupos. En el primero, COPT1, COPT2 y COPT6, complementan el fenotipo de las levaduras mutantes, mientras que los del segundo, COPT3 y COPT5 tan sólo revierten parcialmente el fenotipo (Sancenón *et al.*, 2003; Sancenón *et al.*, 2004; Andrés-Colás *et al.*, 2010; Garcia-Molina *et al.*, 2011; Garcia-Molina *et al.*, 2013; Perea-García *et al.*, 2013). Por último, COPT4, resulta tóxico para la levadura y no tiene conservados los residuos clave para transportar el metal (Sancenón *et al.*, 2003; Puig *et al.*, 2007).

COPT1 fue el primer miembro de la familia COPT identificado y caracterizado (Kampfenkel *et al.*, 1995; Sancenón *et al.*, 2004). Las plántulas de *A. thaliana* defectuosas en la expresión *COPT1* muestran una disminución significativa en la adquisición y acumulación de Cu, un aumento de la longitud de la raíz en condiciones limitantes de Cu y defectos en la formación del polen maduro (Sancenón *et al.*, 2004). Estos fenotipos se correlacionan con la expresión mayoritaria de *COPT1* en la punta de las raíces y en granos de polen y sugieren una función predominante de COPT1 en la adquisición de Cu del suelo y en el desarrollo del polen (Tabla I.1) (Sancenón *et al.*, 2004).

COPT2 es el transportador que presenta una mayor expresión a lo largo de toda la raíz. Se ha demostrado que las plantas defectuosas en la expresión de COPT2 son más resistentes a la doble deficiencia de Cu y de Fe, lo que pone de manifiesto

que existe una estrecha relación entre la homeostasis de ambos metales (Perea-García *et al.*, 2013). De hecho, el promotor del transportador *COPT2* contiene secuencias E-Box a las que se une el factor de transcripción FIT, que induce las respuestas a la deficiencia de Fe en *Arabidopsis* (Colangelo y Guerinot, 2004), y que justifican su inducción en la doble deficiencia de Cu y de Fe (Perea-García *et al.*, 2013).

COPT6 es un transportador que se expresa principalmente en la parte aérea, en haces vasculares y tejidos reproductivos. Su papel principal es la distribución de Cu desde las raíces hacia las hojas y semillas, cuando hay deficiencia de Cu (Jung *et al.*, 2012; Garcia-Molina *et al.*, 2013).

COPT5 se localiza principalmente en haces vasculares de la raíz y las silicuas. Se localiza en el tonoplasto y en la membrana interna de la vacuola (Tabla I.1) (Garcia-Molina *et al.*, 2011; Klaumann *et al.*, 2011). El mutante *copt5* es sensible a la deficiencia severa de Cu, ya que es incapaz de liberar el Cu de reserva de la vacuola (Garcia-Molina *et al.*, 2011; Carrió-Seguí *et al.*, 2019). Además, los mutantes *copt5* presentan acumulación de Cu en las raíces en condiciones de deficiencia de Cu en el medio, y menor contenido en silicuas y semillas, lo que indica que COPT5 participa en la movilización de Cu desde la raíz a los tejidos reproductores (Garcia-Molina *et al.*, 2011; Klaumann *et al.*, 2011).

4.3. Transportadores OsCOPT en *Oryza*.

En *O. sativa* se han identificado 7 componentes de la familia COPT, anotados como *OsCOPT1-7* (Yuan *et al.*, 2010; Yuan *et al.*, 2011).

Tabla I.2. Características principales de los transportadores tipo Ctr de *O. sativa*. Características estudiadas para determinar los transportadores COPT de *O. sativa*.

	OsCOPT1	OsCOPT2	OsCOPT3	OsCOPT4	OsCOPT5	OsCOPT6	OsCOPT7
Complementación <i>Δctr1ctr3</i>	No	No	No	---	No	No	Si
Regulación transcripcional por Cu	Si	No	No	No	Si	Si (tallo)	Si
Interacción con OsCOPT	OsCOPT5	OsCOPT6	OsCOPT6	OsCOPT6	OsCOPT1	OsCOPT2-3-4	---

Las características que muestran los *OsCOPT* son:

- La complementación funcional de las levaduras deficientes en transporte de Cu por parte de *OsCOPT1*, sólo se produce cuando interacciona con otras proteínas como *OsCOPT5* y XA13 (Yuan *et al.*, 2010; Yuan *et al.*, 2011). En cuanto al resto de miembros de la familia, sólo *OsCOPT7* complementa el fenotipo de *S. cerevisiae*. *OsCOPT3*, *OsCOPT4* y *OsCOPT6* son capaces de complementar el fenotipo en medio suplementado con Cu (Yuan *et al.*, 2011).
- *OsCOPT1* se regula transcripcionalmente por Cu, al igual que *OsCOPT5* (Yuan *et al.*, 2010). *OsCOPT1* y *OsCOPT5* muestran una elevada expresión en la raíz y, en menor medida, en hojas.
- Se ha determinado que los transportadores COPT de *O. sativa* interaccionan entre ellos. *OsCOPT1* y *OsCOPT5* interaccionan para ser funcionales. *OsCOPT6* interacciona con *OsCOPT2*, *OsCOPT3* y *OsCOPT4*, lo que hace que se localicen en la membrana plasmática, por lo que se especula que *OsCOPT6* actúa a modo de cofactor que ayuda a los otros transportadores a localizarse en la membrana (Yuan *et al.*, 2011).

4.4 Efectos de la sobreexpresión de los transportadores de cobre.

Se han realizado diversos estudios aumentado la expresión de los transportadores de alta afinidad.

En levaduras, se sobreexpresó el transportador Ctr1 completo y una línea mutante que contenía los 300 primeros aminoácidos, eliminando así la cola más larga que posee este transportador en levadura y que no está presente en otras especies. Los efectos más relevantes se obtuvieron en la cepa con el transportador truncado, ya que el extremo carboxi-terminal del transportador regula negativamente la entrada de Cu en condiciones de exceso del metal (Wu *et al.*, 2009; Schuller *et al.*, 2013). La sobreexpresión de ambos transportadores aumenta la concentración de Cu endógena, pero en la cepa con el transportador truncado aumentan también las concentraciones de otros metales como el Zn o el Fe (Schuller *et al.*, 2013). La sobreexpresión provoca un cambio en la expresión de 78 genes en la cepa con el transportador completo y 980 genes en la del transportador truncado (Schuller *et al.*, 2013).

En plantas, la sobreexpresión del transportador COPT1 también produce un aumento de la concentración interna de Cu (Andrés-Colás *et al.*, 2010). El análisis del cambio de patrón de expresión de las plantas COPT1 muestra 482 genes inducidos y 101 genes reprimidos en las condiciones de exceso y deficiencia de Cu, respectivamente (Perea-García, 2013). Las plantas sobreexpresoras de COPT1, comparadas con las plantas silvestres, presentan un tamaño menor en condiciones estándar de crecimiento, una mayor curvatura de los cotiledones y alteraciones en el desarrollo de las flores (Andrés-Colás *et al.*, 2010).

Los estudios realizados hasta el momento, ponen en evidencia que una mayor entrada de Cu, como Cu⁺, a través de los transportadores de alta afinidad tipo Ctr afecta a los organismos. Este efecto se puede deber, como hemos comentado, a la capacidad del Cu⁺ de formar ROS, que dañan la célula a diferentes niveles, desde

Introducción

daños en la membrana plasmática hasta daños en el DNA (Rodrigo-Moreno *et al.*, 2013).

OBJETIVOS

Dados los antecedentes presentados en el último apartado de la introducción, nos planteamos estudiar con mayor profundidad los efectos moleculares que se producen al sobreexpresar los transportadores de cobre de alta afinidad tipo Ctr. Para ello, el trabajo realizado en esta tesis se ha centrado en tres organismos, que componen los tres objetivos principales:

1. Determinar los cambios moleculares que se producen al sobreexpresar el transportador Ctr1 en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* mediante la eliminación de su región carboxi-terminal.
2. Profundizar en el estudio de los cambios moleculares que se producen en las plantas de *Arabidopsis thaliana* sobreexpresoras del transportador de cobre de alta afinidad COPT1 mediante el análisis de su posible papel en la modificación de la homeostasis del hierro.
3. Estudiar el efecto de la sobreexpresión del transportador de cobre de alta afinidad COPT1 de *Arabidopsis thaliana* en la planta de interés agronómico *Oryza sativa*.

MATERIAL Y MÉTODOS



1. MATERIAL BIOLÓGICO Y CONDICIONES DE CRECIMIENTO

1.1. *Escherichia coli* y *Agrobacterium tumefaciens*

1.1.1. *CONDICIONES DE CRECIMIENTO*

Se han utilizado células competentes de *Escherichia coli* y de *Agrobacterium tumefaciens* (cepa C58). Las cepas de *E. coli* (*One Shot Top 10 Competent Cells, Invitrogen*) se cultivaron a 37 °C en agitación, utilizando el medio general para bacterias Luria-Bertani (LB) líquido [triptona (*Pronadisa*) 1 % (p/v), extracto de levadura (*Pronadisa*) 0,5 % (p/v) y NaCl (*Prolabo*) 1 % (p/v)] o sólido [la misma composición con agar bacteriológico (*Pronadisa*) 1,5 % (p/v)]. Los medios para la selección de transformantes se suplementaron con ampicilina 50 µg/ml (LBA).

La cepa C58 de *A. tumefaciens* (resistente a rifampicina) se cultivó a 28 °C en medio LB líquido o sólido, suplementado con 1 µg/ml de kanamicina en los medios para la selección y cultivos de transformantes.

1.1.2. *CONSTRUCCIÓN Y OBTENCIÓN DE PLÁSMIDOS EN ESCHERICHIA COLI*

Para la construcción de los plásmidos, se amplificó el DNA a clonar mediante PCR (Apartado 2.4), utilizando oligonucleótidos con sitios de corte reconocidos por enzimas de restricción, para su posterior inserción en el vector. El producto de PCR se purificó mediante el sistema *PureLink™ Quick Gel Extraction and PCR Purification Combo Kit, Mini scale (Invitrogen)*. Los productos de PCR purificados y los vectores fueron digeridos con los enzimas de restricción correspondientes (*Roche*). La digestión se llevó a cabo a 37 °C durante toda la noche en el caso del inserto y durante 2 h en el caso del vector. A continuación, el vector fue digerido con *shrimp alkaline phosphatase (SAP; Roche)*, incubándolo 15 min a 37 °C y posteriormente se inactivó el enzima incubando a 74 °C durante 15 min. Los productos de digestión se separaron en geles de agarosa al 0,8 % (Apartado 2.2), se seleccionaron las bandas del tamaño adecuado y se purificaron mediante el sistema *PureLink™ Quick Gel Extraction and PCR Purification Combo Kit, Mini scale (Invitrogen)*. Tanto el

Material y Métodos

vector como el inserto se cuantificaron mediante *NanoDrop 2000 Spectrophotometer* (*Thermo Scientific*), para llevar a cabo la ligación con el kit de ligación rápida de DNA (*Roche*), usando una relación de inserto a vector de 3:1.

Se transformaron células competentes de *E. coli One Shot Top10* con 15 µl de la ligación y los transformantes se seleccionaron en placas LBA. Los plásmidos de varios transformantes se aislaron mediante el kit de extracción de plásmidos (*Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System Technical Bulletin, Promega*) y se analizaron varios clones mediante PCR y/o digestión con enzimas de restricción, según las condiciones del fabricante. Finalmente, el fragmento de DNA clonado se secuenció en el *Servei Central de Suport a la Investigació Experimental (SCSIE)* (Universitat de València).

1.1.3. PLÁSMIDOS UTILIZADOS

Los plásmidos utilizados en el presente trabajo han sido los siguientes:

Tabla M.1. Listado de plásmidos utilizados.

Plásmido	Descripción	Procedencia
pRS415	LEU2, CEN	Sikorski y Hieter, 1989
pRS415-CTH2	LEU2, CEN	Puig <i>et al</i> , 2005
p416TEF	URA3, CEN	Mumberg <i>et al</i> , 1995
p416TEF-CTR1	URA3, CEN	Laboratorio Dr. Sergi Puig
p416TEF-CTR1Δ300	URA3, CEN	Presente trabajo
pACT2	LEU2, CEN	
pACT2-ScCth2	LEU2, CEN	Puig <i>et al</i> , 2005
pACT2-AtCth2	LEU2, CEN	Presente trabajo
pACT2-AtCth2C243R	LEU2, CEN	Presente trabajo
pIIIA/MS2-1	ADE2, URA3, 2µ	SenGupta <i>et al</i> , 1996
pIIIA/MS2-1-SDH4	ADE2, URA3, 2µ	Puig <i>et al</i> , 2005
pIIIA/MS2-1-ARPN	ADE2, URA3, 2µ	Presente trabajo
pIIIA/MS2-1-LAC17	ADE2, URA3, 2µ	Presente trabajo

1.2. *Saccharomyces cerevisiae*

Condiciones de crecimiento en medio líquido

Las cepas de levadura que se han utilizado se cultivaron a 30 °C en agitación (190 rpm) en los siguientes medios de cultivo:

- Medio rico YPD: extracto de levadura 1 % (p/v), peptona bacteriológica 2 % (p/v) y glucosa 2 % (p/v).
- Medio sintético completo (SC): base nitrogenada para levadura sin aminoácidos y sin sulfato amónico (*Difco*) 0,17 % (p/v), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,5 % (p/v), mezcla de requerimientos preparada (*Formedium*) 0,2 % (p/v) y glucosa 2 % (p/v). En el caso de los experimentos con cepas de levadura transformadas, se utilizó medio SC sin uno o varios requerimientos para el mantenimiento de los plásmidos.

En todos los casos, una colonia independiente de células de levadura se inoculó en tubos de plástico (*Eurotubo*®, *Deltalab*) en un volumen entre 3 y 5 ml de medio SC, o con ausencia de algún requerimiento, cuando fue necesario, y se cultivó durante toda la noche. Al día siguiente, se procedió al refresco del cultivo en 7 ml de medio en tubos de plástico de 50 ml (*ThermoFisher*) a una OD_{600} de 0,2 y se creció durante 9 h hasta la fase exponencial. Las condiciones diferentes de crecimiento en medio líquido que se han utilizado en este trabajo han sido:

- Condición control: las células crecidas durante toda la noche se reinocularon en medio SC que carecía del requerimiento específico para mantener el plásmido.
- Condición deficiencia de Fe (-Fe): para inducir la deficiencia de Fe se utilizó el medio SC que carecía del requerimiento específico para mantener el plásmido, suplementado con el quelante *sulfato de bazofenantrolina* (*BPS*, *Sigma*) a una concentración final de 100 μM . Dicho quelante es específico de Fe^{+2} y que es impermeable a la membrana plasmática.

- Distintos niveles de Cu: para estudiar el efecto del Cu en las células de levadura, los diferentes medios se suplementaron con las concentraciones de CuSO_4 especificadas en cada del experimento.

1.2.1. *CONDICIONES DE CRECIMIENTO EN MEDIO SÓLIDO*

El medio sólido se obtuvo añadiendo agar bacteriológico 1,5 % (p/v) a todos los medios preparados, tal y como se describe en el apartado 1.2.1. Los ensayos de crecimiento en medio sólido se llevaron a cabo a partir de cultivos crecidos durante toda la noche y reinoculados hasta la fase exponencial al día siguiente, en medio SC que carecía del requerimiento específico para mantener el plásmido. Se igualó la DO_{600} a un valor de 0,1 y se realizaron diluciones seriadas (1:10, 1:100). Los ensayos de gotas se realizaron haciendo uso de un utensilio (*replicate plater*) que permite replicar las gotas placa por placa, a partir del cultivo directo y de cada una de las diluciones. Los ensayos en placa se realizaron en diferentes medios:

- Condición control: medio SC que carecía del requerimiento específico para mantener el plásmido.
- Condición deficiencia de Fe (-Fe): para inducir la deficiencia de Fe se utilizó el medio SC que carecía del requerimiento específico para mantener el plásmido (SC-ura), suplementado con *BPS* (*Sigma*) a una concentración final de 100 μM ; y medio suplementado con *3-(2-piridil)-5,6 bis (4-ácido fenol sulfónico)-1,2,4-triacina* (*ferrocina*, *Sigma*) a una concentración final de 1 mM. La ferrocina es un quelante de Fe^{+2} que es impermeable a la membrana plasmática.
- Condición mínima de crecimiento (MM): para comprobar la capacidad de las cepas de crecer sin lisina en el medio, se utilizó un medio preparado de forma casera, añadiendo los aminoácidos esenciales por separado (extracto de levadura 1 % (p/v), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,5 % (p/v), glucosa 2 % (p/v), histidina 0,76 % (p/v), leucina 3,8 % (p/v), metionina 0,76 % (p/v) y lisina 0,76 % (p/v).
- Condiciones respiración (etanol-glicerol): para comprobar la capacidad de las cepas de respirar, se utilizó un medio SC que carecía del

requerimiento específico para mantener el plásmido (SC-ura), en el que se sustituye la glucosa por etanol 2 % y glicerol 3 %.

- Medio con marcador de estrés oxidativo (azul de metileno): para observar el efecto del estrés oxidativo, se utilizó medio SC que carecía del requerimiento específico para mantener el plásmido (SC-ura), suplementado con azul de metileno 1 %, que actúa como marcador de las células con estrés oxidativo.
- Distintos niveles de Cu: para estudiar el efecto del Cu en las células de levadura, los diferentes medios se suplementaron con las concentraciones de CuSO_4 especificadas en cada del experimento.
- Condiciones para ensayo triple híbrido: se utiliza el medio SC-ura-leu debido a la doble transformación de la cepa L40 coat con los plásmidos pACT2 y pIII/MS2.1. Para comprobar si se produce la interacción se utiliza el medio SC-ura-leu-his y para forzar las condiciones de interacción se utilizan diferentes concentraciones del inhibidor de la histidina 3-aminotriazol (3-AT) en SC-ura-leu-his.

1.2.2. TRANSFORMACIÓN DE LEVADURA

La transformación de *S. cerevisiae* con plásmidos se llevó a cabo utilizando el método de transformación con acetato de litio descrito en Gietz y Woods (2006). Las células se sembraron en placas de medio selectivo, cultivándolas a 30 °C hasta la observación de colonias (2 o 3 días). Los transformantes obtenidos se purificaron por triple estría para asegurar que se parte de una colonia procedente de una única célula transformada.

1.2.3. CEPAS UTILIZADAS DE S. CEREVISIAE

Las cepas utilizadas en este trabajo han sido las siguientes:

Tabla M.2. Cepas de *Saccharomyces cerevisiae* utilizadas.

Cepa	Genotipo	Procedencia
BY4741	MAT α , <i>his3</i> Δ 1, <i>leu2</i> Δ 0, <i>met15</i> Δ 0, <i>ura3</i> Δ 0	Research Genetics
<i>cth1</i> Δ <i>cth2</i> Δ	BY4741 <i>cth1::kanMX4 cth2::HisMX6</i>	Puig <i>et al</i> , 2005
<i>ctr1</i> Δ <i>ctr3</i> Δ	MAT α , <i>ctr1::ura3::Kan^R</i> , <i>ctr3::TRP1</i> , <i>his3</i> , <i>lys2-802</i>	Puig <i>et al</i> , 2002
L40 coat	MAT α , <i>ura3-52</i> , <i>leu2-3</i> , <i>112</i> , <i>his3</i> Δ 200, <i>trp1</i> Δ 1, <i>ade2</i> , <i>LYS2::(LexA</i> <i>op)-HIS3</i> , <i>ura3::(LexA-op)-LacZ</i> , <i>LexA-</i> <i>MS2coat (TRP1)</i> .	Rolf Sternglanz, Stony Brook

1.3. *Arabidopsis thaliana* y *Oryza sativa*

En este trabajo se han utilizado plantas de:

- *Arabidopsis thaliana*: silvestres (WT) ecotipo Columbia (Col 0) y el mutante de sobreexpresión constitutiva del transportador de Cu de alta afinidad COPT1 dirigida por el promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV35S) denominadas plantas COPT1^{OE} (C1^{OE}) (Andrés-Colás *et al.*, 2010)
- *Oryza sativa*: silvestres (WT) subespecie *japonica* (Nippombare) y dos líneas transgénicas sobreexpresoras constitutivas del transportador COPT1 de *Arabidopsis* dirigidas bajo el promotor CaMV35S: (AtCOPT1^{OE}-1 (C1^{OE}-1) y AtCOPT1^{OE}-2 (C1^{OE}-2) obtenidas en el presente trabajo.

1.3.1. CULTIVO EN MACETA

Las semillas de *A. thaliana* se sembraron en macetas con una mezcla de turba, arena y vermiculita en relación 2:1:1, se taparon con plástico transparente y se estratificaron durante 2 d a 4 °C para sincronizar la germinación. Después, las

macetas se trasladaron a cabinas de crecimiento (*Sanyo Growth Cabinet MLR-350T*) en condiciones de día largo (16 h de luz a 23 °C y 8 h de oscuridad a 16 °C). Una vez desarrolladas las silicuas, las plantas se dejaron secar y se procedió a la obtención de las semillas mediante procedimiento manual.

Las semillas de *O. sativa* se sembraron en macetas de 22 x 20 cm que contenía una mezcla de sustrato (*SEED PRO5050 Projar Professional*) y perlita (pH 6-6.5) en relación 3:1. Las plantas crecieron en invernadero bajo condiciones de día largo (16 h de luz, 23 °C / 8 h oscuridad, 17 °C). La humedad relativa se mantuvo entre 65 y 83 % hasta la obtención de 6-7 hojas en las panículas.

1.3.2. CULTIVO EN PLACA

Este sistema de cultivo se utilizó para evaluar el crecimiento de las plántulas en diferentes concentraciones de metales. Las semillas se desinfectaron de manera superficial con lejía comercial 30 % (v/v) y Triton X-100 0,02 % (p/v), se lavaron 4 veces con H₂O estéril y se resuspendieron en fitoagar 0,01 % (p/v) estéril. A continuación, las semillas se estratificaron durante 2 d a 4 °C para favorecer la germinación sincronizada y se sembraron en placa. Las semillas crecieron en condiciones de día intermedio (12 h de luz a 23 °C y 12 h de oscuridad a 16 °C) en cámaras de germinación *Sanyo Growth Cabinet MLR-350T* durante 7-8 d.

En el caso de *A. thaliana* se utilizó:

- Medio ½ MS (Murashige y Skoog, 1962) preparado con los componentes por separado: macronutrientes (*Sigma*) (NH₄NO₃ 10 mM, KNO₃ 9,4 mM, MgSO₄·7 H₂O 0,37 mM, KH₂PO₄ 0,62 mM y CaCl₂ 1,13 mM), micronutrientes (H₃BO₃ 50 µM, MnSO₄·H₂O 36,6 µM, ZnSO₄·7H₂O 15 µM, NaMoO₄·2H₂O 0,57 µM y CoCl₂·6 H₂O 0,05 µM, KI 0,25 mM), MES 0,05 %, sacarosa 1 % y fitoagar 0,8 % (*Duchefa*); ajustado a pH 5,7 con KOH, adicionando Fe-citrato y CuSO₄ según condiciones de estudio.

Para el estudio de las plántulas de arroz se utilizaron:

- Medio ½ MS comercial (*Sigma*), MES 0,05 %, sacarosa 1 % y fitoagar 0,8 % (*Duchefa*); ajustado a pH 5,7 con KOH, adicionando CuSO₄ según condiciones de estudio. Para exacerbar la deficiencia de Cu se añadió el quelante ácido disodio de batocuprinico disulfónico (*BCS*) 100 µM.
- Medio ½ MS preparado con los componentes por separado: macronutrientes (*Sigma*) (NH₄NO₃ 10 mM, KNO₃ 9,4 mM, MgSO₄·7 H₂O 0,37 mM, KH₂PO₄ 0,62 mM y CaCl₂ 1,13 mM), micronutrientes (H₃BO₃ 50 µM, MnSO₄·H₂O 36,6 µM, ZnSO₄·7 H₂O 15 µM, NaMoO₄·2 H₂O 0,57 µM y CoCl₂·6 H₂O 0,05 µM, KI 0,25 mM), MES 0,05 %, sacarosa 1 % y fitoagar 0,8 % (*Duchefa*); ajustado a pH 5,7 con KOH, adicionando o no Fe-EDTA y CuSO₄ según condiciones de estudio.

1.3.3. OBTENCIÓN PLANTAS TRANSGÉNICAS DE *O. SATIVA*

El casete de expresión *CaMV35S::AtCOPT1-HA::NOS* (Andrés-Colás *et al.*, 2010) se extrajo del plásmido *pBI121* con los enzimas de restricción *HindIII* y *SacI* y se clonó en el vector binario *pCMABIA1305.1* (Cambia, <http://www.cambia.org/>). El plásmido resultante se transformó en la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* C58. Se transformaron plantas de arroz (*O. sativa* L cv. Nipponbare) mediante la obtención y posterior transformación de callos embriogénicos, siguiendo el protocolo de Hiei *et al.* (1994).

2. TÉCNICAS GENERALES DE BIOLOGÍA MOLECULAR

2.1. Obtención de RNA total

La obtención de RNA total de levadura se realizó a partir de 7 ml de cultivo crecido durante 9 h, con una OD de partida de 0,2. Todo el volumen se centrifugó a 4000 rpm 1 min a 4 °C, se lavó con 1 ml de agua fría y se volvió a centrifugar a 12000 rpm 30 s. Se eliminó el sobrenadante por aspiración y el pellet fue congelado

en hielo seco y guardado a -80 °C hasta su utilización. Para realizar la extracción, se utilizó el *PureLink™ RNA Mini Kit (Invitrogen)*, siguiendo las indicaciones del fabricante.

Para la obtención de RNA total de plantas se utilizaron plántulas de 7-8 d de crecimiento. En el caso de *Oryza*, se separaron la parte aérea y la raíz, utilizando sólo la primera para llevar a cabo la extracción. El material recogido se lavó con EDTA 20 µM y H₂O MilliQPLUS (*Millipore*), se congeló con N₂ líquido y se guardó a -80 °C hasta su utilización. Las extracciones se llevaron a cabo utilizando el kit *RNAeasy plant mini (Qiagen)*, siguiendo las indicaciones del fabricante.

En ambos casos, se comprobó la calidad del RNA mediante un gel de electroforesis para RNA (Apartado 2.2), en función de la integridad de las bandas correspondientes a las subunidades ribosomales. La cantidad de RNA se cuantificó mediante *NanoDrop 2000 Spectrophotometer (Thermo Scientific)*.

2.2. Electroforesis de DNA y RNA

Los geles de electroforesis de RNA se prepararon a partir de agarosa al 1 % (p/v) en tampón MOPS [MOPS 40 mM, acetato sódico 10 mM, EDTA 1 mM pH 8,0] y formaldehído 2,2 M. Las muestras se solubilizaron con el tampón de carga correspondiente [formamida desionizada 65 % (v/v) en MOPS 1X, formaldehído 7 % (v/v) y bromuro de etidio 20 µg/mL], se desnaturalizaron a 65 °C durante 10 min y se separaron aplicando un voltaje de 70-100 V en sistemas de electroforesis (*Biorad*).

Los geles de electroforesis de DNA se realizaron para visualizar los productos de PCR. Para ello, se utilizaron geles de agarosa entre el 0,8 y el 1,5 % (p/v) en tampón TAE [Tris 40 mM; ácido acético glacial 1,14 ml/L y EDTA 20 mM]. Las muestras se prepararon en tampón de carga 2X [glicerol 50 % (v/v); azul de bromofenol 0,05 % (p/v); EDTA 100 mM]. Tras la separación electroforética con una corriente de 100 V, los geles fueron teñidos con bromuro de etidio 10 µg/ml. Los geles se visualizaron mediante un transiluminador de luz ultravioleta (*Uvitec*),

menos cuando había que recuperar las bandas para su posterior clonación, en cuyo caso se utilizó una lámpara UV de baja energía (IBI Kodak UV Transilluminator Lamp).

2.3. Tratamiento con DNAsa y síntesis de cDNA

El tratamiento con DNAsa se realizó con una concentración fija de RNA. Se utilizó la *DNAsa libre de RNAsa (Invitrogen)* a 25 °C durante 15 min y posteriormente a 65 °C durante 10 min para desactivarla con 0,65 µl de EDTA 25 mM. En el caso de *S. cerevisiae* se llevó a cabo con 1 µg de RNA, mientras que en plantas se partió de 1,5 µg.

El cDNA se obtuvo a partir de las muestras tratadas con DNAsa, mediante una reacción de transcripción reversa. Para la obtención de cDNA en *S. cerevisiae* se utilizaron 2,5 µl del RNA tratado al que se le añadieron 0,5 µl de Oligo dT plus 10 µM, 0,8 µl de dNTPs 10 mM (*Promega*) y 2,2 µl de H₂O para ajustar el volumen de la reacción. Se incubó toda la mezcla a 65 °C durante 10 min. Pasados los 10 min, se añadieron 2µl Buffer RT 5X, 1,5 µl de H₂O y 0,5 µl de transcriptasa reversa (*Reverse Transcriptase Maxima, ThermoFisher*). Se llevó a cabo la reacción durante 30 min a 50 °C, más 5 min a 85 °C para inactivar el enzima y parar a reacción.

En el caso de plantas, se añadió el oligonucleótido reverso del oligo (dT)₁₅ 50 µg/µL (*Roche*), el RNA tratado con DNAsa y H₂O, en un volumen final de 12 µl. El RNA se desnaturalizó a 70 °C durante 10 min y, después de enfriar en hielo, se añadieron 4 µl del tampón RT 5X; 2 µl de DTT 0,1 M (ambos de *Invitrogen*); 1 µl de dNTPs 10 mM (*Promega*) y 1 µl de *transcriptasa reversa SuperScript II* 200 U/µl (*Invitrogen*). La reacción se incubó 1 h 30 min a 42 °C y la enzima se inactivó a 70 °C durante 15 min.

2.4. RT-PCR semicuantitativa (sqPCR)

El material de partida en el caso de levaduras fue el gDNA, mientras que para plantas se utilizó el cDNA obtenido en el apartado 2.3. En ambos casos se utilizó como molde para amplificar el gen de interés y, en su caso, el gen de control de carga, en reacciones independientes de PCR. La mezcla de reacción contenía, además del DNA molde, los oligonucleótidos del gen de interés 0,5 µM; 0,5 µL de dNTPs 10 mM; 2,5 µL de tampón comercial de PCR 10X; 0,75 µL de MgCl₂ (*Bioline*) 1,5 mM y 0,2 µL *BioTaq* polimerasa (*Bioline*) 0,5 U, en un volumen final de 25 µL. Las condiciones de PCR fueron las indicadas para cada par de oligonucleótidos (Tabla M.3) (desnaturalización a 94 °C; hibridación según la pareja de cebadores; y elongación a 72 °C). Los productos de PCR se visualizaron por electroforesis y se fotografiaron.

Tabla M.3 Listado de cebadores utilizados en sqPCR. En negrita los sitios de corte.

Gen	Secuencia (5´-3´)		sqPCR
<i>CTR1-F-BamHI</i>	acg GGATCC AAAATGGAAGGTATGAATATGGGT AGCAGCA		35 ciclos 50 °C
<i>CTR1:300-R-HindIII</i>	acgt AAGCTT ATTTCTGAATTTCTCTTTGGATGT CCCACCT		35 ciclos 50 °C
<i>AtCTH2-BamHI-F</i>	cgc GGATCC ATATGGAAAACAAAATCGCGCC GTT		35 ciclos 50 °C
<i>AtCTH2-XhoI-R</i>	cgc CTCGAG TCATGTGATCAGCTTGAGGGA		35 ciclos 50 °C
Gen	<i>directo</i>	<i>inverso</i>	Condiciones
<i>AtCOPT1</i>	CAATGGATCCATGAAC GAAGG	CCTGAGGGAGGAACA TAGTTAG	30 ciclos 60 °C
<i>18S</i>	ATGATAACTCGACGGA TCGC	CTTGGATGTGGTAGC CGTTT	20 ciclos 55 °C
<i>ARPN</i>	TATCCCCGGGTAGTT TGGAAGATTCAAACGG A	TATCCCCGGGTCTT TATATCATTTTTAGTA TATATATTTTTGAA	35 ciclos 58 °C
<i>LAC17</i>	TATCCCCGGGTGCGC CATTTATCGGTTTGAC AT	TATCCCCGGGAGCT GTGCAACAGTAAATA ATTGTA	30 ciclos 64 °C

2.5. RT-PCR cuantitativa (qPCR)

Para llevar a cabo la qPCR de *S. cerevisiae* se realizó una dilución 1/5 de las muestras de cDNA. Se tomó una pequeña cantidad de cada una de las muestras que se iban a analizar y se obtuvo una mezcla de todas para poder realizar un curva patrón de cada uno de los genes a analizar. A partir del pool inicial 1/5 se realizaron diluciones seriadas (1/10, 1/50, 1/100, 1/500, 1/1000). Las muestras que iban a ser analizadas mediante qPCR fueron diluidas nuevamente a 1/40 para su uso.

Para cada gen de estudio se realizó un mix que contenía: 2,1 µl de H₂O, 5 µL de *Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG with ROX (Invitrogen)*, 0,2 µl de cada primer (directo e inverso, Tabla M4) 5 µM y 2,5 µl del cDNA dilución 1/40. El programa utilizado consistió en un ciclo inicial de 2 min a 50 °C, para evitar la contaminación con amplicones, un ciclo de desnaturalización inicial a 95 °C durante 2 min y 40 ciclos de desnaturalización a 95 °C e hibridación y elongación a 60 °C, ambos de 30 s. Finalmente, se programó un último ciclo con la curva de disociación (desde 65 a 95 °C, incremento de 0,5 °C por 0,05 s).

Tabla M.4 Listado de cebadores utilizados en *S. cerevisiae* en qPCR

Gen	Secuencia (5´-3´)	
	<i>directo</i>	<i>inverso</i>
<i>ACO1</i>	GCCATCAAGAGACCCATTGT	ATCCAGCGTTTCCACATTCT
<i>ACT1</i>	TCGTTCCAATTTACGCTGGTT	CGGCCAAATCGATTCTCAA
<i>ARN2</i>	TTCCTTTGCTCCATTCAAG	GAGATACCCAGCAGCCATTT
<i>BIO2</i>	CACGAGAACCTACGACGACA	TCACCGAGACCCAAAATACC
<i>CRS5</i>	CTCTTGTCATTGTGGGAGCA	GTGGTTTCGATTTGCATTT
<i>CTH2</i>	GCAGTTTCATTCTCTCCAC	TAGGTGCCGTGCTATTCCAGG
<i>CUP1</i>	CAATGCCAATGTGGTAGCTG	GCAGCATGACTTCTTGGTTTC
<i>FET3</i>	TGACCGTTTTGTCTTCAGGT	CTCCACGATTTTCATCCTTCTC
<i>FIT1</i>	TCTAGGGATGCCAATCTGT	ACCAGCGGTAGTGGTTTGA
<i>FIT3</i>	CATCCTCTAGCACCGCTGAA	CAATAACATGACGGCAGCAA

<i>FTR1</i>	GGTCACTTGCCTTTCACCAA	TTGCTCTTCCGTCAACTCCT
<i>HEM15</i>	CCAAAGTTGATGGCCTAATG	TATTCCGATTCCCCAATGAC
<i>LEU1</i>	GCCAGACAAGGTATCGTCCA	TGAGTAGAGGTATGAGAGTCACCA
<i>MRS4</i>	GTCTTTGCGGTGGGATAAGT	GTTTCGCTGCCTCTAACCTG
<i>PGK1</i>	AAGCGTGTCTTCATCAGAGTTG	CGTATCTTGGGTGGTGTTC
<i>RLI1</i>	GAGCCCCTGAATCTTTGTTG	CTTGGTCTGAAGGAGTTTGGGA
<i>RNR1</i>	CTGTGACTGCAAACGCAACTA	AATGAGTGGCTACCTGTTGGA
<i>SDH2</i>	CGAAGAAGGGTATGGCTACTG	CACTTGGCTCGTCTGGATT
<i>SDH4</i>	GCACTCCCAATGATGCCTAC	AATGGAACGACGGACAAGG
<i>TRX2</i>	AGTTTCTTCCATGCCTACCT	GCTTGATAGCAGCTGGGTTG

Se realizó una curva estándar con diluciones seriadas de las muestras de cDNA (2×10^{-1} , 10^{-1} , 2×10^{-2} , 10^{-2} , 2×10^{-3} y 10^{-3}), se normalizaron todos los datos frente al valor de *ACT1* y se analizaron por el método $2^{\Delta CT}$ (Sanvisens *et al.*, 2014).

Para las PCR cuantitativas en tiempo real de plantas, los cebadores se diseñaron usando el software *Primer-Blast* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>), considerando la presencia de intrones y el contenido en G/C (Tabla M5). Se utilizó una concentración de 300 nM para todos los cebadores. A cada pocillo se añadieron 6 μ L de la mezcla general de reacción *Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG with ROX* (Invitrogen), 2 μ L de la muestra a analizar y la mezcla de cebadores directo y reverso, hasta un volumen final de 10 μ L. El programa de amplificación consistió en un ciclo inicial de 2 min a 50 °C, para evitar la contaminación con amplicones, un ciclo de desnaturalización inicial a 95 °C durante 2 min y 40 ciclos de desnaturalización a 95 °C e hibridación y elongación a 60 °C, ambos de 30 s. Finalmente, se programó un último ciclo con la curva de disociación (desde 65 a 95 °C, incremento de 0,5 °C por 0,05 s).

Tabla M.5. Listado de cebadores utilizados en plantas en qPCR

Gen	Secuencia (5´-3´)	
	<i>directo</i>	<i>inverso</i>
<i>ACO2</i>	CAGACCACATCTCTCCAGCA	TACTTGCTGCATCGAAAACG
<i>ANAC087</i>	CAATCCAACCCCATCATTTTC	GTCATGTTTCGCGTTCACATC
<i>AOX1A</i>	TGGATGTCGAGCTATGATGC	GCGCTCTCTCGTACCATTTTC
<i>AOX1D</i>	CCATGCGATGTTGCTAGAGA	AAGCCAGGAAATATGCGTTG
<i>ASN1</i>	TCAAACGCTTATGAGCCTCT	GCAAAAGGAATGGAGCTGAG
<i>AtCAD8</i>	AAGTCGGAGTTGGGTGTTTG	CAAGGGGAGATTGTCTGGAA
<i>AtCCR1</i>	TATGTGGATGTTTCGCGATGT	GGTTCCTCTCGTCCTTGCAC
<i>ATH29</i>	TCGTCACGTGTCTTCTCCTG	GGCGTGAATTTGGTTCCTGT
<i>AtNAS4</i>	ATGGTAGCAGCTCGTTTGGT	AGCAAAGCACCAGGAGACAT
<i>AtRAB8D</i>	CTCCGCTTCTCAATCCACTC	AAGCGAGAGCCATGGTTAGA
<i>AtUBQ10</i>	TAATCCCTGATGAATAAGTGT TCTAC	AAAACGAAGCGATGATAAAG AAG
<i>BGLU23</i>	CAATGAGCCATGGGTTTTCT	TCCGGTAAGCTTCAACTGCT
<i>BGLU30</i>	CGGTCGTCGGAGAGAGTAAC	GCCTTGCAAAACACCAAAT
<i>BHLH038</i>	AGAGCTGCAACAGCAAGTGA	ACCAAGCCTAGTGGCAGAAA
<i>bHLH100</i>	AAACCGACGACGTATCCAAC	GATTGGTGGGAGGAGACAA
<i>bHLH101</i>	TTGCTGTCCAGTTGCTACG	GGCGTAATCCCAAGAGACAT A
<i>bHLH39</i>	CAGAGCTGCAAGAGCAAGTG	ACCAAGCCTAGTCGCAGAAA
<i>BRUTUS</i>	GCTCTGGCACAAGTCAATCA	CGTTCATCAAATGCCGATAA
<i>CCH</i>	AAGTTGGTATGTCATGCCAA	ATATCAATGTCAAATGACTCA A
<i>COPT2</i>	CCTTTCGTATTTGGTGATGCT	AAACACCTGCGTTAAAGGAC
<i>CRK21</i>	CCAAACCAACTTGACGGAGT	CCGGCAGCATGACCTATTAT
<i>CSD2</i>	GTCCTACAACTGTGAAT	TCCATGAGGCCCTGGAGT
<i>CTH1</i>	ACTGGAGCTTGTTGTTACGG C	GTGGATGCCTAATCACAGGA C
<i>CTH2</i>	CTACGCAGAAGGTGTCTGTG CG	CCTCCTGATCTTCTTTCTTCC CTC
<i>eIF6A</i>	TCTCGTGGGCAGTTACTGTG	TCTGAACCGCAGAAAGAGGT
<i>F6´H1</i>	TCTACACGTGCGTTCTCTGG	AAATCGGTTCTCTCCGTTT

<i>Fd2</i>	GTCTCCGTTCCCTTCCATCA	TGAGAACAACCCTTCACCA
<i>FER1</i>	CACCCAGCTAAGGATGATCG	TCAGAAGCATCTGGTCGAAA
<i>FER3</i>	AGAGTGTGTTTCTGAACGAA C	CCAAACTGCGAGATTACAGC
<i>FIT1</i>	TTTTCGCGGTATCAATCCTC	GGTATGTGTCCGGAGAAGGA
<i>FRO2</i>	GTTGGTTTATAGCCCGACGA	GGGCCGTAAGGACCTTCTAC
<i>FRO3</i>	GATTCTACTGGCTTCTCTTGG	CTAATCCGGCCTTCACTAAC
<i>FSD1</i>	ACCGAAGACCAGATTACATA	TGGCACTTACAGCTTCCCAA
<i>IRT1</i>	CCCCGCAAATGATGTTACCTT	GGTATCGCAAGAGCTGTGCA T
<i>ISPG</i>	TGGAAGAACGCTTTTCGACT	CCGGGAGAACCACCTACATA
<i>LRR</i>	GGTACTGCGACGAAGGAGAG	ATTGGTGGTTTGCATCCATT
<i>miR398C</i>	AAGTCCGCCGATTAGGATCT	CGTCCTCGTTTCTCTCTACG
<i>MitoNEET</i>	AAGCAGCAGAGAATGGTGGT	TGCTTCACATGACTCCCATC
<i>NAS1</i>	CGAGCACTTGGAGAAACACA	ACATGCATCCACGAGTACCA
<i>NAS2</i>	CGTTCAAACCTCGTTTCTC	TAGCATCACCACAGCTCCAG
<i>NIR1</i>	CTCAGAGAAACCGACAGAAG	TGTAGCCTACCAACCGGAAC
<i>Per39</i>	TTTCATGACTGCTTCGTTTCG	TGATATCAGCGCAAGAGACG
<i>Per40</i>	TCTACTCGTGGGTGGAACC	CAATCACTTGAACCCTCGT
<i>Plantacyanin</i>	TGACTCTCATGGCTGTGTCA	CACTACGTTGTGCATCCTCG
<i>RAD3</i>	TTTTAGCAGCCGAGAATCGT	AAACACCAGGAGGCAACAAC
<i>SDH2-2</i>	TGCCGCATATGTTTGTGATT	GCTAGGGCAAGACGTGCTAC
<i>SOME-like</i>	GTTTAGCCGTACGTTGATT	CTGACGTGGAGAATGAGCAA
<i>TSO2</i>	CTGGCTGAAGAAACGAGGAC	TCGCAGACGATTGATTTTAC
<i>UPB1</i>	AAGACCTTGTGCGCAATAC	TTTCGGTCAAACCTGAACC
<i>ZAT12</i>	GACACAGGAACGAGAGTGGG	TTCAACGTAGTACCCTGGG
<i>OscOPT1</i>	GCGTACCTGCTCATGCT	GTCGTTCTTGCGGTCTC
<i>OscOPT5</i>	TGCACATGACCTTCTTCTGG	CGCGAGCATGATGAGGTAT
<i>OscOPT7</i>	CTCCGCCTTCTACCAGTACC	GGCGAGCATGAGGAGGTAG
<i>OsFER2</i>	CGCAGTAGCAATGGAGTGAA	CCCCAAAATACACCATCACC
<i>OsFd1</i>	AGGGATCGACCTGCCTTACT	ATGAGGTGCTCCTCTTGTG
<i>OsCDGSH</i>	GGAAGGAGGAGGAGAAGGTG	CAAGTAAGGGCCCCACATTA

<i>OsATX1</i>	AGTCCATGCCTCAGGTTGAT	ACCGACCTTGAGGACAACAG
<i>OsMT1c</i>	CAACCCTGCAACTGCTAAA	CACTTGGTTTTCCAGCCATAA
<i>OsMT1f</i>	TGAGAAGATCACCACCACCA	TTAGCAGTTGCAGGGGTTG
<i>OsNAS1</i>	AAGGTCGGTGCCGCCGCC	TTAGACGGACAGCTCCTTGT
<i>OsNAS2</i>	GTTCCAGAAGGCGGAAGAGT	GCCTAGCATCATCCACACAA
<i>OsNAAT1</i>	TTTATCCAAGGTGGCAGAGG	ATTGCTACCCAACCAAGTCG
<i>Actin1</i>	ATCCTTGTATGCTAGCGGTC GA	ATCCAACCGGAGGATAGCAT G
<i>OsCDS1.1</i>	GCATGTCAACTGGACCACAC	TCAGGATCAGCATGGACAAC
<i>OsCDS1.2</i>	TTTGTCCAAGAGGGAGATGG	CATTTCCAAGATCACCAGCA
<i>OsCSD2</i>	ATCATATGGATTTGCAACA	GCCAGCAACAAGGCTGTTAT
<i>OsFSD1.1</i>	GTCGTACAGGCAGCTTACA	GGATTCAAACATGGACAGCA
<i>OsFSD1.2</i>	ACAAAGGCAGGGCTGTAGAT	TGGGTTGCCGTTGTTGTATG
<i>OsHRZ1</i>	GAATTCCACAAATGCCGGGA GAAAGG	AGCCAGCAAGGCGTCCAA
<i>OsHRZ2</i>	TGAAGCTGCATTGGTCACTC	TATCAGCCGTTTGTGAGCAG

Los datos obtenidos se analizaron mediante el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak y Schmittgen, 2001). Para ello, se utilizó el gen de referencia (*ubiquitina* en *Arabidopsis* y la *actina* en *Oryza*) y el valor de Ct para cada gen en particular y se refirió al valor de Ct obtenido con el gen de referencia en esa misma muestra (ΔCt). Posteriormente, este valor se refirió al ΔCt de la muestra de referencia (valores referidos al ΔCt promedio de las muestras de cDNA obtenido) y, de esta manera, se obtuvo el valor $\Delta\Delta Ct$ que se aplicó en la fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

2.6. Micromatrices de DNA

El estudio de expresión del genoma de arroz, se llevó a cabo utilizando micromatrices de oligonucleótidos de DNA de 45 K de todo el genoma de arroz, adquiridos en la *Universidad de Arizona* (<http://www.ag.arizona.edu/microarray>). El RNA de cuatro muestras biológicas independientes de la parte aérea de plántulas de 8 d, cultivadas en cada condición (($1/2$ MS and $1/2$ MS + $75 \mu\text{M}$ CuSO_4) fueron amplificadas con el Kit *MessageAmp aRNA* (*Ambion*). El RNA amplificado (aRNA)

fue marcado usando el *CyDye Post-Labeling Reactive Dye Pack*, que genera sondas fluorescentes marcadas con Cy3 y Cy5 mediante un método (amino allyl) post-marcaje (*GE Healthcare*). Cada muestra biológica se marcó con Cy3 y Cy5, para obtener 4 pares de réplicas intercambio de marcaje (dye-swaps), que se usaron para la hibridación de las micromatrices. Tanto el RNA amplificado (aRNA), como el aRNA marcado se cuantificaron en un espectrofotómetro *NanoDrop ND-1000* (*Thermo scientific*). La hibridación se llevó a cabo siguiendo el siguiente protocolo: las micromatrices fueron re-hidratadas exponiéndolas a vapor de agua durante 10 s (4 veces). Después, se fijaron mediante una irradiación de ultravioleta (UV) de 180 mJ en *Stratalinker 1800 UV* (*Stratagene*). Posteriormente, las micromatrices se lavaron con dodecil sulfato de sodio 1 % (SDS) (p/v) durante 5 min y 10 veces con H₂O milliQ (*Millipore*), se lavaron con etanol al 100 % 5 veces y luego se secaron por centrifugación a 200 g. Después de este pretratamiento, se hibridaron durante la noche a 55 °C con solución de hibridación [48 pmol de cada muestra etiquetada; formamida desionizada al 50 % (v/v)] 3X citrato de sodio salino (SSC); Solución de Denhardt [5X y SDS 0,1 % (p/v)]. La solución de hibridación se desnaturalizó durante 5 min a 65 °C y se aplicó entre la micromatriz y un cubreobjetos *LifterSlip™* (*Erie Scientific*). Después de la hibridación, se lavaron con SSC y SDS a concentraciones decrecientes y se secaron por centrifugación a 1000 rpm. Los microarrays hibridados se escanearon usando un *Gene Kool Autoloader 4200AL* (*Axon / Molecular Devices*) a 532 nm (Cy3) y 635 nm (Cy5). Los valores de expresión se obtuvieron con el software de análisis de microarrays *GenePix Pro 6.0* (*Axon Molecular Devices*). El control de calidad, la normalización y la determinación de los genes expresados diferencialmente se llevaron a cabo en R usando el paquete *Limma* (Smyth, 2005), como se describió previamente Andrés *et al.* (2009). Para determinar la relación de falsos positivos (FDR), los valores de P se ajustaron mediante una prueba múltiple de acuerdo con el método de Benjamini y Hochberg (1995). Los genes que mostraron una expresión diferencial con un mínimo de *fold-change* (FC) de 2 para ambas condiciones, representados como $\log_2(FC) \geq |1|$ ($-1 > \log\text{-fold change} [\frac{1}{2} \text{ MS} + 75 \mu\text{M} / \frac{1}{2} \text{ MS}] > 1$) con un

p-valor de 0,05 (FDR = 0,5 %) fueron seleccionados. Los conjuntos de datos de microarrays se han depositado en la base de datos pública de NCBI (GSE8910).

2.7. Técnica de inmunodetección de proteínas

2.7.1. *OBTENCIÓN DE EXTRACTOS PROTEICOS*

Las plantas para realizar la extracción de proteínas fueron cultivadas en ½ MS + CuSO₄ 75 µM, durante 7 d, se congelaron en N₂ líquido y se guardaron a -80 °C hasta su utilización. La extracción de proteínas se llevó a cabo triturando el material con un micropistilo en N₂ líquido, para posteriormente añadir tampón SDS 3X [Tris-HCl 250 mM, pH 6,8; glicerol 20 % (v/v); SDS 4 % (p/v); β-mercaptoetanol 10 % (v/v) y azul de bromofenol 0,025 % (p/v)], añadiendo una relación 1:2 (p/v). La muestra se hirvió durante 30 min a 90 °C y se centrifugó a 12000 rpm a 4 °C durante 30 min para eliminar los restos celulares y el tejido restante que no se haya disgregado. Se recogió el sobrenadante y se guardó a -20 °C. Se cargaron 20 µl del extracto de proteína y se separó por electroforesis en geles de poliacrilamida al 12,5 % (p/v) con SDS.

2.7.2. *TRANSFERENCIA Y DETECCIÓN DE PROTEÍNAS*

La transferencia de los geles de proteínas se realizó a una membrana de nitrocelulosa de 0,45 µm (*Biorad*) a 40 V durante 3 h, utilizando tampón de transferencia [Tris 25 mM, pH 9,3; glicina 192 mM y metanol 20 % (v/v)]. Para comprobar la presencia de las proteínas en la membrana, se llevó a cabo la tinción de la membrana con una solución con *Ponceau* (*Ponceau* 0,1 % en ácido acético 1 %). Después se destiñó la membrana con una disolución de ácido acético 1% y se realizaron 3 lavados con TTBS [Tris-HCl 20 mM, pH 7,5; NaCl 0,5 M y Tween-20 0,1 % (v/v)].

La inmunodetección en membrana se realizó utilizando el anticuerpo anti-HA marcado con peroxidasa diluido (1/10000) en tampón TTBS. En primer lugar, se

bloqueó la membrana con leche desnatada en polvo 5 % (p/v) durante 30 min y se lavó con tampón TTBS 5 min. La membrana se incubó con el anticuerpo primario durante 1 h y se lavó con TTBS 3 veces, de 10 min cada uno. La detección final del complejo antígeno/anticuerpo-peroxidasa se efectuó con el sistema *ECL* (*Amersham*), siguiendo las recomendaciones del fabricante y exponiendo la membrana en el sistema *ImageQuant LAS 4000* (*GE Healthcare Life Science*).

2.8. Determinación del contenido endógeno de cobre y hierro

Para determinar el contenido en Cu y Fe en levadura, se recogieron 5 OD₆₀₀ de células por centrifugación a 4000 rpm durante 1 min a 4 °C, se lavó el material recogido con EDTA 1 mM, se volvió a centrifugar 12000 rpm 30 s, se lavó dos veces con H₂O MilliQPLUS (*Millipore*) y se eliminó el sobrenadante por aspiración. El pellet se congeló en hielo seco y se guardó a -80 °C. Para llevar a cabo la digestión de las muestras, se utilizó HNO₃ 3 % (v/v) *Suprapur*[®] durante 12 h a 100 °C en agitación.

Las plántulas de *Arabidopsis* de 7 d de crecimiento se lavaron con EDTA 20 µM y H₂O MilliQPLUS (*Millipore*), se secaron y se congelaron en N₂ líquido y se guardaron a -80 °C. En el caso de *Oryza*, las plántulas de 8 d se separaron la raíz y los brotes, se lavaron con EDTA 20 µM y H₂O MilliQPLUS (*Millipore*), se secaron y se congelaron en N₂ líquido. Para el análisis de las hojas jóvenes y viejas, el material se recogió y se congeló en N₂ líquido.

Posteriormente, todo el material se liofilizó utilizando un liofilizador (*VirTis sp scientific*) durante 3 d. El material se pesó para obtener el peso seco de las muestras y se llevó a cabo la digestión del material en HNO₃ 65 % (v/v) *Suprapur*[®] durante 12 h en un baño a 100 °C.

Las muestras se analizaron por espectrometría de masas con plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS) en el *Servei d'Instrumentació Científica* (Universitat Jaume I), o en el *Servei Central de Suport a la Investigació*

Experimental (SCSIE) (Universitat de València). Cada medida se realizó por triplicado a partir de muestras de 3 experimentos biológicos independientes.

2.9. Triple Híbrido

El ensayo de triple híbrido en levadura nos sirve para detectar si se produce la interacción entre la proteína Cth2 y la secuencia ARE en el extremo 3' UTR del RNA (Figura M.1).

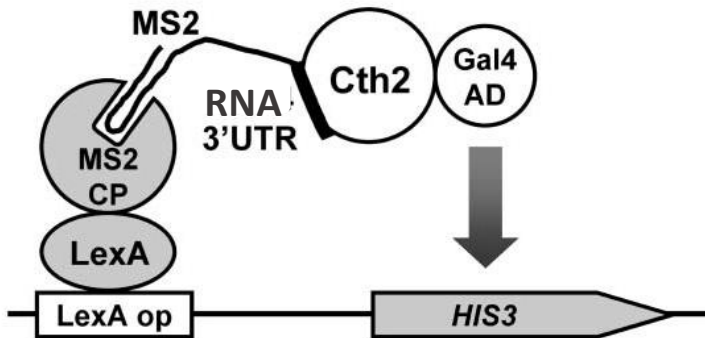


Figura M.1 Esquema representativo del ensayo de triple híbrido para testar la interacción de la proteína Cth2 con el fragmento 3' UTR del RNA. Figura modificada de Puig *et al*, 2005.

Para ello, se obtuvieron los fragmentos del extremo 3' UTR que contiene la secuencia AREs, de unos 100 pb, mediante sqPCR utilizando los oligos correspondientes (Tabla M3) (Figura M.2). Se comprobaron las secuencias en el Servicio de Secuenciación del *Servei Central de Suport a la Investigació Experimental (SCSIE)*, se digirieron con el enzima SmaI y se clonaron en el vector pIIIA-MS2.1.

➤ **ARPN**

GUAGUUUGGAAGAUUCAACGGACCUCUUAUUUA**UAUUUAUU**AUAAUUA
 GUUAUAAAAUAUAAUUUCAAAAAUAUAUAUACUGAAAAUGAUUAAAAGA

➤ **LAC17**

UCGGCC**AUUUAU**CGGUUUGACAUGAGGUCAAUUCCUGUUCAAUAAUUUG
 ACAUGAGGUCAAUUUCUUUACA**AUUUAU**ACUGUUGCA

Figura M.2. Fragmentos del extremo 3'UTR clonados de los genes *Plantacianina (ARPN)* y *Lacasa 17 (LAC17)*. En negrita se resalta la secuencia ARE en cada uno de los genes.

Para obtener la proteína AtCth2 se utilizaron como molde dos fragmentos, uno con la secuencia de la proteína silvestre (AtCth2) y otro con una mutación en los dedos de zinc que hace que no se pueda unir al RNA (AtCth2C243R). Se amplificaron utilizando los oligos correspondientes (Tabla M.3), se digirieron con los enzimas BamHI y XhoI y se clonaron en el vector pACT2. Una vez obtenidas ambas construcciones se cotransformó la cepa L40 coat.

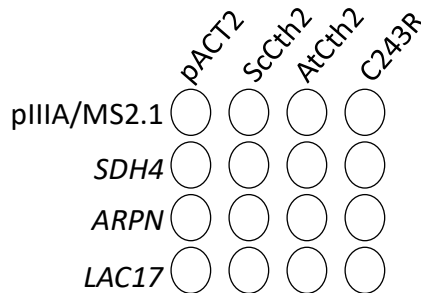


Figura M.3. Combinaciones de las transformaciones realizadas para llevar a cabo el ensayo de triple híbrido.

Se partió de un pre-cultivo de cada una de las combinaciones en SC-ura-leu. Se reinocularon 2 ml de SC-ura -leu con 40 µl del pre-cultivo y se dejaron crecer durante 5 h a 30 °C con 190 rpm de agitación. Pasadas las 5 h se igualaron todas las muestras a OD₆₀₀ de 0,1 y se sembraron en placas con diferentes medios:

- SC-ura-leu, condiciones control para comprobar la cotransformación.

- SC-ura-leu-his, sólo crecerán aquellas cepas donde se produzca la interacción entre el RNA y la proteína, ya que se expresará el gen *HIS3*.
- SC-ura-leu-his + [3-AT], diferentes concentraciones de 3-AT para forzar las condiciones de interacción.

Todos los ensayos se realizaron por duplicado con dos colonias independientes de cada una de las transformaciones. Las placas se dejaron crecer durante 3 d a 30 °C.

3. TÉCNICAS DE ESTUDIO DE PARÁMETROS FISIOLÓGICOS

3.1. Medida de peso fresco y longitud de raíz

Para obtener las medidas de peso fresco y la longitud de las raíces, se sembraron semillas como se describe en el apartado 1.3.2. y para cuantificar la longitud de las raíces las placas se incubaron en posición vertical durante los 7 d de crecimiento de las plántulas. Las medias de peso fresco se realizaron recogiendo 3-5 plántulas, pesándolas en una balanza de precisión (*Sartorius research*) y dividiendo la medida de peso fresco por el número de plántulas recogidas en cada caso. Las medidas de longitud de raíz y tallo se realizaron a partir de fotografías con una cámara digital (*Panasonic Lumix TZ-35*), obtenidas de plántulas de 7-8 d, y analizadas mediante el programa informático *Image J* (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>).

3.2. Determinación del contenido en clorofilas

El contenido en clorofila total en plántulas de *Arabidopsis* se determinó por el método triclorométrico (Parsons y Strickland, 1963). Se recogió el material, se pesó y se congeló a -80 °C para su posterior utilización. Se añadió acetona fría 80 % en una relación 50 mg/ml. Se trituró el material con micropistilo y se incubaron a 4 °C en agitación durante 24 h, manteniendo el material en oscuridad durante todo el proceso. Las muestras se centrifugaron a 12000 rpm durante 10 min y se recogió

el sobrenadante. Se midió la absorbancia a 664.5 nm y 647 nm, que corresponden con los máximos de absorción de las clorofilas A y B, respectivamente. Por último, se determinó el contenido en clorofila total mediante la ecuación:

$$\text{➤ Clorofila Total} = ((17.95 * A_{647}) + (7.9 * A_{664.5})) / (\text{ml acetona} * \text{g peso fresco})$$

3.3. Medida de hormonas

Para la determinación del contenido de ácido abscísico (ABA), ácido indol-3-acético (IAA) y ácido jasmónico (JA), las plántulas de 8 d fueron liofilizadas durante 3 d y después analizadas por UHPLC (ultra-high-pressure liquid chromatography) (*Q-Exactive, ThermoFisher Scientific*) en el *Servicio de Cuantificación de Hormonas Vegetales del Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (IBMCP, Valencia)*.

3.4. Tinción de Perl

Plántulas de 3-5 d o semillas de arroz WT y las dos líneas transgénicas germinaron en ½ MS con diferentes concentraciones de Cu. Se embebieron con una mezcla 1:1 de HCl 4 % (v/v) y *ferrocianuro de potasio* ($K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$, solución de tinción de Perl) 4 % (v/v) durante 15 min y posteriormente se incubaron 30 min a temperatura ambiente (Stacey *et al.*, 2008).

3.5. Actividad ferorrreductasa

Para la determinación de la actividad ferorrreductasa, se recogieron 3 plántulas de 7 d y se pesaron. A continuación, se hizo una mezcla 1:1 con *disulfonato de bathofenantrolina* (*BPDS, Sigma*) 300 μ M y Fe III-EDTA 100 μ M. Se añadió 1 ml de dicha mezcla a la muestra y se incubó a 30 °C en agitación 225 rpm y en oscuridad. Pasados 30 min, se recogió la solución y se midió la absorbancia A_{535} (Grillet *et al.*, 2014a).

3.6. Respiración

Para estudiar la respiración en levaduras, la cepa BY4741 se transformó con el plásmido p416TEFCRT1Δ300. Se reinocularon en SC-ura, a una OD₆₀₀ de 0,2 y se les aplicaron los diferentes tratamientos durante 9 h. Las células correspondientes a 2 OD₆₀₀ y se resuspendieron en 1 ml de medio de respiración YPEG (1 % extracto levadura, 2 % peptona, 2 % etanol, 3 % glicerol), y se transfirieron a una cámara hermética. Se procedió a realizar la medición del consumo de O₂ usando un electrodo de O₂ tipo Clark (*Oxyview system*) durante un mínimo de 6 min. La tasa de disminución de O₂, referenciada a la cantidad de células (nmol O₂ / OD₆₀₀ * min), se tomó como índice de la capacidad respiratoria.

Para estudiar la respiración en *Arabidopsis*, se utilizaron 14-16 raíces de plántulas de 10 d, crecidas en diferentes condiciones. Se cortaron las raíces con bisturí y se resuspendieron en 1,5 ml de medio ½ MS líquido sin sacarosa [macronutrientes (*Sigma*) (NH₄NO₃ 10 mM, KNO₃ 9,4 mM, MgSO₄·7H₂O 0,37 mM, KH₂PO₄ 0,62 mM y CaCl₂ 1,13 mM), micronutrientes (H₃BO₃ 50 μM, MnSO₄·H₂O 36,6 μM, ZnSO₄·7H₂O 15 μM, NaMoO₄·2H₂O 0,57 μM y CoCl₂·6H₂O 0,05 μM, KI 0,25 mM), MES 0,05 % y ajustado a pH 5,7 con KOH). Las raíces se transfirieron a una cámara hermética y se realizó la medición de consumo de O₂ usando un electrodo tipo Clark (*Oxyview system*). En este caso se realizó la medición de consumo de O₂ durante un mínimo de 5 min. La tasa de disminución de O₂, referenciada al P. F de las raíces (nmol O₂ / OD₆₀₀ * P.F.) se tomó como índice de la capacidad respiratoria.

3.7. Estrés oxidativo

Para llevar a cabo el estudio del estrés oxidativo se utilizaron placas con:

- Azul de metileno: medio SC que carecía del requerimiento específico para mantener el plásmido, suplementado con azul de metileno 1 %.

Además de su utilización como indicador de viabilidad celular, el azul de bromofenol se utiliza como indicador de estrés redox debido a que pierde su color azul al reducirse (Nishida y Silver, 2012).

4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS

En el capítulo 1, los análisis estadísticos de los datos obtenidos en levadura se han realizado utilizando el test t-Student de dos colas. Para los capítulos 2 y 3, el análisis estadístico de la expresión relativa se llevó a cabo comparando la expresión relativa de los genes (RT-PCR), basado en una comparación de a pares, fijado en un test de reasignación aleatoria ($p < 0,05$) (Pfaffl, 2001). Para el resto de parámetros, se llevó a cabo un análisis ANOVA de dos vías con el test Duncan ($p < 0,05$), tras comprobar la homogeneidad de varianzas y la normalidad de los datos, y en caso de no cumplirse dichos parámetros, se realizó un test no-paramétrico Kruskal Wallis, utilizando el software *InfoStat*, versión 2010 (<http://www.infostat.com.ar>) (Di Rienzo *et al.*, 2018).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Resultados capítulo 1

1. ESTUDIO DEL EFECTO DE LA ENTRADA DEL IÓN CUPROSO EN *Saccharomyces cerevisiae*

El control de la cantidad de Cu que entra en las células es un proceso que está estrechamente regulado en todos los organismos. El Cu es clave para llevar a cabo diversas funciones básicas de las células, ya que forma parte de enzimas esenciales, como por ejemplo en la cadena de transporte electrónico de la mitocondria. Al mismo tiempo, la capacidad de donar y aceptar electrones hace que sea tóxico, al producir especies reactivas del oxígeno (ROS). Por esta razón, la concentración de Cu en la célula está regulada tanto a nivel de la incorporación y salida del metal del citosol, mediante la activación o represión de los genes que codifican proteínas que participan en la adquisición y compartimentación del Cu, como a nivel de la expresión de proteínas capaces de quelar el Cu y así evitar su efecto tóxico (Gross *et al.*, 2000).

La entrada de Cu en la levadura *S. cerevisiae* se produce principalmente a través de los transportadores de Cu de alta afinidad Ctr1 y Ctr3. Estos transportadores son proteínas con tres dominios transmembrana que presentan su lado amino-terminal hacia el exterior celular y su extremo carboxilo-terminal hacia el citosol. El extremo carboxilo-terminal del transportador Ctr1 de esta levadura es más largo que en otras especies y es rico en residuos de metionina y cisteína (Puig *et al.*, 2002). Estudios anteriores demostraron que el extremo carboxilo-terminal de Ctr1 de levadura regula la entrada de Cu, ya que la pérdida del mismo imposibilita el cierre del canal y como resultado se produce una mayor acumulación de metal, por lo que estas células son más sensibles al exceso de Cu (Wu *et al.*, 2009).

1.1. Obtención y caracterización del mutante CTR1Δ300 con la entrada desregulada de cobre.

Con el propósito de estudiar cómo puede afectar la entrada de Cu^+ alterada a las células de la levadura *S. cerevisiae*, se obtuvo una cepa con el transportador Ctr1 sin el extremo carboxilo-terminal (Figura R1.1). Para ello, se amplificó por PCR un fragmento de DNA que codifica para el gen del transportador *CTR1*, que posee solamente los primeros 300 aminoácidos de la secuencia codificante del gen, obteniéndose de esta forma un transportador truncado. Dicho fragmento se clonó en el vector centromérico de expresión en levadura denominado p416TEF bajo el control del promotor constitutivo *TEF2* (Mumberg *et al.*, 1995; Tabla M.1). Una vez obtenida la construcción y comprobada mediante secuenciación, se transformaron las cepas BY4741 (silvestre) y *ctr1Δctr3Δ* con el vector p416TEF vacío o con la construcción p416TEF-CTR1Δ300.

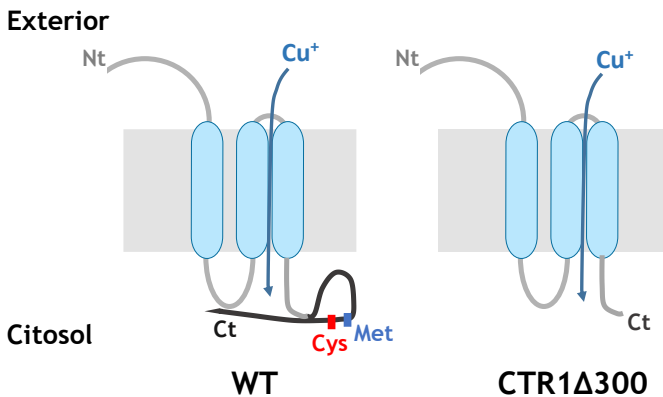


Figura R1.1. Esquema representativo de la estructura del transportador de cobre de alta afinidad Ctr1 silvestre (WT) y mutante (CTR1Δ300) en condiciones de exceso de cobre en el medio.

Con estos transformantes se estudió si el transportador truncado era capaz de complementar los defectos asociados a la falta de transportador de Cu de alta afinidad de la cepa *ctr1Δctr3Δ*. Para ello, se crecieron las cepas *ctr1Δctr3Δ*

transformada con el vector vacío (p416TEF), con el transportador silvestre (p416TEF-CTR1) y con el transportador truncado (p416TEF-CTR1Δ300) en medio líquido SC-ura durante toda la noche. Al día siguiente se igualaron todos los cultivos a una OD₆₀₀ de 0,1 y se realizó un ensayo de crecimiento, sembrando en gotas en placas de medio SC suplementado con el quelante de Fe²⁺, *sulfato de bazofenantrolina* (BPS), que impide la entrada de Fe en la célula. Dado que el transportador de Fe de alta afinidad Fet3-Ftr1 es dependiente de Cu, la cepa que contiene el vector vacío no puede crecer a concentraciones mayores de 10 μM de BPS (Figura R1.2-a). Sin embargo, las cepas que contienen el transportador Ctr1, ya sea silvestre o truncado, fueron capaces de crecer en medio suplementado con concentraciones de BPS de 20 μM (Figura R1.2-a).

Además, se estudió si estos plásmidos complementaban de defecto de respiración de la cepa *ctr1Δctr3Δ*, causado por la falta de funcionalidad de la citocromo oxidasa mitocondrial. Para ello, se realizaron ensayos de crecimiento en un medio sin glucosa, pero con las fuentes de carbono no fermentables etanol y glicerol (YPEG), lo que obliga a las células a respirar. De nuevo, las células con *CTR1* silvestre y *CTR1Δ300* crecieron en YPEG, mientras que la cepa que contenía el vector vacío era incapaz de crecer (Figura R1.2-a). Estos resultados demuestran que Ctr1Δ300 transporta Cu, ya que su presencia permite la utilización del metal por las cuproproteínas de la célula.

Por otro lado, se determinó si la entrada de Cu produce algún tipo de toxicidad en las células. Para ello, se llevó a cabo un experimento de crecimiento en gotas en medio SC-ura suplementado con concentraciones crecientes de Cu de la cepa BY4741 transformada con el vector vacío (p416TEF), con el transportador silvestre (p416TEF-CTR1) y con el transportador truncado (p416TEF-CTR1Δ300). Se partió de un precultivo crecido toda la noche en medio SC-ura y se igualaron todos los cultivos a una OD₆₀₀ de 0,1. La cepa con el transportador mutante Ctr1Δ300 era incapaz de crecer en medio sólido a concentraciones superiores a 0,01 mM de CuSO₄ (Figura R1.2-b). Sin embargo, el crecimiento de la cepa que expresaba el transportador Ctr1 intacto sólo estaba afectado a partir de concentraciones de CuSO₄

Resultados Capítulo 1

mayores de 1 mM, y la cepa que contenía el vector vacío era capaz de crecer incluso a una concentración de CuSO_4 de 2 mM. Por lo tanto, este ensayo de gotas corrobora que la cepa que contiene el transportador truncado es más sensible a la

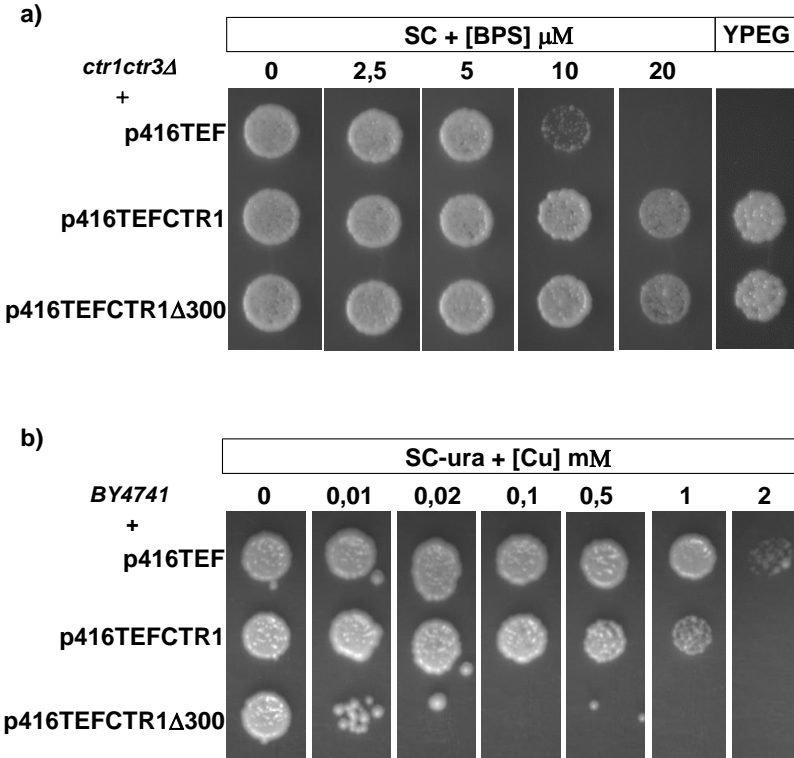


Figura R1.2. Caracterización de la cepa CTR1Δ300 en diferentes medios sólidos mediante ensayos de gotas. (a) Ensayo de complementación de la cepa *ctr1Δctr3Δ* mediante gotas. Para comprobar la complementación se transformó la cepa *ctr1Δctr3Δ* con el vector p416TEF, p416TEF-CTR1 y p416TEF-CTR1Δ300. Se utilizó medio SC con diferente aporte de quelante de Fe (BPS) y medio YPEG para forzar condiciones de respiración. (b) Ensayo de sensibilidad al Cu de la cepa BY4741 mediante ensayo de gotas. Para comprobar la sensibilidad al Cu, se transformó la cepa BY4741 con el vector vacío (p416TEF), con el transportador Ctr1 silvestre (p416TEF-CTR1) y con el transportador truncado (p416TEF-CTR1Δ300) y se crecieron en medio SC-ura suplementado con diferentes concentraciones de CuSO_4 . Las placas se incubaron durante 2 días a 30 °C.

concentración de CuSO_4 del medio de crecimiento, debido a que en ausencia del extremo carboxilo terminal no se puede inhibir el transporte del metal.

Aunque el ensayo de gotas ya informaba de un defecto del crecimiento de la levadura cuando tiene el transportador truncado, se determinó si esta sensibilidad también se observaba en el medio líquido. Para ello, se realizó un estudio del crecimiento en medio SC-ura líquido con diferentes concentraciones de CuSO_4 . De partida, se igualaron todos los cultivos a una OD_{600} de 0,2 y se tomaron medidas de la OD_{600} cada hora y por duplicado durante 9 h (Figura R1.3). La cepa WT no mostró defectos de crecimiento cuando se añadió una concentración de $250 \mu\text{M}$ CuSO_4 en el medio. Sin embargo, la cepa con el transportador truncado disminuyó rápidamente su tasa de crecimiento cuando el Cu aumentó en el medio, viéndose ésta muy comprometida cuando se le añadieron concentraciones de $7,5 \mu\text{M}$ de CuSO_4 o superiores. Estos resultados indican que la cepa con el transportador Ctr1

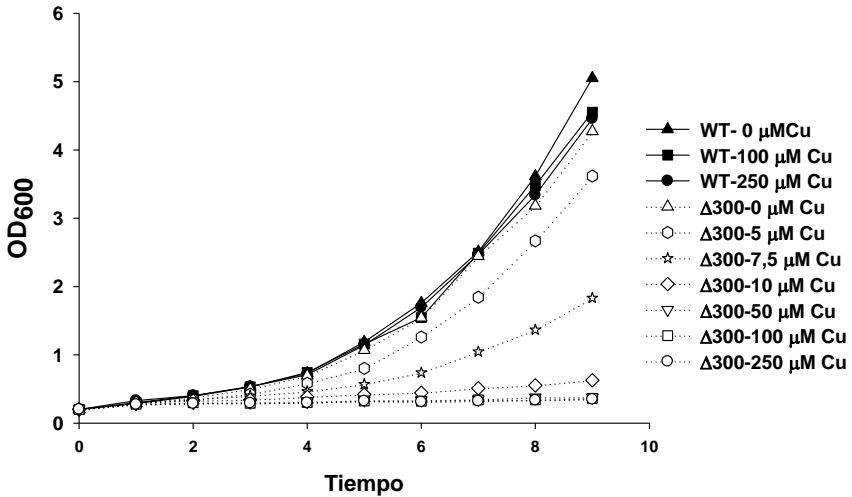


Figura R1.3. Curvas de crecimiento de las cepas WT y CTR1 Δ 300 en medio líquido. Se utilizó la cepa BY4741 transformada con vector p416TEF vacío (WT, símbolos en negrita) y con p416TEFCTR1 Δ 300 (CTR1 Δ 300, símbolos en blanco). Se midió la OD_{600} , por duplicado a cada hora en medio SC-ura con diferente aporte de CuSO_4 en el medio de crecimiento durante 9 h. Se partió de una OD_{600} de 0,2 en todas las muestras.

Resultados Capítulo 1

truncado es también más sensible a la presencia de CuSO_4 en el medio de crecimiento líquido.

Dado que los datos de la curva de crecimiento mostraron una bajada pronunciada en el crecimiento de la cepa CTR1 Δ 300 cuando las concentraciones en el medio son superiores a $7,5 \mu\text{M}$ CuSO_4 , se comprobó la viabilidad de las células que expresan el transportador CTR1 Δ 300 a diferentes concentraciones de CuSO_4 . Para llevar a cabo el estudio de la viabilidad se utilizó la cepa BY4741 transformada con el vector vacío (WT) o con el transportador truncado (CTR1 Δ 300). Se partió de un precultivo de toda la noche en SC-ura y se refrescó en el mismo medio de crecimiento, con diferente aporte de CuSO_4 , a una OD_{600} de 0,2 y se creció durante 9 h. Una vez transcurrido dicho tiempo, se midieron las OD_{600} de cada cultivo para

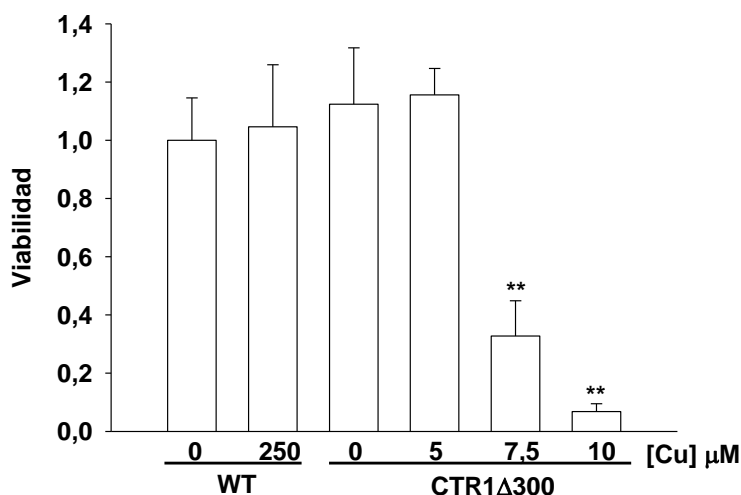


Figura R1.4. Viabilidad de la levadura WT y CTR1 Δ 300 en medio sólido suplementado con CuSO_4 . Levaduras crecidas durante 9 h en medio SC-ura suplementado con diferentes concentraciones de CuSO_4 y sembradas en placas a diferentes diluciones para cuantificar el número de colonias. Las muestras con ** presentan diferencias significativas con p-valor $< 0,01$ frente al WT en $0 \mu\text{M}$ de CuSO_4 , tras aplicar un test t-Student.

sembrar el equivalente de 30-300 colonias en placas SC-ura sin CuSO_4 . Se sembraron dos diluciones diferentes, por duplicado, cada una de ellas. Se mantuvo durante dos días a 30 °C y se contaron el número de colonias presentes en cada placa. Los resultados obtenidos indican que la viabilidad de la cepa mutante disminuyó un 68 % cuando el medio se suplementó con 7,5 μM de CuSO_4 , y un 93 % con 10 μM de CuSO_4 (Figura R1.4). Estos datos indican que la entrada desregulada de Cu, que se produce en la cepa con el transportador truncado, afecta a la pérdida de viabilidad de la misma.

Para caracterizar con más detalle el comportamiento en medios con Cu de las células que expresan *CTR1* silvestre y *CTR1 Δ 300*, se determinaron los niveles de Cu endógeno. Para ello, se utilizó un cultivo en SC-ura con diferente aporte de CuSO_4 durante 9 h a 190 rpm a 30 °C. Una vez transcurrido el tiempo, se midieron las OD_{600} por duplicado para recoger sólo las células correspondientes a 5 OD_{600} , se lavaron 2 veces con EDTA 1 mM frío y, por último, se lavaron con agua milliQ fría. Las células se digirieron con ácido nítrico al 3 % durante 16 h con agitación (1400 rpm) a 98 °C. Posteriormente, se realizó la medición del contenido de Cu mediante ICP-MS. Con un aporte menor de Cu en el medio de crecimiento (10 $\cdot\text{M}$), la cepa mutante acumuló más Cu que la cepa silvestre (Figura R1.5). Por lo tanto, la mayor acumulación de Cu de la cepa *CTR1 Δ 300*, comparada con la silvestre, afecta negativamente al crecimiento y la viabilidad celular.

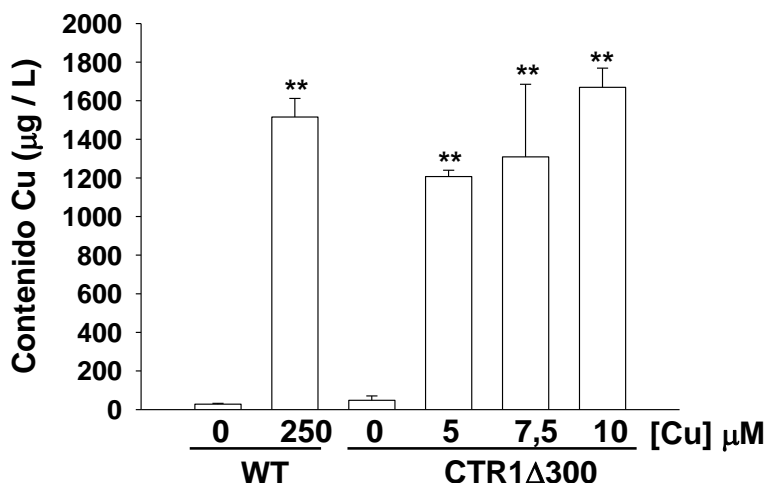


Figura R1.5. Contenido de cobre de la levadura silvestre y la cepa mutante CTR1Δ300. Medida de Cu mediante ICP-MS de la cepa WT y CTR1Δ300 cultivadas durante 9 h en medio SC-ura líquido suplementado con diferente aporte de CuSO₄. Las muestras con ** indican que tienen diferencias significativas con p-valor < 0,01 frente al WT en 0 µM de CuSO₄, tras aplicar un test t-Student.

Estudios anteriores indicaban que la expresión de las metalotioneínas *CUP1* y *CRS5* aumenta en condiciones de exceso de Cu, debido a la activación del factor transcripcional Ace1 regulado por Cu (Gross *et al.*, 2000). Verificamos si se observaban estas diferencias entre las cepas WT y CTR1Δ300 a nivel molecular. Para ello, se creció la cepa BY4741 transformada con el vector vacío (WT) o con el transportador truncado (CTR1Δ300), partiendo de una OD₆₀₀ de 0,2 durante 9 h a 30 °C con diferente aporte de CuSO₄ en el medio SC-ura. Pasado dicho tiempo, las células se recogieron, se lavaron con agua fría y se conservaron a -80 °C hasta su utilización. Se extrajo el RNA de cada muestra (apartado 2.1 de material y métodos) y se obtuvo el cDNA correspondiente (apartado 2.3 de material y métodos). A continuación, se midió mediante qPCR el nivel de mRNA de *CUP1* y *CRS5*. Los niveles de mRNA de *CUP1* y *CRS5* aumentaron en la cepa mutante CTR1Δ300 con tan solo 5 µM de CuSO₄ en el medio, mientras que la cepa WT mostró dicha

activación cuando se suplementa el medio con 250 μM de CuSO_4 (Figura R1.6-a). Estos resultados indican que las células $\text{CTR1}\Delta 300$ activan la expresión de las metalotioneínas como respuesta a la entrada de Cu.

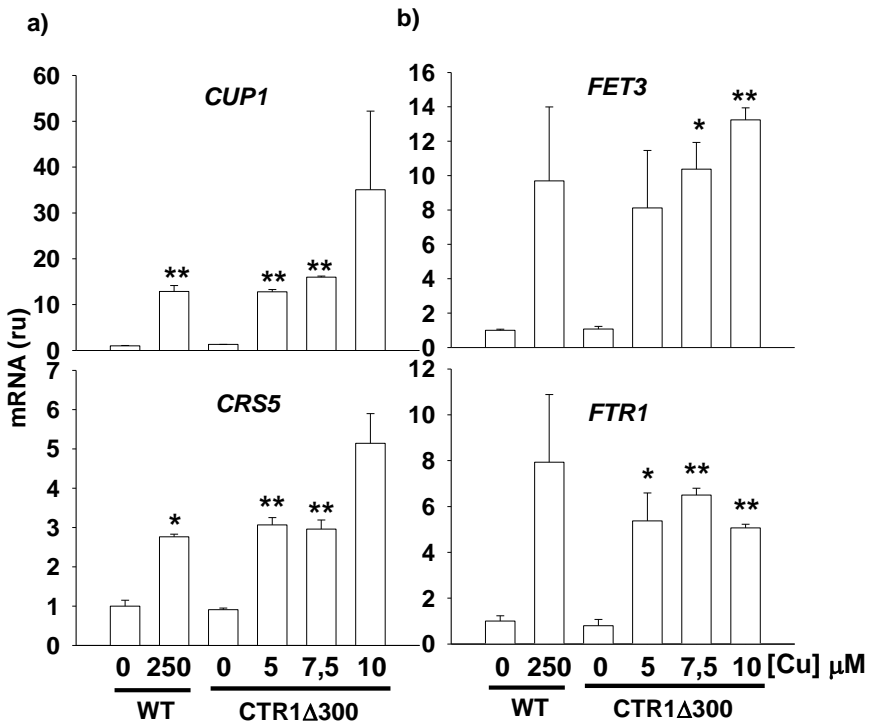


Figura R1.6. Expresión génica mediada por exceso de cobre en las cepas WT y $\text{CTR1}\Delta 300$. a) Expresión génica de las metalotioneínas *CUP1* y *CRS5* en la cepa WT y $\text{CTR1}\Delta 300$ en diferentes concentraciones de CuSO_4 en el medio de crecimiento SC-ura durante 9 h. b) Expresión de la metalorreductasa *FET3* y el transportador de Fe de alta afinidad *FTR1*, en las mismas condiciones que en a. Expresión relativa a la expresión de *ACT1* (*actina*). Las muestras que tienen diferencias significativas frente al WT en 0 μM de CuSO_4 , muestran, * p-valor < 0,05 y ** p-valor < 0,01.

Así mismo, se estudió la expresión de genes implicados en la homeostasis del Fe, como el transportador de Fe de alta afinidad *FTR1* y la metalorreductasa

dependiente de Cu *FET3*, que también se inducen en condiciones de exceso de Cu (Gross *et al.*, 2000). Recientemente, se ha descrito que la inducción de *FTR1* y *FET3* por exceso de Cu también depende de *Ace1* (Gaspar-Cordeiro *et al.*, 2018). De acuerdo con estos antecedentes y con el mayor nivel de Cu endógeno presente en las células CTR1 Δ 300, el patrón de expresión de los genes *FTR1* y *FET3* fue muy similar al de *CUP1* y *CRS5* (Figura R1.6-b).

En conjunto, estos datos indican que las células que expresan el transportador de Cu truncado CTR1 Δ 300 poseen una mayor capacidad de adquisición de Cu. Este Cu es utilizado por las cuproproteínas Fet3 y la citocromo oxidasa. El exceso en la entrada de Cu produce la activación del factor transcripcional *Ace1*, ya que observamos la expresión de sus dianas. Sin embargo, esta activación, que incluye el aumento en la expresión de metalotioneínas, no impide la inhibición del crecimiento de la cepa CTR1 Δ 300, por lo que dicho aumento en la capacidad de quelar el metal no es suficiente para mantener la viabilidad de estas células.

1.2. Caracterización de la respuesta del regulón de hierro en la cepa CTR1 Δ 300.

Dado que los datos de expresión génica mostraron que, cuando se produce una mayor entrada de Cu en la levadura, aumenta la expresión de diversos genes del regulón de Fe, se comprobó el contenido de Fe intracelular. De igual manera que en el apartado anterior, se procesaron las células para la determinación de metales (apartado 2.8 de materiales y métodos). Cuando se suplementó el medio de cultivo con 5 μ M de CuSO₄ la medición de metales mediante ICP-MS mostró que la cepa CTR1 Δ 300 acumuló mayor contenido de Fe, en comparación con la silvestre y con ella misma en 0 μ M de CuSO₄ (Figura R1.7). Sin embargo, al añadir mayores cantidades de Cu al medio, no se apreciaron diferencias significativas en el contenido en Fe, posiblemente debido a que la reducida viabilidad de estas células hizo que los valores obtenidos presentaran mucha variabilidad (Figura R1.4).

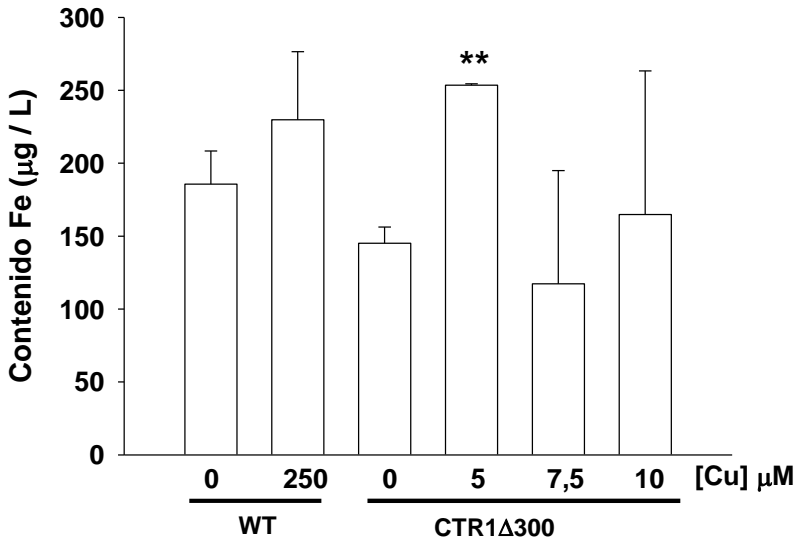


Figura R1.7. Contenido de hierro de la levadura silvestre y la cepa mutante CTR1Δ300. Medida de Fe mediante ICP-MS de la cepa WT y CTR1Δ300 cultivadas durante 9 h en medio SC-ura líquido suplementado con diferente aporte de CuSO₄. Las muestras con ** indican que tienen diferencias significativas frente al WT en 0 µM de CuSO₄, con p-valor < 0,01 tras aplicar un test t-Student.

Dado que el contenido en Fe de la cepa CTR1Δ300 en 5 µM de CuSO₄ es significativamente mayor que el de la cepa silvestre, en el siguiente experimento se estudió la expresión de otros genes del regulón de Fe, a partir de las mismas muestras utilizadas en el apartado anterior. Para ello, se analizó la expresión de *FIT1* y *FIT3*, ambos implicados en facilitar la adquisición de Fe (Protchenko *et al.*, 2001). Aunque no se encontraron diferencias significativas en la expresión de *FIT1* entre la cepa WT y CTR1Δ300, *FIT3* mostró mayor expresión en la cepa mutante en 10 µM de CuSO₄ (Figura R1.8).

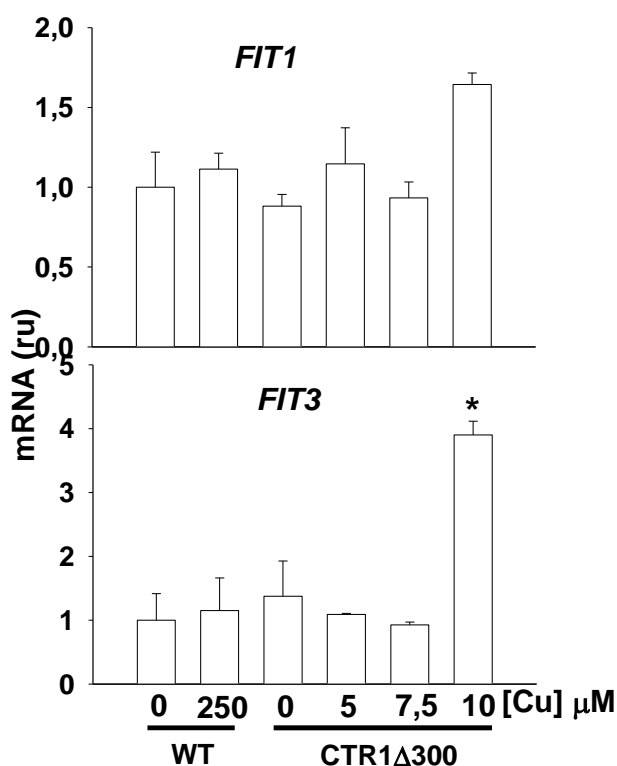


Figura R1.8. Expresión de genes del regulón de hierro en la levadura silvestre y la cepa mutante CTR1 Δ 300. Expresión de *FIT1* y *FIT3* en las cepas WT y CTR1 Δ 300 en medio SC-ura con diferente aporte de CuSO₄, cultivadas durante 9 h. Expresión relativa a la expresión de *ACT1*. Las muestras con diferencia significativa frente al WT en la condición de 0 μM de CuSO₄, presentan * indica p-valor < 0,05 tras aplicar un test t-Student.

Se analizó por qPCR la expresión de otros genes relacionados con la homeostasis del Fe, como el gen de la ruta de biosíntesis de la leucina, *LEU1*, cuya proteína contiene centros Fe-S necesarios para llevar a cabo su función (Ryan *et al.*, 1973). El gen *LEU1* presentó una disminución en la expresión en la cepa mutante CTR1 Δ 300 cuando se suplementó el medio de crecimiento con CuSO₄. Resultados similares se obtuvieron para el gen que codifica la aconitasa, *ACO1*, y el gen que codifica la ferroquelatasa, que participa en la biosíntesis de los grupos

hemo, *HEM15*, ambas proteínas también utilizan Fe como cofactor para su actividad enzimática (Labbe-Bois, 1990).

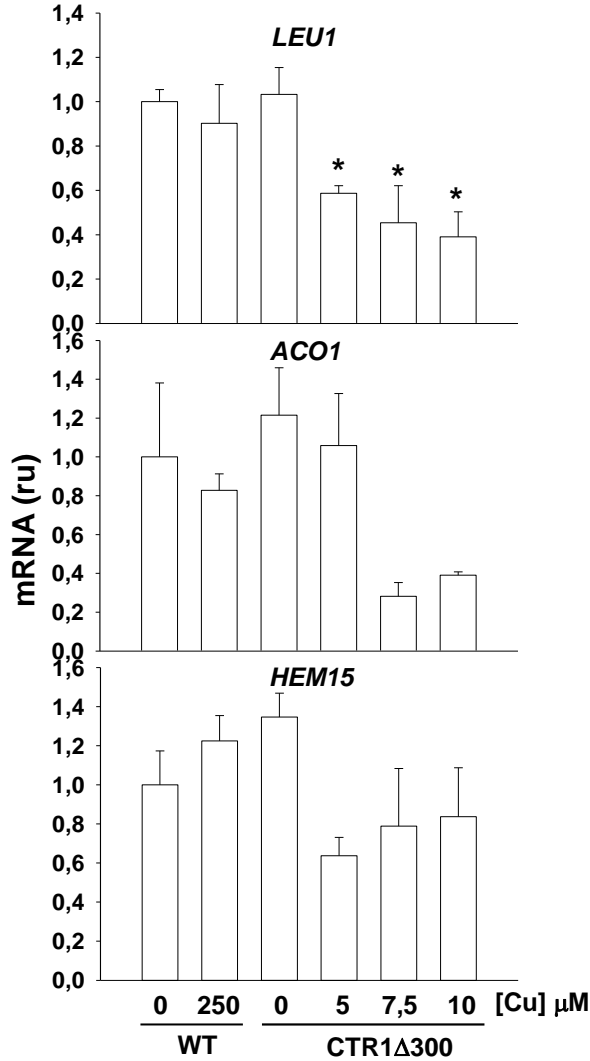


Figura R1.9. Expresión génica de la cepa WT y CTR1 Δ 300. Expresión de los genes *LEU1*, *ACO1* y *HEM15* en la cepa WT y CTR1 Δ 300 en diferentes concentraciones de CuSO_4 en medio de crecimiento SC-ura durante 9 h. Expresión relativa a la expresión de *ACT1*. Las muestras que tienen diferencias significativas frente al WT en 0 μ M de CuSO_4 , muestran * p-valor < 0,05 con test t-Student.

En ambos casos se observó una disminución de la expresión en la cepa CTR1Δ300 cuando se añade CuSO₄ al medio (Figura R1.9). Estos resultados sugieren que la expresión de genes que codifican proteínas de Fe está afectada cuando la cepa CTR1Δ300 se cultiva en medios con concentraciones crecientes de CuSO₄.

1.3. Estudio del papel del regulador *CTH2* en la respuesta de la cepa CTR1Δ300.

Los resultados anteriores demostraban que la expresión de algunos genes de la homeostasis del Fe se encontraba alterada en la cepa con el transportador Ctr1Δ300. Cth2 es un regulador post-transcripcional de genes relacionados con la homeostasis de Fe en levadura como *LEU1* y *ACO1* (Puig *et al.*, 2005). En primer lugar, se comprobó la expresión de *CTH2* en las cepas silvestre y mutante CTR1Δ300 (Figura R1.10). La expresión del gen *CTH2* aumentó en la cepa WT cuando se suplementó el medio con CuSO₄, mientras que la activación en la cepa CTR1Δ300 se produjo con menor aporte de CuSO₄ en el medio, 5 μM CuSO₄. Sin embargo, la desviación en las distintas muestras no permitió observar diferencias significativas, frente al WT en 0 μM de CuSO₄, en cantidades superiores de Cu, posiblemente debido a la baja viabilidad de las células en estas condiciones.

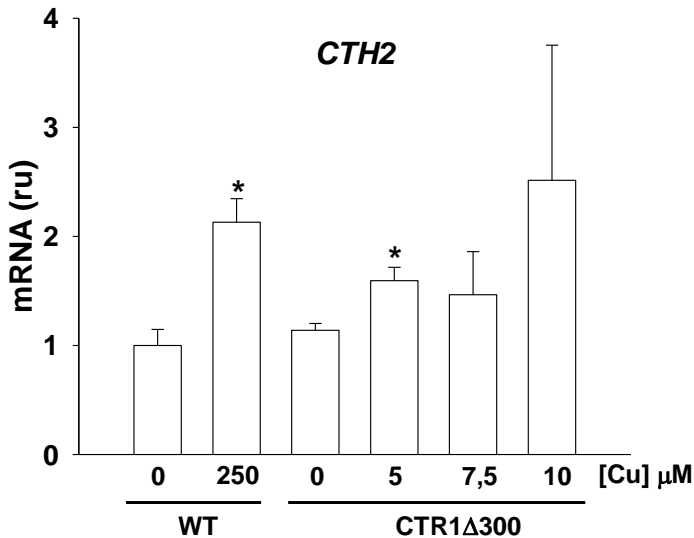


Figura R1.10. Expresión de *CTH2* en la cepa WT y CTR1 Δ 300. Expresión del gen *CTH2* en la cepa WT y CTR1 Δ 300 en diferentes concentraciones de CuSO_4 en el medio de crecimiento SC-ura durante 9 h. Expresión relativa a la de *ACT1*. Las muestras que tienen diferencias significativas frente al WT en 0 μM de CuSO_4 , muestran * p-valor < 0,05 con test t-Student.

Cth2 es un regulador postranscripcional negativo que se une a sus mRNAs dianas e impide que éstos se expresen, eliminando así los mensajeros de aquellos genes que codifican proteínas que unen Fe, cuyos niveles interesa reducir en condiciones de deficiencia (Puig *et al.*, 2005). Puesto que se observó un aumento en la expresión de *CTH2* y un descenso de alguna de sus dianas, se analizó si dicha respuesta se debía a la función de Cth2 como regulador negativo. Para ello, se utilizó la cepa *cth1 Δ cth2 Δ* (Tabla M2), y se cotransformó con un vector que contiene el gen *CTH2* (pRS415-CTH2) y el vector con el transportador *CTR1 Δ 300* (p416TEF-CTR1 Δ 300), o con el vector pRS415 vacío y p416TEF-CTR1 Δ 300 (Figura R1.11).

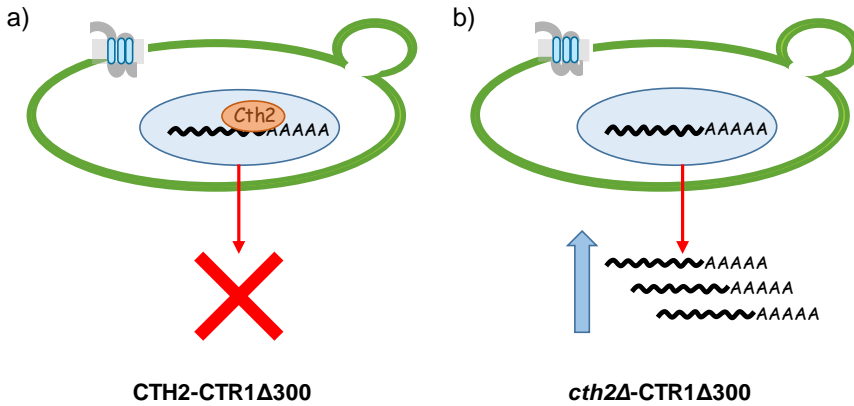


Figura R1.11. Esquema de las transformaciones utilizadas para caracterizar el papel de Cth2. Transformación de la cepa *cth1Δcth2Δ* con: (a) pRS415-CTH2 y p416TEF-CTR1Δ300, o (b) pRS415 y p416TEF-CTR1Δ300.

Una vez obtenidas las cepas transformadas y purificadas, se procedió al cultivo durante 9 h con diferentes concentraciones de CuSO_4 en el medio y se realizó un análisis de la expresión de diversos genes mediante qPCR. Se comprobó la ya mencionada inducción de la expresión del gen *CTH2* por Cu. Dicha inducción no se produjo en las cepas que contenían el vector pRS415 vacío. También se determinó que la expresión de la metalotioneína *CUP1* mostraba un aumento cuando se añadía CuSO_4 al medio y que no había diferencias entre ambas construcciones (Figura R1.12-a). A continuación, pasamos a estudiar la expresión de los genes *LEU1* y *ACO1*, que en los análisis anteriores mostraban una bajada en la expresión en el mutante CTR1Δ300 (Figura R1.9). Se puede apreciar cómo la ausencia del regulador Cth2 (*cth2Δ*) no afecta a la expresión de ambos genes, por lo que se

concluyó que el regulador Cth2 no es el responsable de la misma (Figura R1.12-b).

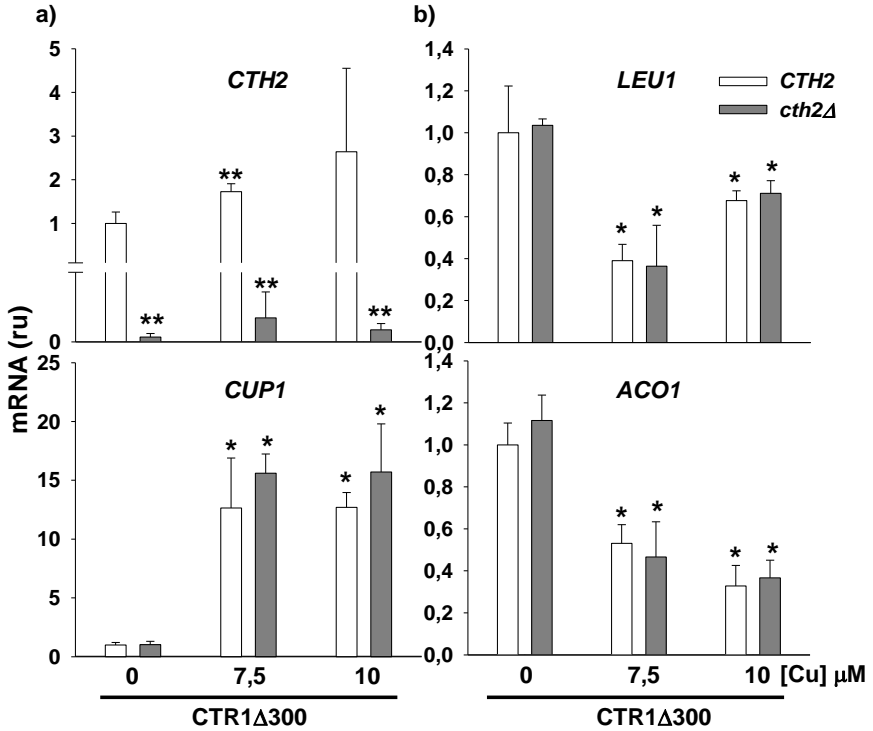


Figura R1.12. Expresión génica en la cepa *cth1Δcth2Δ*. a) Expresión de los genes *CTH2* y la metalotioneína *CUP1* en la cepa *cth1Δcth2Δ* transformada con pRS415-CTH2 y p416TEF-CTR1Δ300 (blanco) o pRS415 y p416TEF-CTR1Δ300 (gris), crecidas durante 9 h en medio SC-ura-leu con diferente aporte de CuSO₄. b) Expresión de los genes *LEU1* y *ACO1* en las mismas condiciones que en a). Expresión relativa a la expresión de *ACT1*. Las muestras con diferencia significativa frente al WT en 0 μM CuSO₄ presentan, * que indica p-valor < 0,05 y ** p-valor < 0,01 con test t-Student.

1.4. Regulación de la expresión proteínas con centros Fe-S en la cepa CTR1Δ300.

En estudios anteriores se ha propuesto que las especies reactivas del oxígeno pueden dañar los centros Fe-S (Bruska *et al.*, 2015). Dada la disminución de la expresión del gen *LEU1*, implicado en la biosíntesis de leucina y que contiene centros Fe-S, se estudió la expresión de otros genes que también contienen centros Fe-S o que contienen Fe en su centro activo. Para ello, se utilizaron las muestras de cDNA obtenido en el apartado 1.1 del capítulo 1 y se analizaron mediante qPCR la expresión de los genes: *BIO2* (2Fe-2S), implicado en la biosíntesis de biotina; *RLI1* (4Fe-4S), factor implicado en la biogénesis y reciclado de ribosomas; *SDH4*, una subunidad de la succinato deshidrogenasa y *TRX2*, el gen de la tiorredoxina 2. A pesar de que el gen *BIO2* aumentó su expresión en la cepa truncada en medio sin suplemento de CuSO_4 o con $5 \mu\text{M}$ CuSO_4 , disminuyó a partir de $10 \mu\text{M}$ CuSO_4 . Por el contrario, la expresión del gen *RLI1* no presentó cambios en la cepa CTR1Δ300, aunque sí que aumentó la expresión en la cepa silvestre con $250 \mu\text{M}$ de CuSO_4 . Por otro lado, los genes *SDH4* y *TRX2*, implicados en la transferencia de electrones, no presentaron diferencias significativas de expresión en las diferentes cepas y condiciones (Figura R1.13). Por lo tanto, sólo cambió la expresión de los genes que codifican proteínas con centros Fe-S.

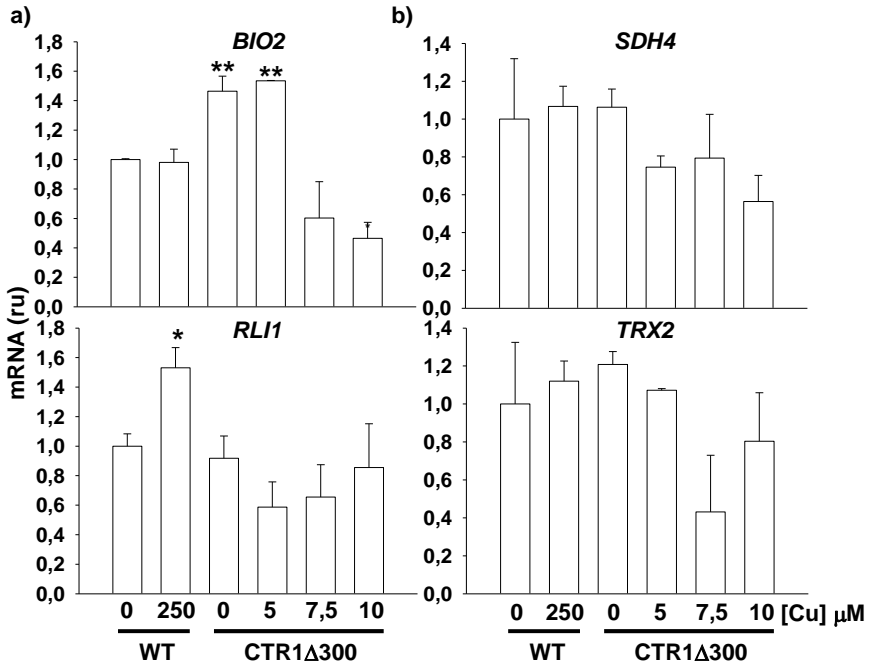


Figura R1.13. Expresión de genes implicados en transferencia de electrones y con centros Fe-S. (a) Expresión de los genes con centros Fe-S, *BIO2* y *RLI1* en la cepa WT y CTR1Δ300 en diferentes concentraciones de CuSO₄ en el medio de crecimiento SC-ura durante 9 h. (b) Expresión de los genes implicados en transferencia de electrones, *SDH4* y *TRX2* en la cepa WT y CTR1Δ300 en las mismas condiciones que en (a). Expresión relativa a la *ACT1*. Las muestras que tienen diferencias significativas frente al WT en 0 μM CuSO₄, muestran * p-valor < 0,05 o ** p-valor < 0,01 con test t-Student.

Estudios previos demostraron que las dificultades de crecimiento de la levadura en medios deficientes en lisina podrían deberse al daño en los centros Fe-S de la homoaconitasa (*Lys4*) (Foster *et al.*, 2014). Dado que se encontró alterada la expresión de los genes *LEU1* y *BIO2*, ambos con centros Fe-S, en la cepa con el transportador truncado, se comprobó si la levadura era capaz de crecer en medio

deficiente en lisina. Se realizó un estudio en medio mínimo de crecimiento (material y métodos 1.2.2) con y sin el aminoácido lisina (Figura R1.14)

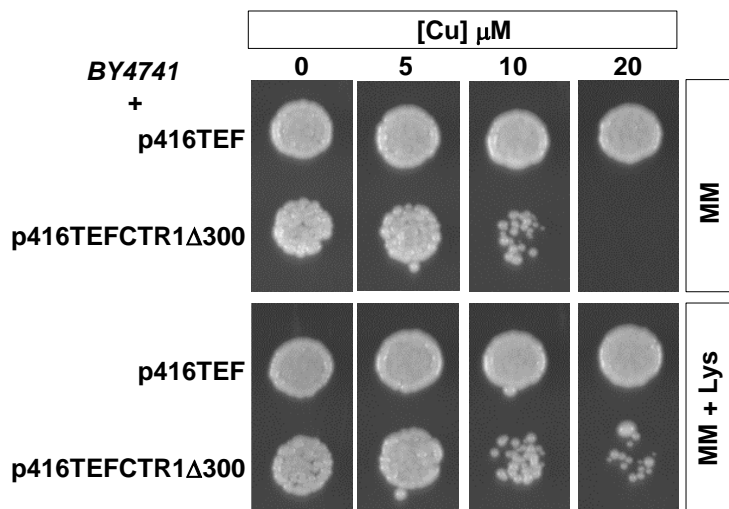


Figura R1.14. Comprobación del daño en los centros Fe-S. Ensayo de gotas de la levadura transformada con el vector expresión constitutiva p416TEF vacío o con el transportador truncado p416TEF-CTR1Δ300, en medio mínimo de crecimiento sin lisina (MM) o con lisina (MM + Lys), con diferente aporte de CuSO₄. Las placas se incubaron durante 2 días a 30 °C.

La adición de lisina mejoró ligeramente el crecimiento de la cepa con el transportador truncado en medios con CuSO₄. Así pues, tanto los estudios de expresión como los de crecimiento, indicaron que los centros Fe-S se encontraban afectados en la cepa que tiene el transportador de Cu truncado y, por lo tanto, no regula de entrada de metal.

Puesto que se observaron alteraciones de la actividad de proteínas con centros Fe-S que se equieren para la cadena de transporte de electrones mitocondrial, se determinó la tasa de respiración, medida como consumo de O₂. Para ello, se comparó el crecimiento de la levadura en medios SC-ura con glucosa o con etanol-glicerol (Material y métodos, apartado 1.1.2), para forzar la respiración (Figura

R1.15-a). La cepa con el transportador truncado (p416TEF-CTR1Δ300) creció peor en medio respiratorio (SC-ura-Et-Glic) que en el medio con glucosa. Mientras que la cepa con el vector vacío no mostró ningún defecto de crecimiento en medio con CuSO₄, la cepa con el transportador Ctr1Δ300 presentó un menor crecimiento conforme aumentó el metal en el medio.

Dado que la capacidad de consumir O₂ disminuye en medios deficientes en Fe (Sato *et al.*, 2018), se realizaron medidas de consumo de O₂ para determinar si la respiración se veía afectada en las muestras con el transportador Ctr1Δ300. Para ello, se crecieron cultivos a 30 °C con 190 rpm durante 9 h con diferente aporte de CuSO₄ o con el quelante de Fe BPS (como control). Se recogieron 2 OD₆₀₀ x ml de células y se resuspendieron en medio YPEG líquido para forzar la respiración. Las medidas del consumo de O₂ se realizaron tal y como se describe en material y métodos (apartado 3.7). Los resultados obtenidos corroboraron que, en condiciones de deficiencia de Fe en el medio (-Fe), el consumo de O₂ disminuye, tanto en la cepa con el vector vacío (p416TEF) como en la que contiene el transportador truncado (p416TEF-CTR1Δ300) (Figura R1.15-b), pero cuando se midió el consumo de O₂ en la cepa con el vector vacío, cultivado en medio SC-ura con 250 μM de CuSO₄, el consumo aumentó 2,5 veces respecto a la condición control. Sin embargo, la cepa con el transportador truncado, cultivada en medio SC-ura suplementado con 5 μM de CuSO₄, donde los resultados anteriores mostraban cambios en la concentración interna de Cu y de Fe, el consumo de O₂ también disminuyó. Por lo tanto, la entrada desregulada de Cu en la levadura con el transportador truncado, provoca una disminución de la tasa de respiración cuando aumenta el CuSO₄ en el medio.

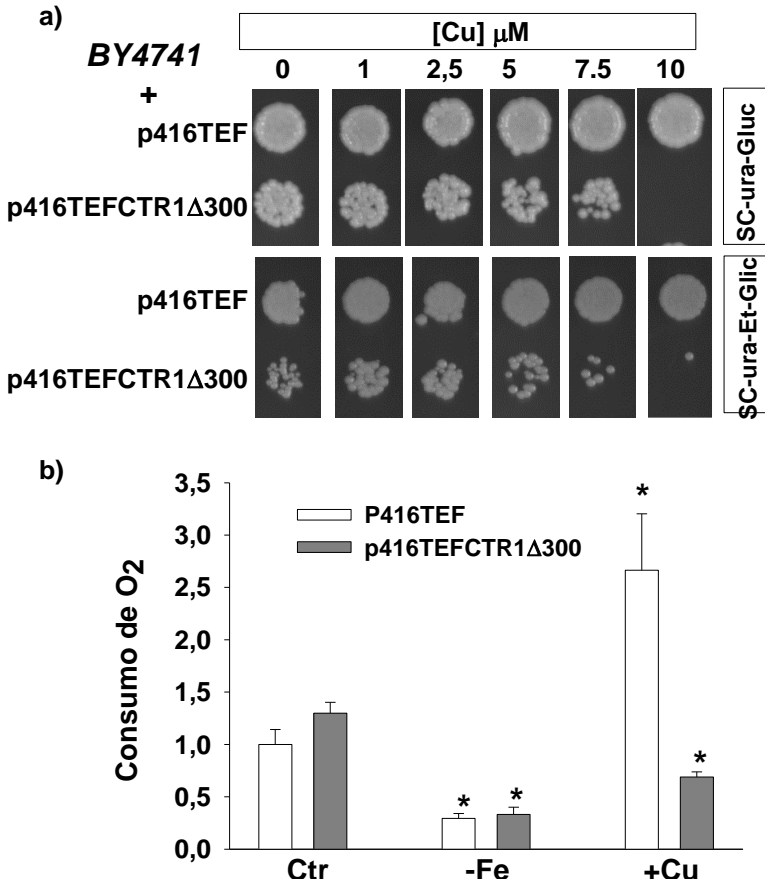


Figura R1.25. Estudio de la respiración en la cepa de *S. cerevisiae* CTR1 Δ 300.

a) Ensayo de gotas en medio SC-ura con glucosa (SC-ura-Gluc) y con SC-ura con etanol y glicerol (SC-ura-Et-Glic) para forzar a la levadura a respirar, con diferente aporte de CuSO_4 , con la levadura transformada con vector vacío (p416TEF) o con el transportador truncado (p416TEF-CTR1 Δ 300). Las placas se incubaron durante 2 días a 30 °C. b) Consumo de O_2 de las levaduras crecidas durante 9 h en medios control (Ctr), medio suplementado con el quelante de Fe, BPS, para obtener medio deficiente en Fe (-Fe) y medio suplementado con CuSO_4 , 250 μ M en la cepa con vector vacío y 5 μ M en la levadura con el transportador truncado. Se recogieron 2 OD de células, se resuspendieron en 1 ml de YPEG para forzar la respiración y se llevó a cabo la medición de consumo de O_2 , mediante un electrodo de O_2 tipo Clark (*Oxyview system*). Las muestras con diferencia significativa frente al WT en la condición de 0 μ M de CuSO_4 , presentan * indica p-valor < 0,05 tras aplicar un test t-Student.

A continuación, se estudió con más detalle el crecimiento de la cepa CTR1Δ300 en medios deficientes en Fe. Para ello, se realizó un experimento en medio SC-ura sólido suplementado con CuSO₄ (2,5 μM) y con el quelante de Fe ferrocina, que quela el Fe del exterior celular al no poder atravesar la membrana. La cepa CTR1Δ300 mejora su crecimiento en placa a partir de 1 μM CuSO₄ cuando aumenta la concentración de quelante en el medio (Figura R1.16). Estos resultados pueden deberse a que la presencia del quelante en el medio mejora las condiciones de crecimiento de la cepa CTR1Δ300 ya que entran menos metales en las células.

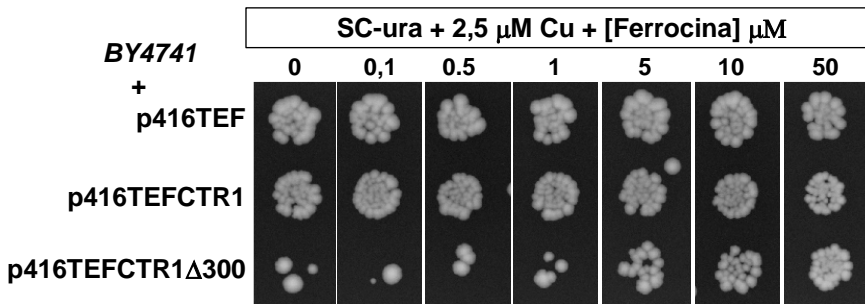


Figura R1.16. Caracterización del transportador CTR1Δ300 en medio sólido con quelante de hierro. Ensayo de gotas de la cepa BY4741 transformada con el vector p416TEF, p416TEF-CTR1 y p416TEF-CTR1Δ300, en medio SC-ura suplementado con 2,5 μM de CuSO₄ y diferente aporte de ferrocina. Las placas se incubaron durante 2 días a 30 °C.

Los resultados obtenidos hasta el momento indicaban que la entrada de Cu sin control en la levadura CTR1Δ300 provoca daños en los centros Fe-S que inhiben el consumo de O₂. Estudios previos evidencian que el colorante azul de bromofenol (azul de metileno) sirve como indicador del estrés oxidativo de un cultivo, ya que se produce la pérdida de coloración azul en aquellas células capaces de reducirlo (Nishida y Silver, 2012). Para determinar si la cepa con el transportador truncado mostraba mayor estrés oxidativo, se realizó un estudio de gotas con este compuesto. Para ello, se obtuvieron cultivos crecidos durante 9 h en medio SC-ura con diferente aporte de CuSO₄. Se igualaron los cultivos a OD₆₀₀ de 0,1 y se realizaron diluciones seriadas. Se utilizaron dos muestras independientes y se

Resultados Capítulo 1

sembraron en placas SC-ura con azul metileno 1 mM y diferente aporte de CuSO_4 . Se mantuvieron 2 días a 30 °C o hasta la aparición de colonias. La cepa con el transportador CTR1 Δ 300 dejó de crecer con 50 μM de CuSO_4 , mientras que el crecimiento del resto de cepas no se vió afectado (Figura R1.17). La cepa con el transportador silvestre (p416TEF-CTR1) mostró coloración azul de las colonias en el medio con 100 μM de CuSO_4 , y la cepa con el vector vacío en 250 μM de CuSO_4 . Sin embargo, en este intervalo de concentraciones de CuSO_4 , en la cepa con el transportador truncado no se apreció la coloración azul indicativa de estrés oxidativo. Por lo tanto, aunque el experimento sirvió para determinar el estrés oxidativo producido por la entrada de Cu en el interior celular, la entrada sin control en la levadura con el transportador truncado, impedía su crecimiento, lo que nos permitió observar si se produce estrés oxidativo, en nuestras condiciones experimentales.

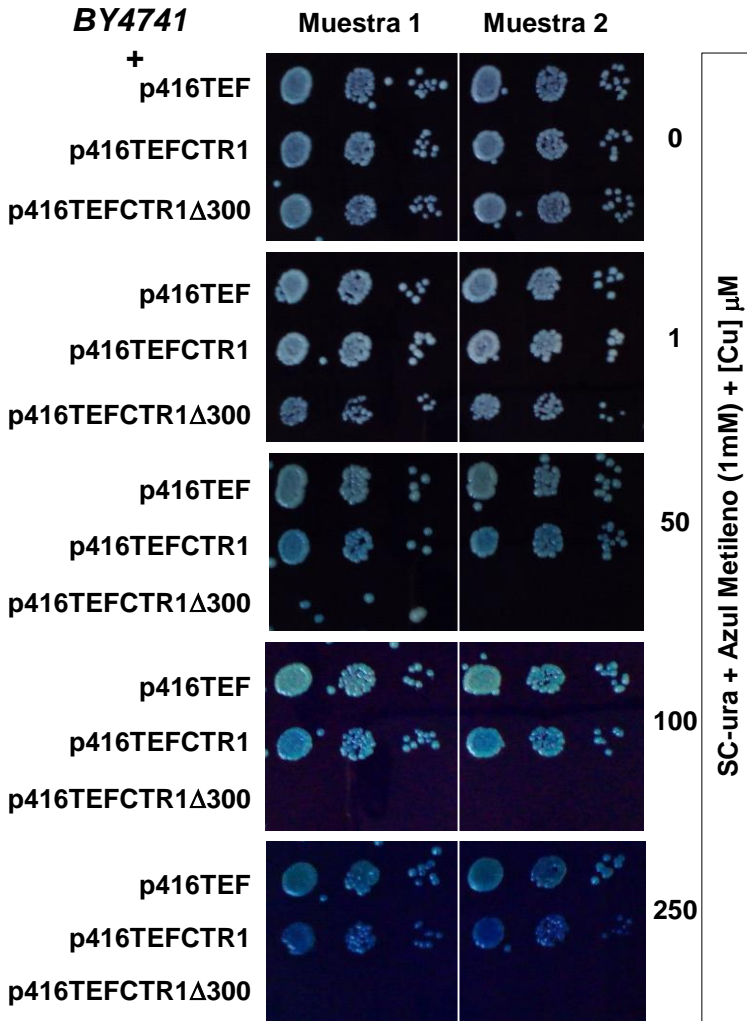


Figura R1.17. Estudio estrés oxidativo en la cepa CTR1Δ300. Ensayo de gotas de *S. cerevisiae* transformadas con vector vacío (p416TEF), con el transportador CTR1 intacto (p416TEF-CTR1) o con el transportador truncado (p416TEF-CTR1Δ300). Se crecieron hasta fase exponencial en medio líquido SC-ura y se sembraron diluciones seriadas de los cultivos en medio sólido SC-ura con el indicador del estado de oxidación azul de metileno (1 mM) y suplementado con diferentes concentraciones de Cu. Se muestran los datos de dos muestras independientes.

Resultados Capítulo 1

De todos los datos obtenidos se concluye que la cepa con el transportador truncado presenta una mayor entrada de Cu. La entrada de este exceso de Cu supone la expresión de los genes de detoxificación, como son las metalotioneínas *CUP1* y *CRS5*, así como de los genes del regulón de Fe *FTR1* y *FET3*. También se observa un mayor contenido de Fe que en la cepa silvestre en aquellas condiciones en las que la viabilidad no está comprometida. No se manifiestan alteraciones en la expresión de otros genes del regulón de respuesta a deficiencia a Fe, pero sí en alguna diana del regulador Cth2. Sin embargo, Cth2 no parece ser el responsable, ya que en su ausencia sigue existiendo la regulación de sus dianas. Estas células presentan alterada la respiración y la expresión de genes con centros Fe-S, como *LEU1* y *BIO2*. La pérdida de viabilidad de las células probablemente no permite observar el daño oxidativo producido por el Cu. Evitar la entrada de Fe podría ser una estrategia para disminuir el daño que produce la entrada de Cu desregulada.

Discusión Capítulo 1

En este primer capítulo se ha analizado cómo afecta la desregulación de la entrada de Cu^+ a las células de la levadura *S. cerevisiae*. El transportador de Cu^+ de alta afinidad Ctr1 de levadura presenta un dominio carboxilo-terminal (CTD) más largo que en otras especies (Puig et al., 2002). Este dominio regula la entrada de Cu^+ a través de Ctr1, ya que en las cepas mutantes que expresan Ctr1 sin el CTD, el canal central no se bloquea y, por tanto, la entrada de Cu^+ aumenta al no poderse inhibir (Wu et al., 2009).

Tras la obtención de una cepa similar a la estudiada Wu et al. (2009), que sólo presenta los primeros 300 aminoácidos (CTR1 Δ 300), hemos corroborado el aumento en los valores de Cu endógeno al desregular su entrada en la cepa CTR1 Δ 300. Así, a 5 μM de CuSO_4 en el medio de crecimiento, los valores de contenido interno del metal en CTR1 Δ 300 son similares a los de la cepa silvestre cultivada en 250 μM de CuSO_4 (Figura R1.5). El aumento en la expresión de genes implicados en la detoxificación de Cu (Labeé et al., 1999), como son las metalotioneínas *CRS5* y *CUP1* (Figura R1.6-a) corrobora la mayor entrada Cu en la cepa CTR1 Δ 300. Probablemente, como consecuencia directa de la mayor entrada de Cu^+ , se produce la disminución de la vida media y un descenso pronunciado de la viabilidad de la cepa CTR1 Δ 300 (Figuras R1.3 y R1.4).

Por otro lado, también se inducen los genes *FET3* y *FTR1* del regulón de Fe , que aumentaron su expresión en condiciones de exceso de Cu (Figura R1.6-b) (Gross et al., 2000). No está claro si dicho aumento va dirigido a minimizar el efecto tóxico del Cu , ya que Fet3 une Cu , lo que disminuiría el *pool* de Cu libre (Gaspar-Cordeiro et al., 2018). Aunque la activación de estos dos representantes del regulón de Fe concuerda con el mayor contenido de Fe observado en la cepa CTR1 Δ 300 (Figura R1.7). Sin embargo, otros genes del regulón de Fe no mostraron inducción a concentraciones de Cu en las que se observa un contenido de Fe incrementado (Figura R1.8), por lo que la mayor concentración de Fe no se debe a la activación generalizada del regulón de Fe .

El regulador post-transcripcional Cth2 es un regulador negativo, implicado en la degradación de genes que codifican proteínas que consumen Fe en condiciones

de deficiencia del mismo en el medio de crecimiento (Puig et al., 2005). Dado que la expresión de *CTH2* aumenta en la cepa truncada CTR1Δ300 (Figura R1.10), se podría especular sobre su función en la expresión de otros genes de la homeostasis del Fe que disminuye en la cepa CTR1Δ300 cuando hay aporte de Cu en el medio, como *LEU1* y *BIO2* (Figuras R1.9 y R1.13), que son dianas de Cth2 (Puig et al., 2005; Puig et al., 2008). Sin embargo, los resultados obtenidos no evidencian que la bajada en la expresión de los genes *LEU1* y *ACO1* sea debida a la regulación de Cth2, ya que no se encontraron diferencias en la expresión de las mismas entre una cepa que expresa el factor Cth2 y la cepa doble mutante *cth1Δcth2Δ*, que carece tanto de Cth2 como de su homólogo Cth1, cuya función es redundante (Figura R1.12) (Puig et al., 2005; Puig et al., 2008).

Estudios previos han demostrado que la entrada excesiva de Cu⁺ causa daños en los centros Fe-S (Foster et al., 2014). Nuestros datos también apuntan a que los centros Fe-S están dañados en la cepa CTR1Δ300. Efectivamente, diferentes fenotipos observados, como la mejora del crecimiento en medio con lisina (Figura R1.14) (Foster et al., 2014), el peor crecimiento de la cepa en medio con etanol-glicerol como fuente de carbono (Figura R1.15), la disminución de la capacidad de respiración, medida como la disminución del consumo de O₂, de la cepa CTR1Δ300 en medios con Cu (Figura R1.15), podrían ser explicados por el daño producido por el Cu⁺ en los centros Fe-S. Sin embargo, la mejora de la respiración de la levadura con el aporte de Cu también podría deberse a que las condiciones basales de crecimiento empleadas en el laboratorio sean ligeramente deficientes en Cu. Estos resultados concuerdan con la hipótesis del escudo respiratorio (*respiratory shield*), según la cual las proteínas mitocondriales de Fe (Fe-S y hemo) son necesarias para mantener el consumo de O₂ elevado en la CTE y que el ambiente de la matriz mitocondrial sea microaerobio para conseguir mantener el *pool* de Fe²⁺. El problema por falta de escudo respiratorio se agrava en condiciones de deficiencia de Fe y alta entrada de Cu⁺. En este sentido, la función de Cth2 podría ayudar a paliar el defecto de proteínas Fe-S y hemo y ayudar a mantener el escudo respiratorio en cepas con elevado metabolismo (López-Torrejón et al., 2016; Wofford et al., 2019).

A pesar de que la respiración es menor y el contenido de Cu es más alto, la incapacidad de la cepa CTR1Δ300 de reducir el azul de bromofenol como indicador de estrés redox de la levadura (Nishida y Silver, 2012) no permite sugerir que presente un mayor estrés oxidativo (Figura R1.17). Curiosamente, la cepa silvestre sí incrementa su estrés oxidativo cuando crece a concentraciones de 250 μM de CuSO₄ en el medio, pese a no mostrar alteraciones en la viabilidad celular (Figura R1.4). Una posible explicación a estos hechos es que en la cepa CTR1Δ300 se produzca directamente la muerte celular, antes de que se incremente el estrés oxidativo.

Por último, debido al interés que tiene la levadura en las industrias del sector agroalimentario, se considera que el mayor contenido de Fe presente en la cepa CTR1Δ300 y la capacidad incrementada de esta cepa para crecer en medios deficientes en Fe son dos características atractivas para posibles aplicaciones biotecnológicas de la cepa CTR1Δ300. Sin embargo, este resultado también podría deberse a que el quelante empleado para forzar las condiciones de deficiencia de Fe, que le de forma inespecífica parte del Cu del medio, lo que le conferiría una mejora de las condiciones de crecimiento a la levadura. Por lo tanto, antes de diseñar futuras estrategias biotecnológicas, se necesitaría un estudio más detallado que permita discernir entre las posibles causas de los fenotipos observados.

Resultados Capítulo 2

2. ESTUDIO DE LOS EFECTOS DE LA SOBREEXPRESIÓN DEL TRANSPORTADOR DE COBRE DE ALTA AFINIDAD COPT1 EN *Arabidopsis thaliana*.

En la levadura *S. cerevisiae*, el factor de regulación post-transcripcional Cth2 es un factor clave en la regulación de la homeostasis del Fe, ya que se une a las secuencias denominadas ARE en el extremo 3' UTR de los mRNAs, y de esta forma regula la estabilidad de los mismos (Puig et al., 2005).

I-CARACTERIZACIÓN DEL FACTOR Cth2 EN ARABIDOPSIS.

En *Arabidopsis thaliana* se han identificado 2 proteínas, At1g68200 (C3H14, AtCth1) y At1g66810 (C3H15, AtCth2) que muestran un 38,1 % y 40,3 % de similitud, respectivamente, frente a la proteína de levadura Cth2 completa, mientras que la zona de los dedos de Zn en tándem tienen una similitud del 56,5 % y 58,1 % respectivamente (Reuscher, 2012).

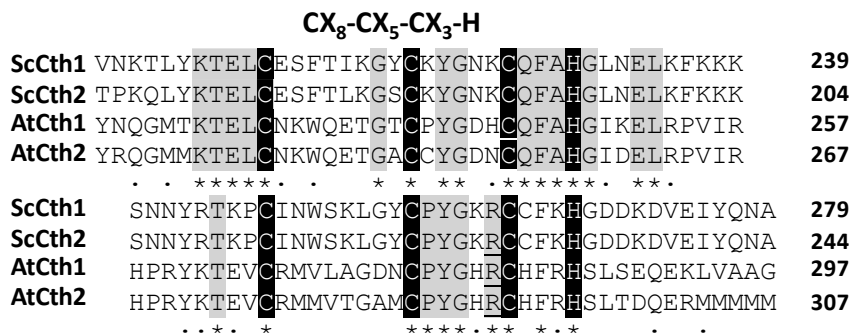


Figura R2.1. Alineamiento de la región de los dedos de zinc de las proteínas tipo Cth de levadura y de *Arabidopsis*. Los números indican la posición del último aminoácido de cada fila. Las C en negrita indican los residuos de cisteína de los dedos de zinc de los dominios CX₈CX₅CX₃H, indicados arriba de la figura.

En estudios previos, se ha relacionado la función de AtCth1 y AtCth2 de *Arabidopsis* con la formación y remodelación de las paredes celulares y su implicación en la esterilidad de las plantas por las dificultades en la formación del grano de polen (Chai et al., 2015). Sin embargo, todavía no se ha estudiado si la función de los Cths tiene alguna relación con la homeostasis metálica en plantas. En nuestro grupo se ha observado que al sobreexpresar el transportador de Cu COPT1 en *Arabidopsis*, la expresión de *AtCTH2* aumentaba cuando la concentración de Cu era elevada (ver Figura R2.6). Este resultado está de acuerdo con el aumento de la expresión de Cth2 observado en levaduras con *CTR1*·300 indicado en el capítulo 1 (Figura R1.10). Este hecho sugiere que los homólogos de Cth2 de *Arabidopsis* también podrían estar implicados en la regulación de genes de la homeostasis de metales en plantas.

2.1 Selección de posibles dianas de la proteína Cth2 relacionados con la homeostasis de metales en base a la presencia de posibles AREs.

Previamente se han sugerido posibles dianas de AtCth1 y AtCth2, basándose en los análisis comparativos en micromatrices obtenidas de plantas con niveles alterados de expresión de AtCth2 (Chai et al., 2015). Sin embargo, no se ha estudiado la presencia de secuencias ARE en el extremo 3'UTR de los genes que pudieran ser dianas de AtCth2 en *Arabidopsis*.

Para analizar la presencia de dichas secuencias, se realizó un estudio *in silico* de los genes de *A. thaliana* que contenían la secuencia ARE consenso UUAUUUAUU, o alguna de las variantes UAUUUAUU o UUAUUUAU que podrían participar en la unión de AtCth2. Se hizo una búsqueda con cada una de las secuencias anteriores en el extremo 3'UTR de la base de datos del TAIR (www.arabidopsis.org), obteniéndose 359, 758 y 849 genes, respectivamente. Con el objetivo de completar el estudio para incluir los genes de *Arabidopsis* en los que no se ha determinado el extremo 3'UTR, se realizó otra búsqueda en +1000 bases, tras el codón de parada

y después del extremo 3'UTR si este está determinado. Por lo tanto, para obtener el número total de genes que contienen alguna de las tres secuencias estudiadas, se juntaron los valores obtenidos para cada una de las secuencias, se combinaron los valores que se encontraban repetidos (para determinar los genes que tuvieran el elemento *cis*, tanto en el extremo 3'UTR como más allá, en las +1000 bases). De esta forma, se obtuvieron 2263 genes que contienen la secuencia UUAUUUAAU, 4510 genes que contienen la secuencia UAUUUUUU y 4713 genes que contienen la secuencia UUAUUUAU. Como cabía esperar al juntar los genes de las 3 secuencias se encontraron genes repetidos, de manera que el cómputo final fueron 6563 genes que contienen alguna de las 3 secuencias analizadas (Tabla R2.1). Una vez obtenida la lista de genes, se realizó un análisis de enriquecimiento de "*Gene Ontology*" (GO) mediante GOrilla (<http://cbl-gorilla.cs.technion.ac.il/>). De dicho análisis, en el apartado de *Procesos Biológicos*, salieron sobrerrepresentados los *Procesos de Óxido-Reducción* (p-value $1,26 \cdot 10^{-4}$) y, en menor medida, los *Procesos de Biosíntesis y Metabolismo de Ácidos Grasos Insaturados* ($8,39 \cdot 10^{-4}$). Sin embargo, en el apartado de *Función Biológica* salieron sobrerrepresentadas la *Actividad Desaturasa* (p-value $8,39 \cdot 10^{-4}$) y, con mayor robustez, la *Función de Unión de Metales* (p-value $1,06 \cdot 10^{-4}$) y, concretamente, dentro de éste, la *Unión a Grupos Hierro-Azufre (Fe-S)* (p-value $1,06 \cdot 10^{-4}$) (Figura R2.1). Dado que el análisis de enriquecimiento nos indicaba que los genes con dichas secuencias están, sobretodo, relacionados con la unión a metales, se buscó el GO de todos los genes obtenidos y se filtraron aquellos que contenían las palabras "*Cobre*" o "*Hierro*".

Tabla R2.1. Número de secuencias ARE en los genes de *Arabidopsis*. Secuencias ARE de genes encontradas en el TAIR, en dos bases de datos diferentes: en el extremo 3'UTR y en +1000 pb, más allá del extremo 3'UTR, si éste está determinado, o después del codón de parada, si el extremo 3'UTR no está determinado.

Secuencia ARE	Elementos en 3'UTR	Elementos en + 1000 pb
<i>UUUUUUUU</i>	359	2263
<i>UAUUUUUU</i>	758	4510
<i>UUAUUUUU</i>	849	4713

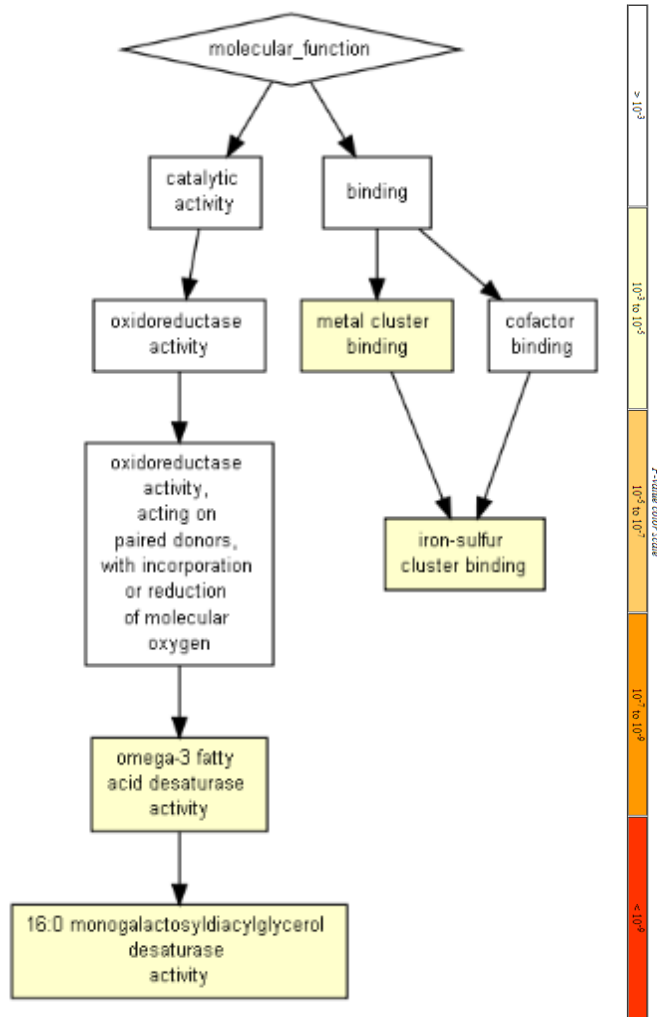


Figura R2.2. **Funciones Moleculares** enriquecidas en los genes con secuencias ARE en *Arabidopsis thaliana*. Resultado de la búsqueda de "Gene Ontology" en la categoría de *Función Molecular* obtenidas en la página web GOrilla (<http://cbl-gorilla.cs.technion.ac.il/>)

Resultados Capítulo 2

Se encontraron 90 genes relacionados con la homeostasis del Fe que contenían secuencias ARE (Tabla R2.2). Entre ellos se encuentran varios genes que codifican citocromos P450, varias inositol oxigenasas (MIOX) y transportadores como VTL2 o YSL1. De todos ellos, 20 genes codifican proteínas que contienen centros Fe-S, entre ellas 6 glutarredoxinas, 4 caspasas ubicadas en membrana plasmática, varias proteínas localizadas en el cloroplasto (*HCAR*, *SUFE2*, *ABC18*, *DME*, At1g60990, *PSAB*), en la mitocondria (*CNX2*, *BIO2*, *UCR1-1*, *EMB1467*) y en el citosol (*GRXS13*, AT4G32990). Además, entre las posibles dianas de Cth2 se encuentra la Ferritina 3 (*FER3*), implicada en el almacenaje de Fe en condiciones de exceso del metal (Briat et al., 2010) (Tabla R2.2).

Tabla R2.2. Genes de *Arabidopsis thaliana* que codifican proteínas relacionadas con el Fe con secuencias ARE. Los números en cursiva indican la posición del ARE UUAUUUAAU; los números sin cursiva indican la posición en cualquiera de las otras dos secuencias (UAUUUAAU o UUAUUUAAU).

ID Gen	Nombre Gen	Descripción Gen	Posición ARE
<i>Homeostasis</i>			
AT1G58340	<i>DTX48</i>	Protein detoxification 48	149
AT1G76800	<i>VTL2</i>	Vacuolar iron transporter homolog 2	177
AT3G43630	---	Vacuolar iron transporter homolog 3	606
AT3G08040	<i>DTX43</i>	Protein detoxification 43	9
AT3G56090	<i>FER3</i>	Ferritin-3, chloroplastic	177
AT4G24120	<i>YSL1</i>	Metal-nicotianamine transporter YSL1	857
AT5G03570	<i>IREG2</i>	Iron regulated 2	397
<i>Regulación</i>			
AT3G56980	<i>bHLH39</i>	Basic helix-loop-helix 39	173
AT5G04560	<i>DME</i>	Transcriptional activator DEMETER	162
<i>Proteínas Fe</i>			
AT1G03020	<i>GRXS1</i>	Monothiol glutaredoxin-S1 (Fe-S)	262
AT1G03700	<i>CASPL1C2</i>	CASP-like protein 1C2 (Fe-S)	982
AT1G03850	<i>GRXS13</i>	Monothiol glutaredoxin-S13 (Fe-S)	31

AT1G04620	<i>HCAR</i>	7-hydroxymethyl chlorophyll a reductase, chloroplastic (Fe-S)	778
AT1G17200	<i>CASPL2A1</i>	CASP-like protein (Fe-S)	896
AT1G60990	---	Iron-sulfur cluster assembly factor homolog COG0354 (Fe-S)	85
AT1G67810	<i>SUFE2</i>	SufE-like protein 2, chloroplastic (Fe-S)	771
AT2G31955	<i>CNX2</i>	Molybdenum cofactor biosynthesis enzyme CNX2, mitochondrial (Fe-S)	235
AT2G39518	<i>CASPL4D2</i>	CASP-like protein 4D2 (Fe-S)	830_838
AT2G43360	<i>BIO2</i>	Biotin synthase, mitochondrial (Fe-S)	488_699
AT3G14380	<i>CASPL2A2</i>	CASP-like protein 2A2 (Fe-S)	2_330
AT3G15660	<i>GRXS15</i>	Monothiol glutaredoxin-S15 (Fe-S)	181
AT3G62930	<i>GRXS6</i>	Monothiol glutaredoxin-S6 (Fe-S)	208
AT4G04770	<i>ABC18</i>	UPF0051 protein ABC18, chloroplastic (Fe-S)	623
AT4G04950	<i>GRXS17</i>	Monothiol glutaredoxin-S17 (Fe-S)	186
AT4G15690	<i>GRXS5</i>	Monothiol glutaredoxin-S5 (Fe-S)	163
AT4G32990	---	Probable cytosolic iron-sulfur protein assembly protein CIAO1 homolog (Fe-S)	445_455
AT5G13430	<i>UCR1-1</i>	Cytochrome b-c1 complex subunit Rieske-1, mitochondrial (Fe-S)	685
AT5G18600	<i>GRXS2</i>	Monothiol glutaredoxin-S2 (Fe-S)	211
AT5G37510	<i>EMB1467</i>	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 1, mitochondrial (Fe-S)	861
ATCG00340	<i>PSAB</i>	Photosystem I P700 chlorophyll a apoprotein A2 (Fe-S)	68_1
AT1G13710	<i>CYP78A5</i>	Cytochrome P450 78A5	114
AT1G16400	<i>CYP79F2</i>	Hexahomomethionine N-hydroxylase	166
AT1G28430	<i>CYP705A24</i>	Cytochrome P450, family 705, subfamily A, polypeptide 24	158
AT1G31800	<i>CYP97A3</i>	Protein lutein deficient 5, chloroplastic	109
AT1G63710	<i>CYP86A7</i>	Cytochrome P450 86A7	409_795
AT1G65340	<i>CYP96A3</i>	Cytochrome P450, family 96, subfamily A, polypeptide 3	385
AT1G66540	---	Cytochrome P450 superfamily protein	367
AT1G74110	<i>CYP78A10</i>	Cytochrome P450 family protein	251

Resultados Capítulo 2

AT1G74540	<i>CYP98A8</i>	Cytochrome P450 98A8	74
AT1G78490	<i>CYP708A3</i>	Cytochrome P450, family 708, subfamily A, polypeptide 3	341_373_702_914
AT2G02580	<i>CYP71B9</i>	Cytochrome P450 71B9	39_217
AT2G12190	---	Cytochrome P450 superfamily protein	724
AT2G14100	<i>CYP705A13</i>	Cytochrome P450, family 705, subfamily A, polypeptide 13	421
AT2G25160	<i>CYP82F1</i>	Cytochrome P450, family 82, subfamily F, polypeptide 1	516
AT2G27000	<i>CYP705A8</i>	Cytochrome P450, family 705, subfamily A, polypeptide 8	457
AT2G27690	<i>CYP94C1</i>	Cytochrome P450 94C1	572
AT2G28860	<i>CYP710A4</i>	Cytochrome P450 710A4	225_691
AT2G34490	<i>CYP710A2</i>	Cytochrome P450 710A2	448
AT2G45560	<i>CYP76C1</i>	Cytochrome P450 76C1	11
AT2G45970	<i>CYP86A8</i>	Cytochrome P450 86A8	185
AT3G20080	<i>CYP705A15</i>	Cytochrome P450, family 705, subfamily A, polypeptide 15	717
AT3G26170	<i>CYP71B19</i>	Putative cytochrome P450	589
AT3G26180	<i>CYP71B20</i>	Cytochrome P450 71B20	169_910
AT3G26190	<i>CYP71B21</i>	Cytochrome P450 71B21	25
AT3G26270	<i>CYP71B25</i>	Cytochrome P450 71B25	303
AT3G26300	<i>CYP71B34</i>	Cytochrome P450 71B34	543_546
AT3G26320	<i>CYP71B36</i>	Cytochrome P450 71B36	938
AT3G26330	<i>CYP71B37</i>	Cytochrome P450 71B37	427
AT3G30180	<i>CYP85A2</i>	Cytochrome P450 85A2	456_518
AT3G48270	<i>CYP71A26</i>	Cytochrome P450 71A26	572
AT3G48520	<i>CYP94B3</i>	Cytochrome P450 94B3	20_722
AT3G53280	<i>CYP71B5</i>	Cytochrome P450 71B5	558
AT3G61040	<i>CYP76C7</i>	Cytochrome P450 monooxygenase-like protein	50
AT4G12310	<i>CYP706A5</i>	Cytochrome P450, family 706, subfamily A, polypeptide 5	313_512
AT4G13310	<i>CYP71A20</i>	Cytochrome P450 71A20	23
AT4G15330	<i>CYP705A1</i>	Cytochrome P450 705A1	108
AT4G20240	<i>CYP71A27</i>	Cytochrome P450, family 71, subfamily A, polypeptide 27	658_982
AT4G27710	<i>CYP709B3</i>	Cytochrome P450 709B3	822

AT4G31970	<i>CYP82C2</i>	Cytochrome P450 82C2	866
AT4G36220	<i>CYP84A1</i>	Cytochrome P450 84A1	395
AT4G37310	<i>CYP81H1</i>	Cytochrome P450, family 81, subfamily H, polypeptide 1	346
AT4G37400	<i>CYP81F3</i>	Cytochrome P450 81F3	938
AT5G05690	<i>CYP90A1</i>	Cytochrome P450 90A1	23
AT5G25120	<i>CYP71B11</i>	Cytochrome P450 71B11	776
AT5G45340	<i>CYP707A3</i>	Abscisic acid 8'-hydroxylase 3	937
AT5G52320	<i>CYP96A4</i>	Cytochrome P450, family 96, subfamily A, polypeptide 4	291
ATCG00540	<i>PETA</i>	Cytochrome f	167
AT2G16385	<i>CIF1</i>	Protein casparian strip integrity factor 1	53
AT2G19800	<i>MIOX2</i>	Inositol oxygenase 2	657
AT3G18210	---	2-oxoglutarate (2OG) and Fe(II)-dependent oxygenase superfamily protein	322
AT2G27150	<i>AAO3</i>	Abscisic-aldehyde oxidase	607
AT3G23940	<i>DHAD</i>	Dihydroxy-acid dehydratase, chloroplastic	75
AT4G20260	<i>PCAP1</i>	Plasma-membrane associated cation-binding protein 1	194
AT4G26260	<i>MIOX4</i>	Inositol oxygenase 4	219
AT4G36380	<i>ROT3</i>	3-epi-6-deoxocathasterone 23-monooxygenase CYP90C1	807
AT4G37650	<i>SHR</i>	Shoot gravitropism 7	235
AT5G07990	<i>TT7</i>	Flavonoid 3'-monooxygenase	146
AT5G24290	<i>MEB2</i>	Membrane protein of ER body 2	270
AT5G53460	<i>GLT1</i>	Glutamate synthase 1 [NADH], chloroplastic	382
AT5G56640	<i>MIOX5</i>	Inositol oxygenase 5	20

Por otro lado, con respecto a los genes relacionados con el Cu, se obtuvieron 59 posibles dianas con ARE en sus secuencias 3' UTR (Tabla R2.3). Entre ellos se encuentra el gen que codifica la plantacianina (*ARPM*), implicada en el desarrollo de las anteras (Dong et al., 2005), y proteínas implicadas en la homeostasis del Cu, como la chaperona de Cu *COX17-2*, implicada en el transporte del Cu a la citocromo c oxidasa mitocondrial, y la de la superóxido dismutasa *CCS* (Balandin y

Resultados Capítulo 2

Castresana, 2002; Puig et al., 2007). Además, también se encuentran los genes que codifican el transportador de Cu de alta afinidad *COPT6* (García-Molina et al., 2013) y el regulador transcripcional SQUAMOSA-Like Protein 7 (*SPL7*) (Yamasaki et al., 2009) (Tabla R2.2). *SPL7* se une a las secuencias GTAC que regulan la expresión de multitud de genes de la homeostasis del Cu (Nagae et al., 2008; Yamasaki et al., 2009) y, hasta la fecha, se dispone de escasa información de cómo se regula su expresión. La posible regulación de *SPL7* implicaría que este factor, clave para las respuestas a la deficiencia de Cu, estaría sujeto al control de AtCth2, lo que afectaría a la respuesta global a la deficiencia del metal.

Tabla R2.3. Genes de *Arabidopsis thaliana* que codifican proteínas relacionadas con el Cu que poseen secuencias ARE. Los números en cursiva indican la posición del ARE UUAUUUAUU los números sin cursiva indican la posición en cualquiera de las otras dos secuencias.

ID Gen	Nombre Gen	Descripción Gen	Posición ARE
<u>Homeostasis</u>			
AT1G12520	<i>CCS</i>	Copper chaperone for superoxide dismutase, chloroplastic/cytosolic	<i>584</i>
AT1G30510	<i>RFNR2</i>	Ferredoxin--NADP reductase, root isozyme 2, chloroplastic	878
AT1G53030	<i>COX17-2</i>	Cytochrome c oxidase copper chaperone 2	140
AT1G63440	<i>HMA5</i>	Probable copper-transporting ATPase HMA5	540
AT2G26975	<i>COPT6</i>	Copper transporter 6	<i>468</i>
AT2G33210	<i>HSP60-2</i>	Chaperonin CPN60-like 1, mitochondrial	107
AT2G37920	<i>emb1513</i>	Copper ion transmembrane transporter	<i>284</i>
AT4G25100	<i>FSD1</i>	Superoxide dismutase [Fe] 1, chloroplastic	425
<u>Regulación</u>			
AT5G18830	<i>SPL7</i>	Squamosa promoter binding protein-like 7	<i>271</i>
<u>Proteínas Cu</u>			
AT1G08500	<i>ENODL18</i>	Early nodulin-like protein 18	699_792
AT1G10630	<i>ATARFA1F</i>	ADP-ribosylation factor A1F	<i>384</i>
AT1G17800	<i>ENODL22</i>	Early nodulin-like protein 22	990

AT1G20340	<i>DRT112</i>	Plastocyanin major isoform, chloroplastic	198
AT1G21860	<i>SKS7</i>	SKU5 similar 7	942
AT1G49240	<i>ACT8</i>	Actin-8	399
AT1G55560	<i>SKS14</i>	SKU5 similar 14	385
AT1G55570	<i>SKS12</i>	SKU5 similar 12	17
AT1G64640	<i>ENODL8</i>	Early nodulin-like protein 8	<i>19_81</i>
AT1G65930	<i>CICDH</i>	Isocitrate dehydrogenase [NADP]	896_899
AT1G72230	---	Cupredoxin superfamily protein	918
AT1G72330	<i>ALAAT2</i>	Alanine aminotransferase 2	14
AT1G79440	<i>ALDH5F1</i>	Succinate-semialdehyde dehydrogenase, mitochondrial	178
AT1G79530	<i>GAPCP1</i>	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase GAPCP1, chloroplastic	<i>330_466</i>
AT2G01530	<i>MLP329</i>	Uncharacterized protein At2g01530 (Fragment)	<i>834</i>
AT2G02850	<i>ARPN</i>	Plantacyanin, basic blue protein	113_190
AT2G05990	<i>MOD1</i>	Enoyl-[acyl-carrier-protein] reductase [NADH], chloroplastic	490
AT2G23630	<i>SKS16</i>	Putative pectinesterase	905_376
AT2G23990	<i>ENODL11</i>	Early nodulin-like protein 11	<i>233</i>
AT2G30860	<i>GSTF9</i>	Glutathione S-transferase F9	419
AT2G36460	<i>FBA6</i>	Fructose-bisphosphate aldolase 6, cytosolic	208_507
AT3G08580	<i>AAC1</i>	ADP, ATP carrier protein 1, mitochondrial	251
AT3G09220	<i>LAC7</i>	Laccase-7	160
AT3G15020	<i>mMDH2</i>	Malate dehydrogenase 2, mitochondrial	349_377
AT3G17240	<i>LPD2</i>	Dihydrolipoyl dehydrogenase 2, mitochondrial	<i>49</i>
AT3G17820	<i>GLN1-3</i>	Glutamine synthetase	317
AT3G23940	<i>DHAD</i>	Dihydroxy-acid dehydratase, chloroplastic	<i>75</i>
AT3G27200	---	Cupredoxin superfamily protein	<i>174</i>
AT3G43670	<i>F23N14_50</i>	Amine oxidase	135
AT3G54660	<i>EMB2360</i>	Glutathione reductase, chloroplastic	377
AT3G55440	<i>CTIMC</i>	Triosephosphate isomerase, cytosolic	<i>449</i>
AT3G63190	<i>RRF</i>	Ribosome-recycling factor, chloroplastic	<i>945</i>

Resultados Capítulo 2

AT4G12270	---	Copper amine oxidase family protein	500_457
AT4G13850	<i>RBG2</i>	Glycine-rich RNA-binding protein 2, mitochondrial	422
AT4G15940	<i>FAHD1</i>	Probable acylpyruvase FAHD1, mitochondrial	10
AT4G20260	<i>PCAP1</i>	Plasma-membrane associated cation-binding protein 1	194
AT4G22010	<i>SKS4</i>	Pectinesterase-like protein	157
AT4G25240	<i>SKS1</i>	Monocopper oxidase-like protein	60
AT4G30590	<i>ENODL12</i>	Early nodulin-like protein 12	258
AT4G31840	<i>ENODL15</i>	Early nodulin-like protein 15	21
AT4G32490	<i>ENODL4</i>	Early nodulin-like protein 4	693_551
AT4G32610	---	Copper ion binding protein	212
AT4G39740	<i>HCC2</i>	Protein SCO1 homolog 2, mitochondrial	921
AT5G01050	<i>LAC9</i>	Laccase 9	164_773
AT5G07475	---	Cupredoxin superfamily protein	70
AT5G15350	<i>ENODL17</i>	Lamin-like protein	416
AT5G21105	---	Plant L-ascorbate oxidase	224
AT5G24580	<i>HIPP09</i>	Heavy metal-associated isoprenylated plant protein 9	96
AT5G37600	<i>GLN1-1</i>	Glutamine synthetase cytosolic isozyme 1-1	168
AT5G50370	<i>ADK2</i>	Adenylate kinase 3	343

De todos los genes anteriormente citados, hemos seleccionado *ARPN*, que codifica la plantacianina, como el mejor candidato para testar como posible diana de AtCth2, ya que posee dos secuencias ARE completas en su secuencia 3'UTR caracterizada y en posición relativamente cercana entre ellas (113 y 190) (Tabla R2.3). Además, los mutantes deficientes en *AtCTH2* son estériles (Chai et al., 2015), y ARPN se ha implicado previamente en la esterilidad del polen (Dong et al., 2005), lo que sugiere que Cth2 pudiera estar implicado en la regulación de *ARPN*.

2.2 Estudio por triple híbrido de la interacción entre Cth2 y posibles dianas

Dado que la función del regulador ScCth2 en levaduras es unirse a los mRNAs y mediar su degradación en condiciones de deficiencia de hierro (Puig et al., 2005), nos propusimos comprobar si Cth2 de *Arabidopsis* mantenía la capacidad de unirse a los posibles mRNAs dianas. Para ello, se realizó un ensayo de triple híbrido en levadura (apartado 2.9 material y métodos).

En primer lugar, se testó si Cth2 de *Arabidopsis* (AtCth2) se une a la secuencia ARE de genes diana de levadura, como la succinato deshidrogenasa (*ScSDH4*) mediante la técnica del triple híbrido en levadura. Se utilizó la construcción obtenida previamente en el laboratorio del *CTH2* de levadura (*ScCTH2*, Puig et al., 2005) como control positivo de la interacción (Figura R2.3). El medio SC-ura-leu nos informa del correcto funcionamiento de la cotransformación, mientras que el medio SC-ura-leu-his nos informa de la interacción entre la proteína y el mRNA. En estas condiciones, se observó interacción entre ScCth2-*ScSDH4*, así como entre AtCth2-*ScSDH4* (Figura R2.3). La adición del 3-aminotriazol (3-AT) hace que se fueren las condiciones de interacción, ya que es un inhibidor de la proteína His3. Por lo tanto, AtCth2 de *Arabidopsis* tiene la capacidad de unirse a secuencias ARE del extremo 3' UTR.

A continuación, se comprobó si AtCth2 era capaz de unirse a una posible diana de *Arabidopsis*, surgida del anterior estudio *in silico*, *ARPN*. Para ello, se obtuvo la construcción necesaria que contiene el fragmento 3' UTR de *ARPN* en el plásmido pIIIA/MS2.1. Además, se clonó en el plásmido pACT2, la secuencia codificante del gen *CTH2* de *Arabidopsis* (*AtCTH2* silvestre) y de una variante con los dedos de zinc mutados (*AtCTH2C243R*), para utilizarla como control negativo de la interacción. Se realizó la cotransformación de la cepa *L40 coat* con diferentes combinaciones de las proteínas y los fragmentos de RNA (apartado 2.9, material y métodos) y se purificaron varias colonias independientes de cada una de las combinaciones. Se crecieron cada una de ellas durante 5 h a 30 °C con 190 rpm.

Resultados Capítulo 2

Transcurrido dicho tiempo, se igualaron todas a una OD₆₀₀ de 0,1 y se sembraron gotas en diferentes placas (Figura R2.3).

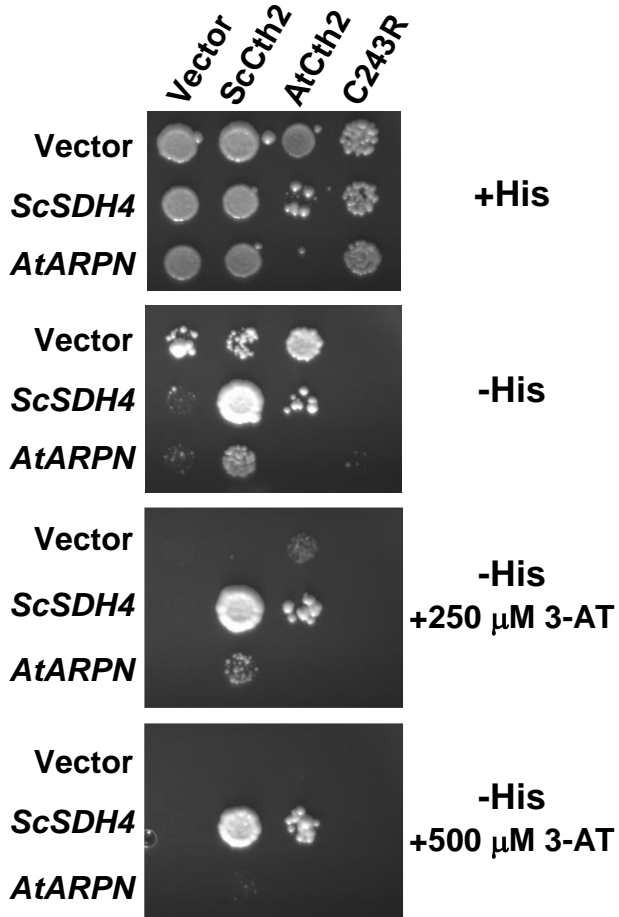


Figura R2.3. Ensayo de interacción proteína-RNA por triple híbrido en levadura. Ensayo de gotas de la cepa L40 coat cotransformada con diferentes combinaciones de proteína Cth2 y RNA (*SDH2* o *ARPN*), en medio SC-ura-leu+his (+His) o SC-ura-leu-his (-His) y con diferente concentración del inhibidor de His3 3-aminotriazol (3-AT). Las placas se incubaron durante 2 días a 30 °C.

La proteína ScCth2 interacciona con el fragmento de *AtARPN*, indicando que los AREs presentes en el extremo 3' UTR son funcionales en levadura. Además, no se observó interacción del AtCth2-C243R con ninguno de los fragmentos de RNA, comprobando así que la mutación de los dedos de zinc elimina la interacción. Sin embargo, dado que el medio SC-ura-leu nos informa del funcionamiento de la cotransformación, el hecho de que las combinaciones con AtCth2 no crecían bien, y especialmente la combinación AtCth2-AtARPN, nos impide extraer conclusiones sobre la posible interacción, por su falta de crecimiento en el resto de medios.

2.3 Caracterización de la expresión génica de los genes *CTH* en plantas de *Arabidopsis*.

Los datos obtenidos anteriormente demuestran que AtCth2 interacciona con secuencias ARE (Figura R2.3). Con el fin de averiguar si el homólogo de Cth2 en plantas tiene algún papel en la homeostasis metálica, se estudió la expresión de este factor en *A. thaliana*.

Para comprobar si la expresión de *AtCTH2* está regulada por Fe, se cultivaron plántulas de *A. thaliana* durante 7 días en placas con medio ½ MS con diferente aporte de Fe, en una escala desde deficiencia hasta exceso del metal. Se extrajo el RNA, se procesó para obtener el cDNA (apartado 2.1 material y métodos) y se realizó una qPCR (apartado 2.3 material y métodos) para comprobar el nivel de expresión de *AtCTH2* en estas condiciones (Figura R2.4-a). Los resultados mostraron que la expresión de *AtCTH2* no se encuentra regulada por la cantidad de Fe presente en el medio de crecimiento en *Arabidopsis*.

El mismo procedimiento se llevó a cabo para estudiar la expresión de *AtCTH2* en diferentes condiciones de suministro conjunto de Cu y de Fe en el medio de crecimiento. En este caso, se utilizaron condiciones de suficiencia (1 µM CuSO₄) y de exceso de CuSO₄ (50 µM CuSO₄) y condiciones de suficiencia de FeSO₄ (50 µM

FeSO₄) o deficiencia, aplicando para ello el quelante de Fe ferrocina (Fz) (0 μM FeSO₄ + 100 μM Fz) (Figura R2.4-b).

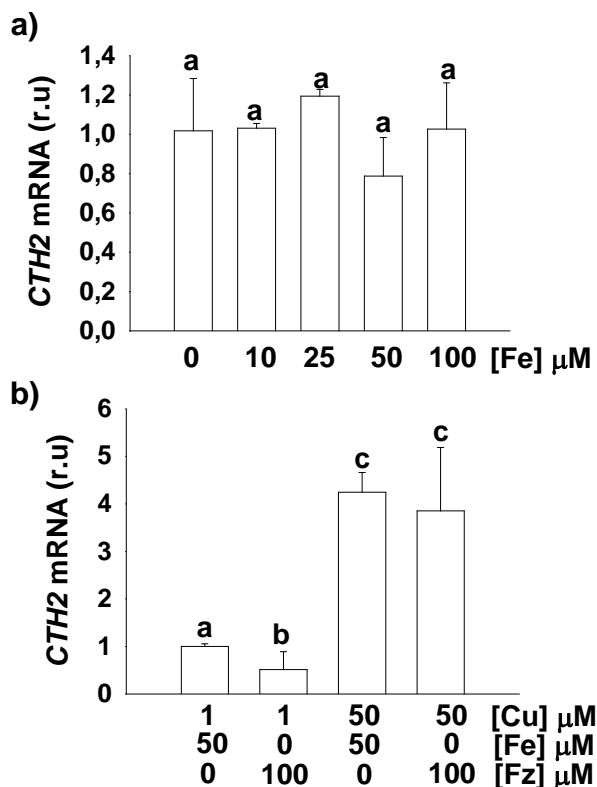


Figura R2.4. Expresión del gen *CTH2* en plantas de *Arabidopsis* en diferentes condiciones de metales. a) Expresión del gen *CTH2* en plantas silvestres de *Arabidopsis* de 7 días cultivadas en una escala de FeSO₄ en el medio de crecimiento. b) Expresión del gen *CTH2* en plantas silvestres de *Arabidopsis* en medios que contenían: suficiencia de Cu y Fe (1 μM CuSO₄ + 50 μM FeSO₄), deficiencia de Fe con el quelante ferrozina (Fz) (1 μM CuSO₄ + 0 μM FeSO₄ + 100 μM Fz), exceso de Cu y suficiencia de Fe (50 μM CuSO₄ + 50 μM FeSO₄) y exceso de Cu y deficiencia de Fe con el quelante (50 μM CuSO₄ + 0 μM FeSO₄ + 100 μM Fz). Los valores representados son la media ± SD de n=3 réplicas. Las muestras con una letra en común no son significativamente diferentes (p-value > 0,05).

Los datos mostraron que la expresión de *AtCTH2* aumenta cuando se añade exceso de Cu, independientemente de la cantidad de Fe presente en el medio (Figure R2.4).

2.4 Estudio fenotípico de plantas con niveles alterados de CTHs.

Con el fin de estudiar más a fondo si *AtCTH1* o *AtCTH2* están implicadas en la homeostasis metálica en plantas, se contactó con el grupo del Doctor Zhou del Instituto Quindao de Bioenergética y Tecnología de Bioprocesos de la Academia China de Ciencias. En dicho grupo se habían obtenido semillas de plantas sobreexpresoras de *AtCTH2* (*CTH2^{OE}*), también del homólogo *AtCTH1* (*CTH1^{OE}*) y un doble mutante de pérdida de función, homocigoto para *cth1* y heterocigoto para *cth2* (*cth1cth2(±)*) (Chai et al., 2015).

Una vez obtenidas suficientes semillas de estas plantas, se realizó una caracterización de las líneas, cultivando las plántulas durante 7 días en diferentes condiciones de contenido de CuSO_4 y de FeSO_4 en el medio de crecimiento. Se utilizaron las condiciones de suficiencia de ambos metales ($1 \mu\text{M CuSO}_4$ y $50 \mu\text{M FeSO}_4$) como control y se analizaron frente una escala de Cu en ligera deficiencia de Fe ($10 \mu\text{M FeSO}_4$), ya que inicialmente se consideró que la deficiencia de Fe podría exacerbar los fenotipos. Para caracterizar los posibles fenotipos, se analizó la longitud de las raíces (Figura R2.5-a). Los resultados mostraron que las plantas que sobreexpresan *AtCTH2* (*CTH2^{OE}*) tienen raíces aproximadamente un 30 % más pequeñas que las silvestres en todas las condiciones de crecimiento. Las raíces de las plantas *CTH1^{OE}* son un 10 % y un 15 % más cortas en las condiciones de suficiencia de ambos metales ($1 \mu\text{M CuSO}_4$ y $50 \mu\text{M FeSO}_4$) y en la deficiencia de Fe ($1 \mu\text{M CuSO}_4$ y $10 \mu\text{M FeSO}_4$) respectivamente, no viéndose afectada la longitud de la raíz cuando hay un exceso de Cu en el medio ($5\text{-}10 \mu\text{M CuSO}_4$ y $10 \mu\text{M FeSO}_4$). Sin embargo, la línea doble mutante *cth1cth2(±)* muestra un acortamiento de la longitud de la raíz (40 %) cuando hay deficiencia de Fe en el medio, ya sea en suficiencia o ligero exceso de Cu ($1\text{-}5 \mu\text{M CuSO}_4$ y $10 \mu\text{M FeSO}_4$), siendo más

exacerbado el acortamiento (60 %) en la condición de exceso de Cu (10 μM CuSO_4 y 10 μM FeSO_4).

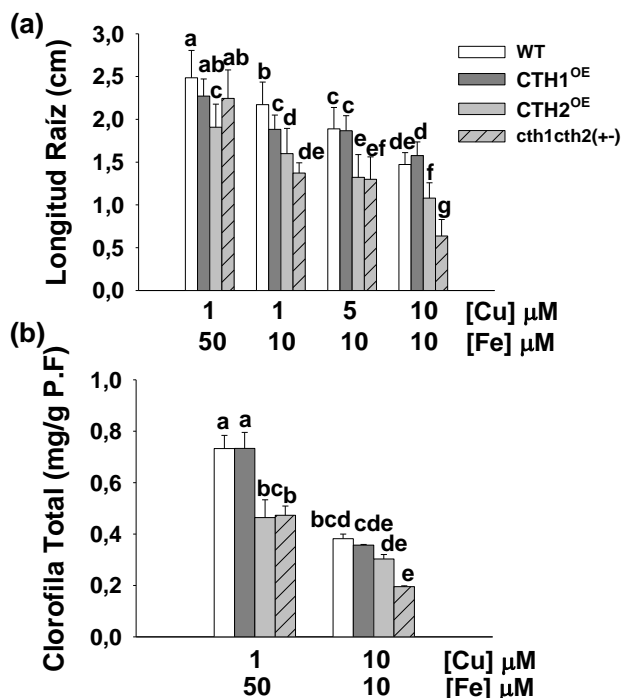


Figura R2.5. Características fisiológicas de las plantas con la expresión de *CTH1* y *CTH2* alteradas. a) Longitud de la raíz de plántulas de *Arabidopsis* silvestres (WT), sobreexpresoras del factor Cth1 (CTH1^{OE}), sobreexpresoras del factor Cth2 (CTH2^{OE}) y mutante de falta de función de Cth1 y heterocigotas para Cth2 (*cth1cth2* \pm). Plántulas de 7 días cultivadas en vertical en placas con diferente aporte de metales: suficiencia de ambos metales (1 μM CuSO_4 + 50 μM FeSO_4), suficiencia de CuSO_4 y ligera deficiencia de FeSO_4 (1 μM CuSO_4 + 10 μM FeSO_4), ligero exceso de CuSO_4 y ligera deficiencia de FeSO_4 (5 μM CuSO_4 + 10 μM FeSO_4) y exceso de CuSO_4 y ligera deficiencia de FeSO_4 (10 μM CuSO_4 + 50 μM FeSO_4). b) Contenido de clorofila total de los mismos genotipos que en a). Plántulas de 7 días cultivadas en suficiencia de CuSO_4 y de FeSO_4 (1 μM CuSO_4 + 50 μM FeSO_4) o exceso de CuSO_4 y ligera deficiencia de FeSO_4 (10 μM CuSO_4 + 10 μM FeSO_4). Los valores representados son la media \pm SD de n=3 réplicas. Las muestras con una letra en común no son significativamente diferentes (p-value > 0.05).

Además, se analizó el contenido en clorofila total en estas plantas en las condiciones de suficiencia de ambos metales (1 μM CuSO_4 y 50 μM FeSO_4) y en exceso de Cu y ligera deficiencia de Fe (10 μM CuSO_4 y 10 μM FeSO_4) (Figura R2.5-b). Los datos mostraron que las líneas CTH2^{OE} y $\text{cth1cth2}(\pm)$ contienen un 37 % y un 36 %, respectivamente, menos de clorofila en la condición control, mientras que en exceso de Cu y deficiencia de Fe (10 μM CuSO_4 y 10 μM FeSO_4) presentan un 21 % menos y un 49 % menos, respectivamente. Por lo tanto, cabe señalar que el exceso de Cu, junto a la deficiencia de Fe, exacerban el defecto observado en las plantas $\text{cth1cth2}(\pm)$.

El estudio *in silico* realizado previamente (apartado 2.1) mostraba la presencia de AREs en varios genes relacionados con la homeostasis del Cu que podrían ser diana de AtCth2. Dado que se disponía de las líneas sobreexpresoras y la doble mutante, se podía testar si alguno de estos genes es diana de Cth. Suponiendo que AtCth2 actuara de modo similar a su homólogo en levadura, la expresión de sus genes diana debería ser menor en las plantas sobreexpresoras de los factores Cth frente a las silvestres, mientras que en las plantas doble mutante de pérdida de función se observaría mayor expresión de las dianas que en las silvestres.

Para comprobar la expresión de las posibles dianas, se obtuvo RNA y cDNA (apartado 2.1 y 2.3 de materiales y métodos) de plantas WT, las dos líneas sobreexpresoras (CTH1^{OE} y CTH2^{OE}) y la doble mutante ($\text{cth1cth2}(\pm)$) de 7 días, cultivadas en el medio con suficiencia de Cu y ligera deficiencia de Fe (10 μM CuSO_4 + 10 μM FeSO_4), ya que fue la única condición donde se observaron diferencias fenotípicas en las 3 líneas mutantes con niveles alterados de *CTHs*, respecto a las plantas silvestres.

Entre las posibles dianas relacionadas con el Cu (Tabla R2), se comprobó la expresión de los genes que codifican la chaperona de Cu de la superóxido dismutasa *CCS*, el transportador de Cu de alta afinidad *COPT6*, la plantacianina *ARPN* y el factor regulador transcripcional de la deficiencia de Cu *SPL7* en dichas plantas (Figura R2.6). Sorprendentemente, los resultados mostraron que la

expresión de los cuatro genes en estas condiciones (1 μM CuSO_4 + 10 μM FeSO_4) es mayor en las plantas sobreexpresoras CTH1^{OE} y CTH2^{OE} . Sin embargo, en la línea doble mutante $\text{cth1cth2}(\pm)$ no se observaron variaciones, posiblemente debido a que las plantas $\text{cth1cth2}(\pm)$ no son homocigotas para cth2 y por tanto, no se anula completamente su función.

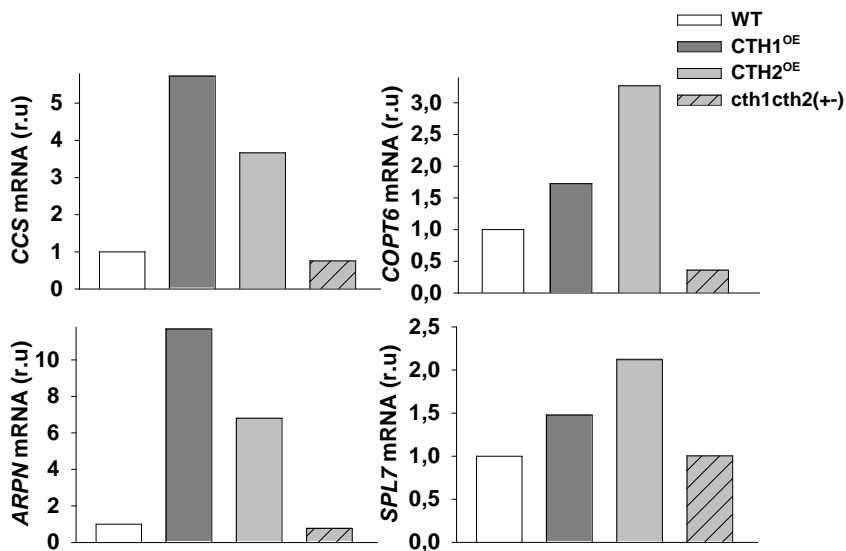


Figura R2.6. Expresión génica de posibles dianas de Cth2 en plantas con genes CTH alterados. Expresión génica de *CCS*, *COPT6*, *ARPN* y *SPL7*, en plántulas de 7 días silvestres (WT), sobreexpresoras del factor CTH1 (CTH1^{OE}), sobreexpresoras del factor CTH2 (CTH2^{OE}) y deficientes homocigotas de *cth1* y heterocigotas de *cth2* ($\text{cth1cth2}(\pm)$). Cultivadas en suficiencia de CuSO_4 y ligera deficiencia de FeSO_4 (1 μM CuSO_4 + 10 μM FeSO_4). Gen de la *UBQ* (ubiquitina) utilizado como control. Los valores representan sólo una réplica de cada condición.

Así pues, los datos obtenidos con los 4 genes analizados indican que podrían tratarse de un efecto indirecto o ser dianas de Cth2, que en este caso funcionaría como activador, en lugar del efecto represor observado en levadura, de la

expresión génica de sus dianas en la condición de ligera deficiencia de Fe ($1 \mu\text{M}$ $\text{CuSO}_4 + 10 \mu\text{M}$ FeSO_4).

Los datos previos mostraron que el factor *AtCTH2* aumentó su expresión en exceso de Cu en el medio de crecimiento, sin importar el aporte de Fe (Figura R.2.4). Por otro lado, los resultados obtenidos en el capítulo 1 en levadura, ponían en evidencia el aumento de la expresión del factor *ScCTH2* en presencia de Cu en el medio, o por la alteración de la entrada de Cu en la cepa mutante *CTR1 Δ 300* (Figura R1.10). Por ello, se planteó la posibilidad de comprobar cómo se expresaba *AtCTH2* en una escala de Cu en plantas sobreexpresoras del transportador de Cu *COPT1* (*C1^{OE}*) que presentan un mayor contenido de Cu endógeno (Andrés-Colás et al., 2010) (Figura R2.7).

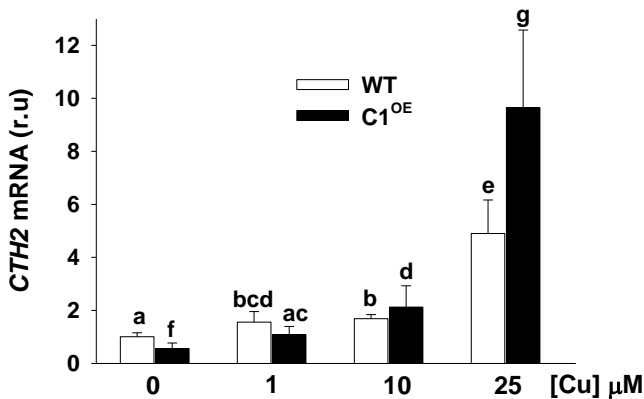


Figura R2.7. Expresión del gen *CTH2* en plantas de *Arabidopsis thaliana* silvestres y sobreexpresoras de *COPT1*. Expresión del gen *CTH2* de *Arabidopsis* en plantas silvestres (WT) y sobreexpresoras del transportador de Cu de alta afinidad *COPT1* (*C1^{OE}*). Plántulas de 7 días cultivadas en una escala de CuSO_4 en el medio de crecimiento. Gen de la *UBQ* (ubiquitina) utilizado como control. Los valores representados son la media \pm SD de $n=3$ réplicas. Las muestras con una letra en común no son significativamente diferentes ($p\text{-value} > 0.05$).

Se cultivaron plantas de *Arabidopsis* silvestres (WT) y sobreexpresoras de *COPT1* (*C1^{OE}*) durante 7 días, se congelaron y se obtuvo el RNA y posteriormente el cDNA de las mismas (apartados 2.1 de material y métodos). Se llevó a cabo una

qPCR para estudiar la expresión de *AtCTH2*. Se observó que la expresión aumenta cuando el contenido de Cu es mayor en el medio de crecimiento, tanto en la planta WT como en la C1^{OE}. La expresión de *AtCTH2* en la planta C1^{OE} es menor en la condición de deficiencia de CuSO₄ (0 μM CuSO₄) respecto al silvestre, sin embargo, cuando hay exceso de CuSO₄ en el medio (10-25 μM CuSO₄) la expresión es mayor respecto al silvestre. Por lo tanto, la expresión de *CTH2* en *Arabidopsis* y *S. cerevisiae* muestra un patrón similar cuando aumenta el Cu en el medio de crecimiento, o cuando se sobreexpresa o desregula el transporte de Cu alta afinidad a través de transportadores de tipo Ctr.

2.5 Comprobación de la expresión de las proteínas con centros Fe-S en plantas de *Arabidopsis*.

Dado que los datos de consumo de O₂ en levadura mostraron que la cepa con el transporte de Cu alterado consumía menos O₂ (Figura R1. 15), se procedió a medir el consumo de O₂ en las raíces de las plantas con niveles alterados de COPT1. Se cultivaron plantas de *Arabidopsis* silvestres y sobreexpresoras de C1^{OE} durante 7 días en deficiencia (0 μM CuSO₄), suficiencia (1 μM CuSO₄) y exceso de CuSO₄ (10 μM CuSO₄) (Figura R2.8). Los resultados mostraron que el consumo de O₂ en la planta silvestre no presenta cambios significativos entre los tres medios, mientras que la planta sobreexpresora presenta menor consumo cuando las condiciones de Cu no son óptimas, tanto en deficiencia como en exceso, con un descenso del 42 % y del 46 %, respectivamente, frente a las plantas silvestres en la misma condición.

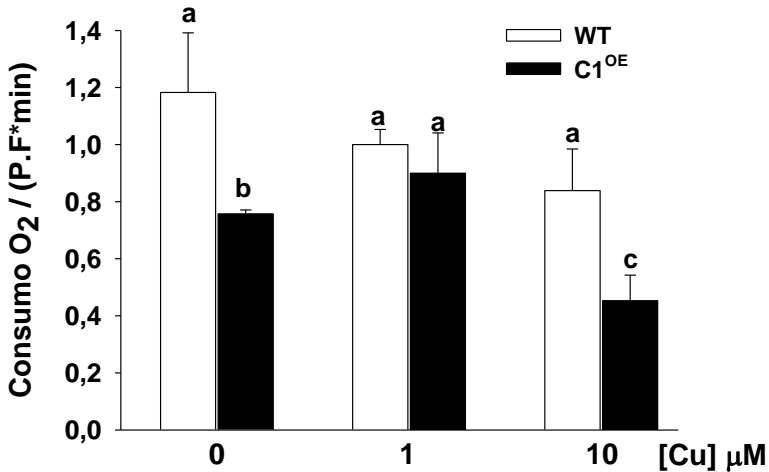


Figura R2.8. Consumo de O_2 en las raíces de plantas de *Arabidopsis*. Plántulas WT y C1^{OE} de 10 días cultivadas en placa con medio $\frac{1}{2}$ MS con diferente aporte de CuSO_4 . Se utilizaron 14-16 raíces, se resuspendieron en 1,5 ml de medio $\frac{1}{2}$ MS líquido sin sacarosa. La medición se realizó en una cámara hermética donde se colocaron las raíces, usando un electrodo tipo Clark (*Oxyview system*). Consumo de O_2 durante un mínimo de 5 min. La tasa de disminución de O_2 , referenciada al P. F de las raíces ($\text{nmol O}_2 / \text{OD}_{600} * \text{P.F}$) se tomó como índice de la capacidad respiratoria. Los valores representados son la media \pm SD de n=3 réplicas. Las muestras con una letra en común no son significativamente diferentes ($p\text{-value} > 0.05$).

Ya que el consumo de O_2 se encuentra alterado en las plantas sobreexpresoras, y que uno de los procesos que regula Cth2 de levadura es la respiración mediante la eliminación de muchos mRNAs que codifican proteínas de la mitocondria y con centros Fe-S (Puig et al., 2008), se comprobó si la expresión de diversos genes que se encuentran localizados en la mitocondria y que codifican proteínas con centros Fe-S.

Tabla R2.4. Genes con centros Fe-S estudiados en el presente trabajo.

Características analizadas para estudiar los genes con centros Fe-S estudiados en este trabajo. El valor de AREs en cursiva indica que contienen la secuencia UUAUUUAAUU. Los valores del chip en negativo indican que están reprimidos en la planta C1^{OE} respecto al silvestre, en la condición de exceso de Cu (Cu) o deficiencia (MS) en el medio de crecimiento, en el estudio realizado previamente en el laboratorio (Perea, 2013). Los valores en cursiva, pese a tener valor significativo no pasaron el estadístico aplicado al realizar el análisis.

Genes centros Fe-S	Código MIPS	Función	AREs	Valor chip C1^{OE}
<i>At-NEET</i>	At5g51720	Metabolismo de Fe	---	-2,3 Cu
<i>SDH2-2</i>	At5g40650	Complejo II cadena respiratoria mitocondrial	---	---
<i>NIR1</i>	At2g15620	Asimilación N ₂	---	<i>-1 Cu</i> <i>-1,8 MS</i>
<i>ISPG</i>	At5g60600	Biosíntesis IPP	---	<i>-1,07 Cu</i>
<i>RAD3 (UVH6)</i>	At1g03190	Transcripción y reparación DNA	---	-1,4 Cu
<i>RAD8-D</i>	At4g20360	Factor elongación de la traducción EF-Tu	<i>98</i>	---
<i>CRK1</i>	At4g23290	Respuesta a patógenos	<i>96</i>	-1,5 Cu

En concreto, se estudió el gen *NEET de mitocondria* (*At-NEET*), implicado, entre otros procesos, en el metabolismo del Fe y la homeostasis de las especies reactivas del oxígeno (Nechushtai et al., 2012); *succinato deshidrogenasa 2-2* (*SDH2-2*), una isoforma del componente Fe-S del complejo II de la cadena respiratoria mitocondrial (Figuroa et al., 2001); y *nitrate reductasa 1* (*NIR1*), implicada en la asimilación de nitrato y en procesos de óxido-reducción (Takahashi et al., 2001). Para analizar su expresión, se obtuvieron plantas de 7 días en medios con diferente aporte de Fe y suficiencia de Cu. Tras obtener el RNA y el cDNA (apartados 2.1 y 2.2 de material y métodos) de las muestras, se analizaron mediante qPCR (Figura R2.9). Tanto *At-NEET* como la *SDH2-2* no presentaron cambios de expresión en función de la cantidad de Fe en el medio, mientras que *NIR1* presentó menor expresión en suficiencia (50 μM FeSO_4) y exceso de Fe (100 μM FeSO_4).

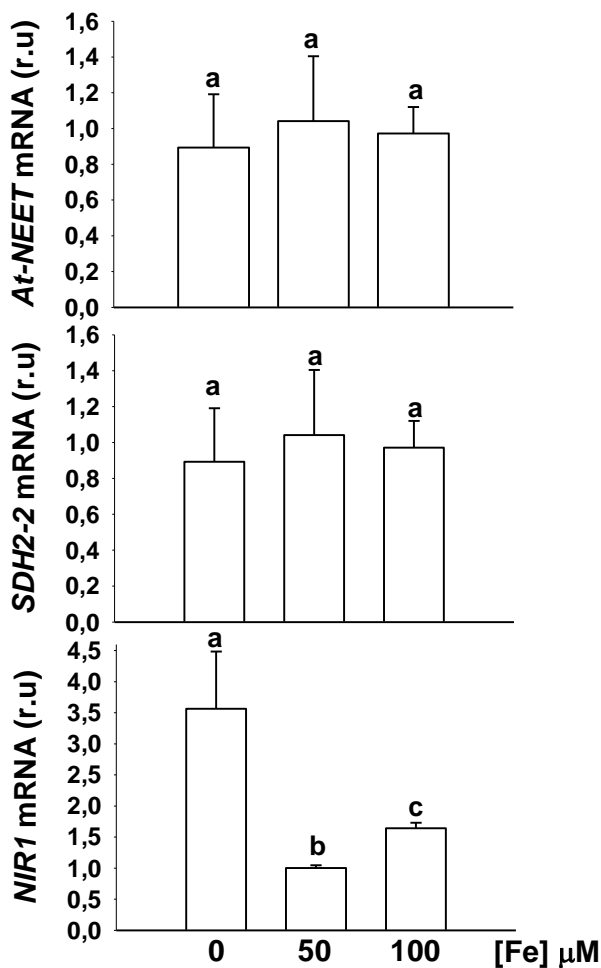


Figura R2.9. Expresión de los genes con centros Fe-S en escala de hierro en plantas WT y C1^{OE}. Expresión de los genes *At-NEET*, *SDH2-2* y *NIR1* de *Arabidopsis* en plantas WT y C1^{OE}. Plántulas de 7 días cultivadas escala de Fe; deficiencia (0 μM FeSO₄), suficiencia (50 μM FeSO₄) y exceso de Cu (100 μM FeSO₄) en el medio de crecimiento. Gen de la *UBQ* (ubiquitina) utilizado como control. Los valores representados son la media ± SD de n=3 réplicas. Las muestras con una letra en común no son significativamente diferentes (p-value > 0,05).

Se analizaron los mismos genes, pero en una escala de Cu, tanto en la planta silvestre como en la sobreexpresora de *COPT1*, utilizando las mismas muestras que en el apartado 2.3 (Figura R2.10). La expresión de los tres genes disminuyó en la

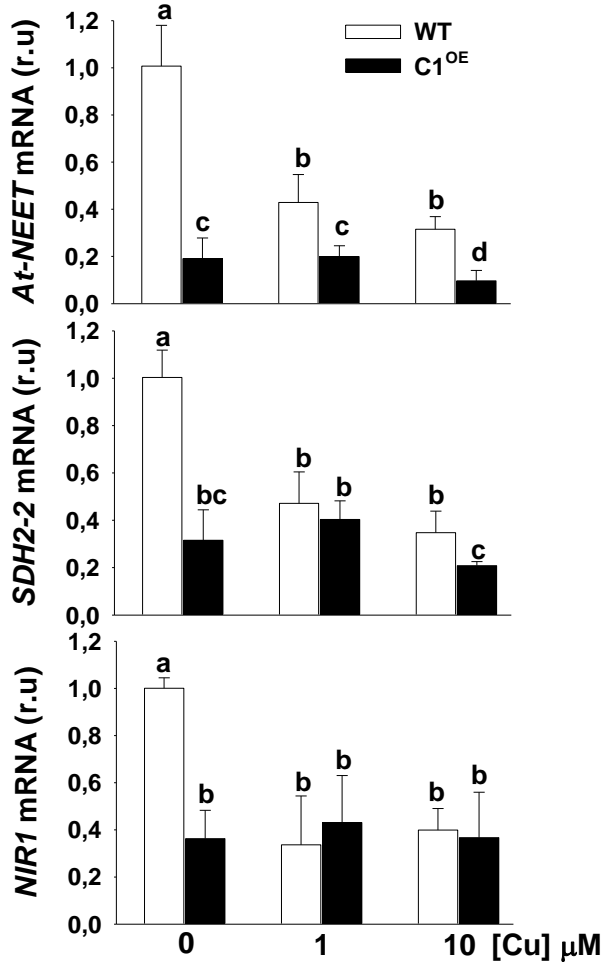


Figura R2.10. Expresión génica en plantas WT y COPT1^{OE} de genes de proteínas con centros Fe-S. Expresión de los genes *At-NEET*, *SDH2-2* y *NIR1* de *Arabidopsis* en plantas WT y C1^{OE}. Plántulas de 7 días cultivadas en una escala de CuSO₄ en el medio de crecimiento. Gen de la *UBQ* (ubiquitina) utilizado como control. Los valores representados son la media ± SD de n=3 réplicas. Las muestras con una letra en común no son significativamente diferentes (p-value > 0,05).

planta WT cuando se añadía Cu al medio de crecimiento lo que podría ser compatible con la regulación mediada por Cth2, ya que se sobreexpresa en estas condiciones. En la planta C1^{OE} la expresión fue mucho menor en la condición de deficiencia (0 μM CuSO₄) en los tres genes, mientras que el gen *At-NEET* mostró menor expresión en las otras dos condiciones y la expresión del gen *SDH2-2* también fue menor en exceso de Cu (10 μM CuSO₄).

Se comprobó también la expresión de otros genes con centros Fe-S (*IPSG* y *RAD3*) en las plantas WT y C1^{OE}, sólo en la condición de deficiencia (0 μM CuSO₄) y exceso de Cu (25 μM CuSO₄) (Figura R2.11).

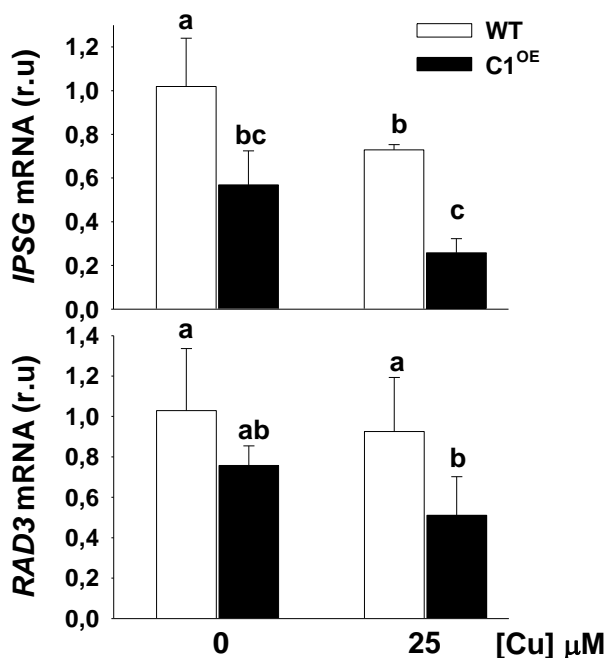


Figura R2.11. Expresión de los genes *IPSG* y *RAD3* en plantas WT y C1^{OE}. Expresión de los genes *IPSG* y *RAD3* de *Arabidopsis* en plantas WT y C1^{OE}. Plántulas de 7 d cultivadas en deficiencia (0 μM CuSO₄) y exceso de Cu (25 μM CuSO₄) en el medio de crecimiento. Gen de la *UBQ* (ubiquitina) utilizado como control. Los valores representados son la media \pm SD de n=3 réplicas. Las muestras con una letra en común no son significativamente diferentes (p-value > 0.05).

El gen de la *IPSG*, enzima de la ruta de síntesis del isopentil difosfato en el cloroplasto, implicada en la biosíntesis de esteroides (Seemann et al., 2005), mostró una menor expresión en las plantas silvestres (WT) en el exceso de Cu (25 μM CuSO_4) y en la planta C1^{OE} en ambas condiciones respecto al WT. El gen de la subunidad helicasa XPD del Factor IIH de transcripción general y reparación de DNA (*RAD3*) (Liu, 2003) sólo mostró una menor expresión en la condición de exceso de Cu (25 μM CuSO_4) en la planta C1^{OE}. Por lo tanto, cabe concluir que la entrada de Cu en las plantas C1^{OE} está disminuyendo la expresión de genes que codifican proteínas con centros Fe-S.

Ya que el patrón de expresión de *CTH2* en las plantas C1^{OE} y de los genes con centros Fe-S estudiados (*At-NEET*, *SDH2-2*, *NIR1*, *IPSG* y *RAD3*) no se corresponde con una función como represor, se planteó la posibilidad de estudiar otros factores TZF que pudieran ser reguladores de la expresión de estos genes. Se realizó un estudio comparativo de los dominios CCH presentes en ScCth2 y de los factores TZF de *Arabidopsis*. Mientras que los TZF del grupo II (AtCTH1 y AtCTH2) conservan las características del TZF de ScCth2, los más parecidos son los del grupo IX, por contener dos dominios CCCH y la separación entre ellos similar, 15-18 aa (CX₈CX₅CX₃H-X₁₅₋₁₈-CX₈CX₅CX₃H) (Wang et al., 2008) (Tabla R2.5).

Tabla R2.5. Genes de *Arabidopsis thaliana* con dos motivos Tandem Zinc Finger. Genes de *Arabidopsis* con dos motivos CCCH con separación similar (CX₈CX₅CX₃H-X₁₅₋₁₈-CX₈CX₅CX₃H) obtenidos de estudio realizado en Wang et al., (2010). Los valores del chip en negativo indican que están reprimidos en la planta C1^{OE} respecto al silvestre, en la condición de exceso de Cu (Cu) o deficiencia (MS) en el medio de crecimiento, en el estudio realizado previamente en el laboratorio (Perea, 2013).

Genes TZF	Nombre Gen	Código MIPS	AREs	Valores chip C1 ^{OE}
AtC3H14 (II)	<i>AtCTH1</i>	At1g66810	---	---
AtC3H15 (II)	<i>AtCTH2</i>	At1g68200	---	1.05 Cu
AtC3H2 (IX)	<i>AtSOM / AtTZF4</i>	At1g03790	---	---
AtC3H20 (IX)	<i>AtOZF / AtTZF2</i>	At2g19810	141 253	---
AtC3H23 (IX)	<i>AtTZF1</i>	At2g25900	982	---
AtC3H29 (IX)	<i>AtSZF2 / AtTZF10</i>	At2g40140	48	---

Resultados Capítulo 2

AtC3H30	(IX)	<i>AtTZF7</i>	At2g41900	103	---
AtC3H47	(IX)	<i>AtSZF1 / AtTZF11</i>	At3g55980	---	---
AtC3H49	(IX)	<i>AtTZF3</i>	At4g29190	---	---
AtC3H54	(IX)	<i>AtPEI1 / AtTZF6</i>	At5g07500	61	---
AtC3H56	(IX)	<i>AtTZF8</i>	At5g12850	59	---
AtC3H61	(IX)	<i>SOME-like/ AtTZF5</i>	At5g44260	---	1.82 MS
AtC3H66	(IX)	<i>AtTZF9</i>	At5g58620	---	---

A partir de dicho análisis, se decidió estudiar la expresión génica del factor *SOME-like*, ya que es el único que presentó un valor significativo de inducción en la planta sobreexpresora C1^{OE}, al igual que *AtCth2*, pero en la condición de deficiencia de Cu (MS) (Tabla R2.5). *SOME-like* es un factor TFZ relacionado con la germinación, y que se induce por ácido abscísico (ABA), mientras que se encuentra reprimido por giberelinas (GA) (Bogamuwa y Jang, 2013). Se comprobó la expresión de *SOME-like* en las mismas muestras que el regulador *Cth2* y se observó que, en este caso, la expresión de *SOME-like* en las plantas silvestres no varió en función de la cantidad de CuSO₄ presente en el medio de crecimiento (Figura R2.12). Sin embargo, la expresión en la planta sobreexpresora C1^{OE}

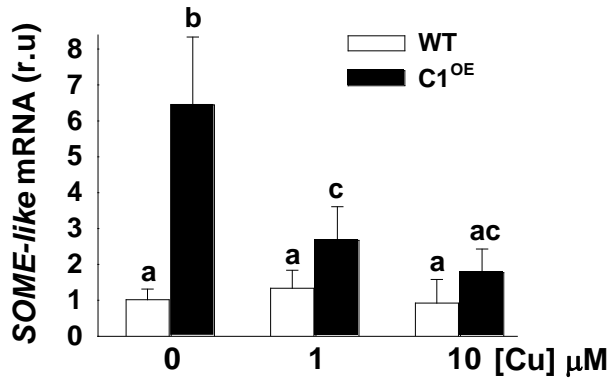


Figura R2.12. Expresión génica del factor TZF SOME-like. Expresión génica del factor *SOME-like* en plántulas de *Arabidopsis* WT y C1^{OE} de 7 días cultivadas en diferentes concentraciones de CuSO₄ en el medio. Gen de la *UBQ* (ubiquitina) utilizado como control. Los valores representados son la media \pm SD de n=3 réplicas. Las muestras con una letra en común no son significativamente diferentes (p-value > 0,05).

aumentó, sobretodo en deficiencia (0 μM CuSO₄) y suficiencia (1 μM CuSO₄), aunque no cambió respecto a la condición de exceso (10 μM CuSO₄). Por lo tanto, el patrón de expresión de SOME-like es compatible con su función como represor, ya que es complementario al mostrado por muchos de los genes de las proteínas con centros Fe-S, sugiriendo la posibilidad de que otros TZFs, como SOME-like, puedan ser reguladores negativos de la expresión de los mismos.

2.6 Relación de Cth2 de *Arabidopsis* con la regulación de los procesos de replicación del DNA y traducción de los mRNAs.

Una de las funciones de la proteína Cth2 es la regulación de la replicación del DNA en condiciones de deficiencia de Fe en levadura (Puig et al., 2005). Un paso clave para llevar a cabo la replicación es la disponibilidad de los dNTPs, cuya síntesis depende en último término de la enzima ribonucleótido reductasa (RNR) (Jordan y Reichard 1998). En células eucariotas, se ha descrito que la subunidad R2 de la RNR necesita Fe en su centro catalítico para llevar a cabo el proceso de

obtención de dNTPs (Perlstein et al., 2005), y además en levadura es una diana de Cth2 (Sanvisens et al., 2011). Se compararon las subunidades de la RNR de *Saccharomyces* con las de *Arabidopsis*, y se pudo comprobar que ninguna de las subunidades de *Arabidopsis* contiene secuencias ARE en su extremo 3' UTR. Por otro lado, el único gen que presenta alterada la expresión en la planta C1^{OE} es el que codifica la subunidad TSO2 de las RNR2 de *Arabidopsis* (Tabla R2.6).

Tabla R2.6. Genes que codifican las diferentes subunidades RNR en *Arabidopsis thaliana*. Genes que codifican para las subunidades RNR de *Arabidopsis* y diferentes características estudiadas. Los valores del chip en positivo indican que están inducidos en la planta C1^{OE} respecto al silvestre, en la condición de exceso de Cu (Cu) o deficiencia (MS) en el medio de crecimiento, en el estudio realizado previamente en el laboratorio (Perea, 2013). La posible condición de ser diana del ScCth2 se refiere a los genes homólogos de levadura, en función de los datos presentes en Puig et al., 2008.

Genes RNR	Código MIPS	AREs	Valores chip C1 ^{OE}	Homologo levadura	Diana ScCth2
<i>RNR1 (R1)</i>	At2g21790	---	---	Rnr1	NO
<i>RNR2A (R2)</i>	At3g23580	---	---	Rnr2	SI
<i>RNR2B (R2)</i>	At5g40942	---	---	Rnr2	SI
<i>TSO2 (R2)</i>	At3g27060	---	1.40 Cu	Rnr2	SI

Por lo tanto, nos planteamos estudiar la expresión de la subunidad R2 de *Arabidopsis* (*TSO2*) en función del contenido de Fe y de Cu presente en el medio de crecimiento. Para ello, se obtuvieron plantas WT de 7 días cultivadas en una escala de Fe, desde deficiencia (0 μM FeSO₄) hasta exceso (100 μM FeSO₄) y se analizó la expresión génica de *TSO2* mediante qPCR (Figura R2.13-a). Los resultados mostraron que en condiciones de deficiencia (0 μM FeSO₄) se expresa más que en suficiencia (50 μM FeSO₄), aunque el exceso (100 μM FeSO₄) no afecta a la expresión en comparación con la condición de suficiencia. Puesto que los datos anteriores mostraron que la expresión del factor Cth2 se encuentra regulada por la presencia de Cu en el medio de crecimiento, se comprobó la expresión de *TSO2* en una escala de CuSO₄ (Figura R2.13-b). En este caso, la expresión de *TSO2* aumenta

tanto en deficiencia (0 μM CuSO_4) como en exceso (10-25 μM CuSO_4) del metal respecto a la condición de suficiencia (1 μM CuSO_4), mostrando el mismo patrón que Cth2. Dado que los datos *in silico* no muestran que *TSO2* tenga posibles secuencias AREs, la expresión podía no estar regulada negativamente como en levadura, pudiendo mostrar patrones de expresión similares, como es el caso. Por tanto, los datos obtenidos mostraron que al contrario que en levadura, en todo caso *TSO2* de *Arabidopsis* tendría a Cth2 como activador de la expresión, aunque se necesitaría demostrar dicha implicación en su regulación.

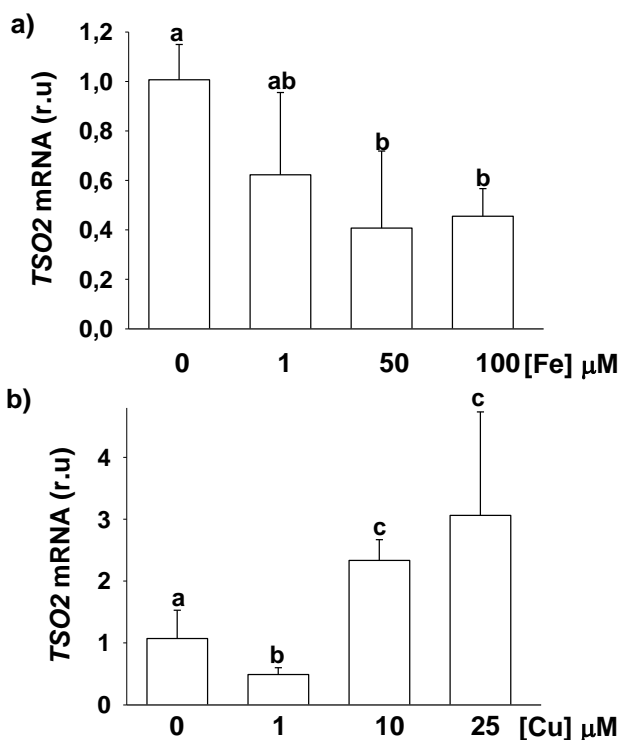


Figura R2.13. Expresión del gen *TSO2* en plantas de *Arabidopsis thaliana* con diferente aporte de metales en el medio de crecimiento. a) Expresión génica de *TSO2* en plantas silvestres de *Arabidopsis* cultivadas durante 7 días en una escala de Fe. b) Expresión génica de *TSO2* en plantas silvestres de *Arabidopsis* cultivadas durante 7 d en una escala de Cu. Gen de la *UBQ* (ubiquitina) utilizado como control. Los valores representados son la media \pm SD de n=3 réplicas. Las muestras con una letra en común no son significativamente diferentes (p-value > 0.05).

Dado que ScCth2 está implicado en el proceso de traducción en levadura, ya que inhibe la traducción de RNA mensajeros que contienen ARE, que codifican proteínas que contienen hierro o participan en vías dependientes del hierro (Ramos-Alonso et al., 2018), se determinó la expresión de otros genes implicados en la traducción que en estudios previos *in silico* se observó que contenían la secuencia UUAUUUAAU en su extremo 3' UTR (Tabla R2.4). Entre dichos genes se

encuentra el factor de elongación de la traducción EF-Tu *RAD8-D* (Liu et al., 2019) (Figura R2.14). La expresión de *RAD8-D*, aumenta con el exceso de Cu en la planta WT, pero disminuye en la planta C1^{OE} en exceso de Cu (25 μ M CuSO₄). Por lo tanto, en la condición de exceso de Cu presenta el patrón contrario a *CTH2*, compatible con ser una diana de Cth2 si actuara como represor. Estudios previos relacionan los factores EF-Tu con determinadas quinasas (Boller y Felix, 2009), ya que los EF-Tu sirven como patrones moleculares asociados a microbios (PAMPs) que son reconocidos por kinasas que llevan a cabo la correspondiente reprogramación para responder a estos patógenos (Ly et al., 2018). Por ello, se analizó la expresión del gen de la proteína quinasa 21 similar a los receptores ricos en cisteína (*CRK21*), presente en la mitocondria y también con una secuencia UUAUUUAAU en el extremo 3'UTR (Tabla R2.4/ Wrzaczek et al., 2010) (Figura R2.14). La expresión de la quinasa *CRK21*, disminuye tanto en la planta WT en condición de exceso de Cu (25 μ M CuSO₄), como en la planta C1^{OE} en ambas

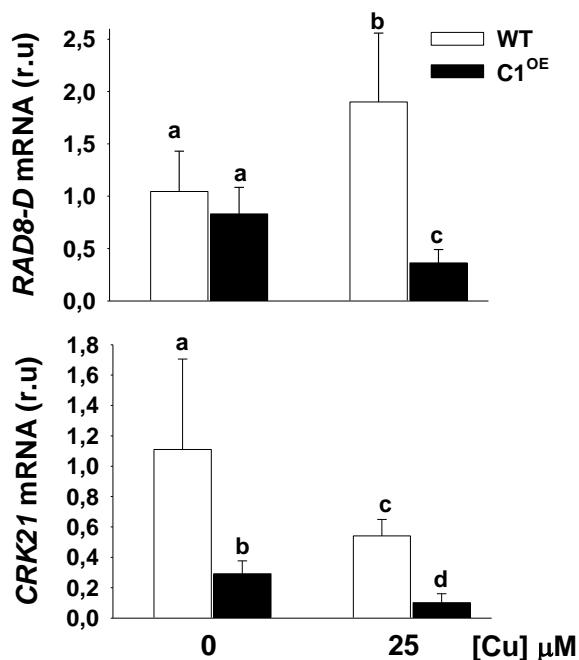


Figura R2.14. Expresión de los genes *CRK21* y *RAD8-D* en plantas WT y C1^{OE}. Expresión de los genes *RAD8-D* y *CRK21* de *Arabidopsis* en plantas WT y C1^{OE}. Plántulas de 7 días cultivadas en deficiencia (0 μM CuSO₄) y exceso de Cu (25 μM CuSO₄) en el medio de crecimiento. Gen de la *UBQ* (ubiquitina) utilizado como control. Los valores representados son la media ± SD de n=3 réplicas. Las muestras con una letra en común no son significativamente diferentes (p-value > 0.05).

Por lo tanto, en la condición de elevado Cu, al igual que *RAD8-D*, presenta patrones de expresión contrarios al que presenta *Cth2*, compatible con ser diana del mismo si actuase como represor, aunque se requerirán estudios posteriores para comprobar si la expresión de *CTH2* está relacionada con la expresión de posibles dianas implicadas en la traducción.

II-ESTUDIO DE LAS PLANTAS SOBREENPRESORAS COPT1^{OE} EN CONDICIONES DE DEFICIENCIA DE HIERRO.

2.7 Estudio fisiológico de plantas silvestres y sobreexpresoras de COPT1 en condiciones de deficiencia de hierro.

Resultados anteriores obtenidos en el laboratorio, donde se comparó la expresión génica en plantas sobreexpresoras de C1^{OE} frente a plantas silvestres, en dos condiciones de crecimiento (MS y 10⁻⁵ M Cu), mostraron que varios genes de la homeostasis del Fe se encontraban diferencialmente expresados (Tabla R2.7).

Tabla R2.7. Tabla de genes relacionados con la homeostasis del hierro que se encuentran alterados en el análisis de expresión génica global de plantas C1^{OE}. Se indican los genes relacionados con la homeostasis del hierro cuya expresión se encuentra significativamente alterada (Valor chip >1 o <-1, inducidos o reprimidos en las plantas WT, respectivamente) en un estudio previo de expresión génica global donde se comparó la expresión en plantas C1^{OE} y plantas silvestres en condiciones de deficiencia de Cu (MS) o exceso del mismo (Cu) (Perea 2013). Los valores en cursiva no pasaron el análisis estadístico aplicado. En negrita se indican los genes que se han analizado en este trabajo.

ID Gen	Nombre Gen	Descripción	Valor Chip	
			MS	Cu
<i>Homeostasis</i>				
AT1G23020	<i>FRO3</i>	Ferric Reduction Oxidase 3	---	1,24
AT4G19690	<i>IRT1</i>	Iron-Regulated Transporter 1	-1,74	-1,77
AT5G01600	<i>FER1</i>	Ferritin 1	---	-2,17
<i>Regulación</i>				
AT1G47395	<i>IMA2</i>	Fe-Uptake-Inducing peptide2	---	3,32
AT1G47400	<i>IMA1</i>	Fe-Uptake-Inducing peptide3	---	2,47
AT1g51070	<i>bHLH115</i>	Basic helix-loop-helix protein 115	---	- <i>1,142</i>
AT1g56430	<i>NAS4</i>	Nicotianamina synthase 4	---	- <i>1,511</i>

Resultados Capítulo 2

AT2G41240	<i>bHLH100</i>	Basic helix-loop-helix protein 100	---	2,91
AT3G18290	<i>BTS</i>	Brutus	---	1,36
AT3G56970	<i>bHLH038</i>	Basic helix-loop-helix protein 38	---	2,45
AT3G56980	<i>bHLH039</i>	Basic helix-loop-helix protein 39	---	2,52
AT5G04150	<i>bHLH101</i>	Basic helix-loop-helix protein 101	---	2,15
<i>Proteínas Fe</i>				
AT2G26400	<i>ARD</i>	Acireductone Dioxygenase	---	1,66
AT2G29090	<i>CYP707A2</i>	Cytochrome P450, family 707, subfamily A, polypeptide 2	1,05	---
AT2G30770	<i>CYP71A13</i>	Cytochrome P450, family 71, subfamily A, polypeptide 13	---	1,79
AT2G42850	<i>CYP718</i>	Cytochrome P450, family 718	1,2	---
AT3G03470	<i>CYP89A9</i>	Cytochrome P450, family 87, subfamily A, polypeptide 9	---	1,08
AT3G25180	<i>CYP82G1</i>	Cytochrome P450, family 82, subfamily G, polypeptide 1	---	2,43
AT3G26200	<i>CYP71B22</i>	Cytochrome P450, family 71, subfamily B, polypeptide 22	2,07	---
AT3G26830	<i>CYP71B15</i>	Cytochrome P450, family 71, subfamily B, polypeptide 15	---	1,29
AT4G31940	<i>CYP82C4</i>	Cytochrome P450, family 82, subfamily C, polypeptide 4	---	-2,58
AT4G37370	<i>CYP81D8</i>	Cytochrome P450, family 81, subfamily D, polypeptide 8	---	2,14
AT4G37410	<i>CYP81F4</i>	Cytochrome P450, family 81, subfamily F, polypeptide 4	---	-2,18
AT5G17170	<i>ENH1</i>	Enhancer of sos3-1	---	-1,49
AT5G51010	---	Rubredoxin-like superfamily protein	---	-1,12
AT1G03190	<i>XPD</i>	Xeroderma Pigmentosum Group D	---	-1,46
AT5G51720	<i>At-NEET</i>	NEET Group protein	---	-2,3

Dado que los datos obtenidos en el apartado anterior también indicaban que en las plantas sobreexpresoras C1^{OE} se encuentran alterada la expresión de genes implicados en la homeostasis del Fe, nos planteamos estudiar estas plantas en

condiciones de deficiencia del metal. Para ello, se cultivaron plántulas de 7 días en medios con suficiencia ($50 \mu\text{M FeSO}_4$) y ligera deficiencia de Fe ($10 \mu\text{M FeSO}_4$) en el medio de cultivo (Figura R2.15). Tras la determinación de la longitud de las raíces de las plántulas WT aumentó en condiciones de ligera deficiencia. Sin embargo, las plántulas C1^{OE} presentaron un acortamiento de la raíz en ambos medios sin que aumentara la longitud en deficiencia del metal (Figura R2.15-b). Así, mientras que en suficiencia el acortamiento en la C1^{OE} fue del 30 %, en $10 \mu\text{M FeSO}_4$ fue del 50 % respecto a la WT. Se obtuvieron medidas del peso fresco de 5 plántulas, no observándose cambios en la condición de suficiencia, mientras que, en ligera deficiencia de Fe, el peso fresco aumentó en la WT y no cambió en la planta C1^{OE} (Figura R2.15-c).

A continuación, se midió el contenido en clorofila total y se comprobó que, mientras las plántulas WT no presentaban cambios significativos, las plantas C1^{OE} presentaban un menor contenido en clorofila en la condición de ligera deficiencia de Fe ($10 \mu\text{M FeSO}_4$), un 43 % menos respecto al WT en la misma condición (Figura R2.15-d).

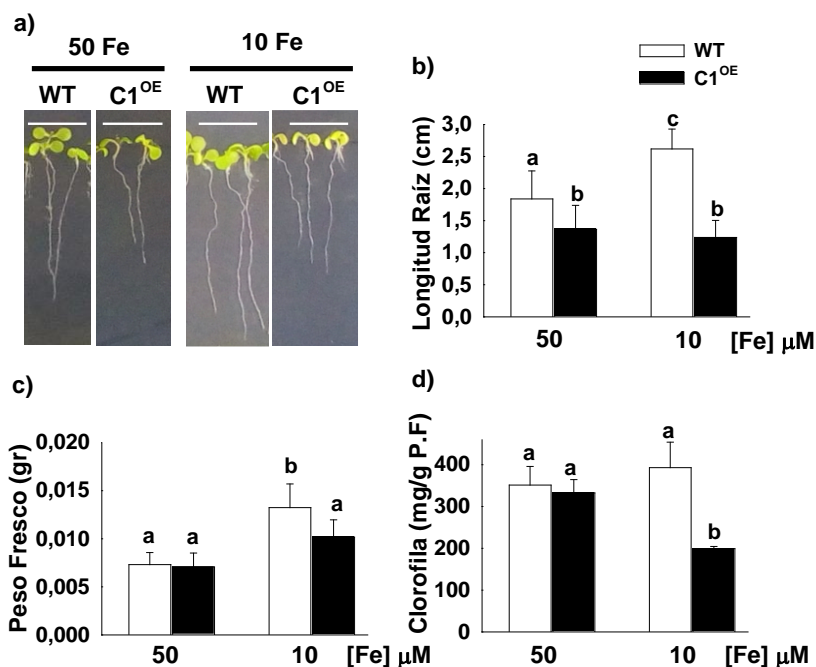


Figura R2.15. Caracterización fisiológica de las plantas C1^{OE} en deficiencia de hierro. a) Fotos representativas de plántulas de 7 días de *Arabidopsis* WT y C1^{OE} en suficiencia (50 μM FeSO₄) y ligera deficiencia de Fe (10 μM FeSO₄). b) Longitud de la raíz de plántulas WT y C1^{OE} en las mismas condiciones de crecimiento que en a). c) Peso fresco de 5 plántulas de WT y C1^{OE} cultivadas en las mismas condiciones que en a). d) Contenido de clorofila total de plántulas WT y C1^{OE} cultivadas en las mismas condiciones que en a). Los valores representados son la media ± SD de n=3 réplicas. Las muestras con una letra en común no son significativamente diferentes (p-value > 0,05).

Previamente habíamos determinado que las plantas C1^{OE} contienen más Cu en el interior celular, tanto en deficiencia de metal en el medio de crecimiento, como en exceso (Andrés et al., 2010). Dados los cambios observados en la homeostasis del Fe, se determinó el contenido de Fe endógeno en las plantas WT y C1^{OE} de 7 días de crecimiento con diferente aporte de CuSO₄ en el medio (Figura R2.16). En

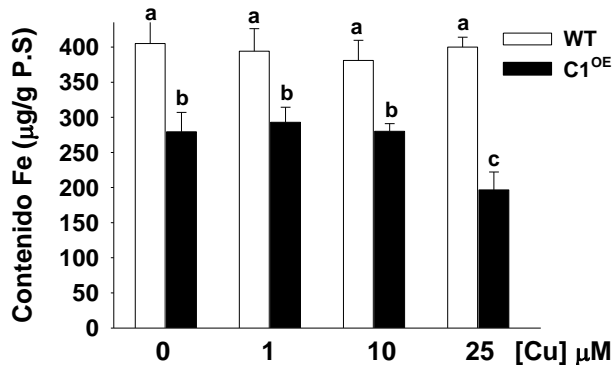


Figura R2.16. Contenido de hierro de las plantas WT y C1^{OE}. Se utilizaron plantas WT y C1^{OE} de 7 días, cultivadas en una escala de CuSO₄ para determinar el contenido de Fe por ICP-MS. Los valores representan la media ± SD de n=3 réplicas. Las muestras con una letra en común no son significativamente diferentes (p-value>0.05).

las plantas WT no se observaron diferencias en el contenido de Fe al aumentar el Cu en el medio. Sin embargo, las plantas C1^{OE} presentaron menor contenido endógeno de Fe en todos los medios analizados con respecto a las silvestres. Además, las plantas C1^{OE} presentaron una menor cantidad de Fe endógeno cuando se cultivan en exceso de Cu (25 μM de CuSO₄) comparado con la condición control de suficiencia de Cu (1 μM de CuSO₄).

2.8 Expresión de genes relacionados con la homeostasis del hierro en plantas de *Arabidopsis*.

Puesto que existe una disminución en el contenido de Fe en las plantas sobreexpresoras C1^{OE}, se estudió la expresión de genes implicados en la

Resultados Capítulo 2

incorporación y almacenamiento del Fe, como los que codifican la reductasa *FRO2*, el transportador *IRT1* y las ferritinas.

En cuanto a la expresión de los genes *FER1* y *FER3*, que codifican las ferritinas 1 y 3, cuya función es la de almacenar el Fe (Reyt et al., 2015), se analizó su expresión, tanto en una escala de Cu como de Fe. *FER1* muestra patrones contrarios en ambas escalas, disminuyendo la expresión en las condiciones de exceso de Cu (10-50 μM CuSO_4) en el medio, mientras que como cabía esperar, la expresión aumenta conforme sube el contenido de Fe (50-100 μM FeSO_4) en el medio de crecimiento (Figura R2.18-a). Sin embargo, la expresión de *FER3* no se encuentra alterada por la cantidad de Fe presente en el medio, y sólo disminuye en la condición de 10 μM CuSO_4 . Nuestros datos muestran sólo la variación en la

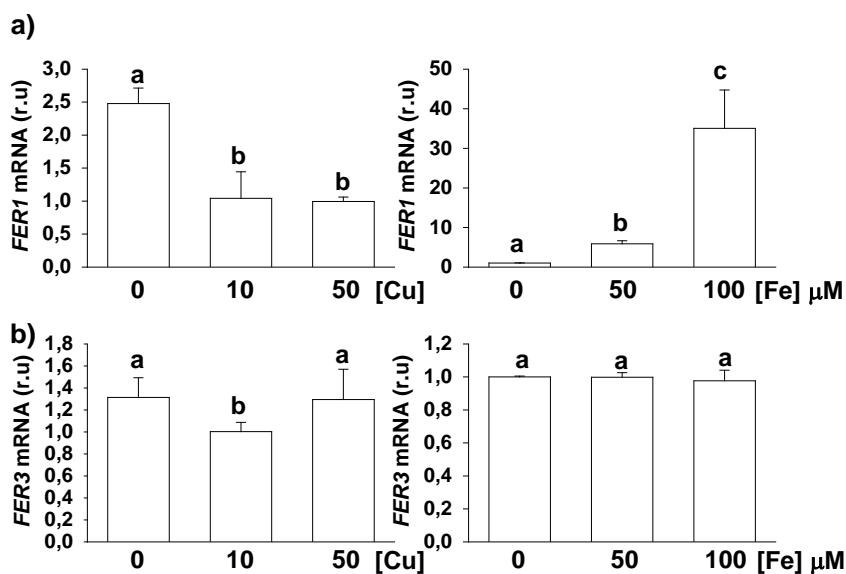


Figura R2.17. Expresión de los genes que codifican ferritinas en plantas WT. a)

Expresión génica de *FER1* en plántulas WT de 7 días cultivadas en una escala de CuSO_4 y de FeSO_4 . b) Expresión génica de *FER3* en plántulas WT de 7 días cultivadas en las mismas condiciones que en a). Gen de la *UBQ* (ubiquitina) utilizado como control. Los valores representados son la media \pm SD de $n=3$ réplicas. Las muestras con una letra en común no son significativamente diferentes ($p\text{-value} > 0,05$).

expresión de *FER1* en función del metal presente en el medio de crecimiento, posiblemente porque, de los 4 genes presentes en *Arabidopsis*, es la ferritina que más se expresa (Petit et al., 2014).

Además, analizamos la expresión de la ferorreductasa 2 (*FRO2*), implicada en la incorporación del Fe del suelo (Robinson *et al.*, 1999). Se comprobó su expresión en una escala de CuSO_4 en el medio de crecimiento, tanto en la planta WT como la sobreexpresora C1^{OE} (Figura R2.18-a). Se observó que, excepto en la condición de suficiencia, en la que no hubo diferencias significativas, tanto en deficiencia de CuSO_4 ($0 \mu\text{M CuSO}_4$) como en exceso de CuSO_4 ($10 \mu\text{M CuSO}_4$), las plantas C1^{OE} presentaron una menor expresión respecto a las WT en la misma condición. En cuanto a la expresión de *FRO2* con diferente aporte de FeSO_4 en el medio de crecimiento, se observó que en las plantas WT se indujo su expresión en deficiencia de Fe, mientras que no aumentó en las plantas C1^{OE} (Figura R2.18-b). Así que comprobamos si se veía afectada la actividad enzimática ferorreductasa en las plantas sobreexpresoras. Para ello, se cultivaron plántulas de 7 días y se procesaron tal y como se especifica en el apartado 3.6 de material y métodos. Se recogieron 5 plántulas y se pesaron. Se sumergieron en solución 1:1 de $300 \mu\text{M BPDS}$ y $100 \mu\text{M Fe(III)-EDTA}$. Se dejaron 1 h en oscuridad a $22 \text{ }^\circ\text{C}$ con 300 rpm y transcurrido dicho tiempo se midió la absorbancia a 535 nm (Grillet et al., 2014b). A pesar de que no se observó un aumento en la actividad reductasa de Fe en las plantas WT en deficiencia de Fe, sí se detectó una reducción significativa de la actividad en deficiencia de Fe ($0 \mu\text{M FeSO}_4$) en las plantas C1^{OE} (Figura R2.18-c), de acuerdo con la inhibición observada de la expresión de *FRO2* (Figura R2.18-b). Por tanto, estos datos sugieren como posible causa del menor contenido de Fe de las plantas C1^{OE} su incapacidad para inducir la expresión de la reductasa, previa al transporte del metal, en respuesta a la deficiencia de Fe.

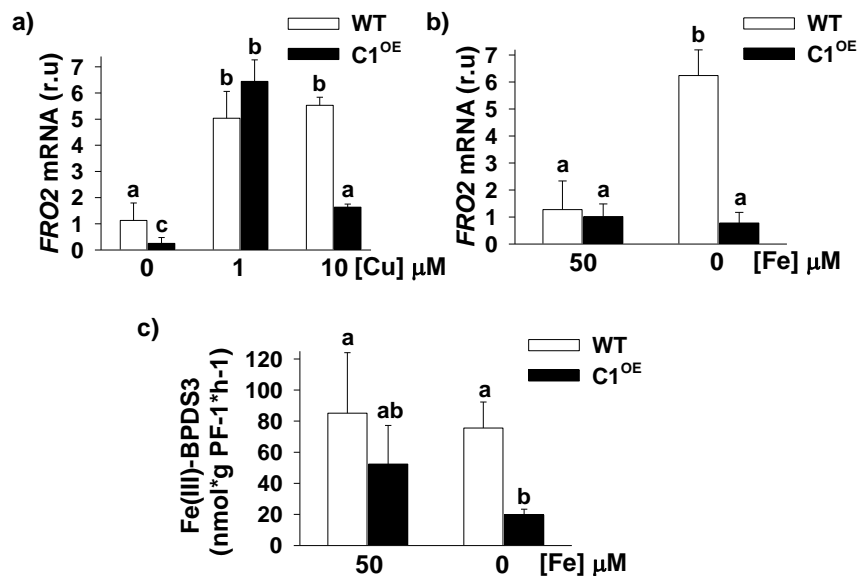


Figura R2.18. Caracterización de la expresión y actividad de la ferredoxina en plantas de *Arabidopsis thaliana*. a) Expresión génica de la reductasa *FRO2* en plantas WT y C1^{OE} de 7 días en una escala de CuSO₄. b) Expresión génica de la reductasa *FRO2* en plantas WT y C1^{OE} de 7 días en dos condiciones, deficiencia de Fe (0 μM FeSO₄) y suficiencia de Fe (50 μM FeSO₄). Gen de la *UBQ* (ubiquitina) utilizado como control. c) Actividad ferredoxina en plántulas WT y C1^{OE} de 7 días cultivadas en suficiencia (50 μM FeSO₄) y deficiencia de Fe (0 μM FeSO₄) medida a A_{535 nm}. Los valores representados son la media \pm SD de n \geq 2 réplicas. Las muestras con una letra en común no son significativamente diferentes (p-value > 0,05).

Se analizó también la expresión del gen que codifica para el transportador de Fe *IRT1*. La expresión de *IRT1* en la escala de Cu en las plantas WT disminuyó en exceso de Cu (10 μM CuSO_4) (Figura R2.19-a). La expresión en la planta C1^{OE} fue menor en deficiencia (0 μM CuSO_4) y suficiencia de Cu (1 μM CuSO_4), respecto al WT, mientras que no hubo diferencias entre las condiciones de crecimiento. En las diferentes condiciones de Fe se observó un aumento en la expresión de *IRT1* en deficiencia de Fe (0 μM FeSO_4) en las plantas silvestres, aunque no llegó a ser significativa frente a la condición de suficiencia, mientras que en las plantas C1^{OE} no se indujo la expresión del transportador en la misma condición (Figura R2.19-b). Comprobamos la cantidad de proteína del transportador Irt1, ya que disminuyó

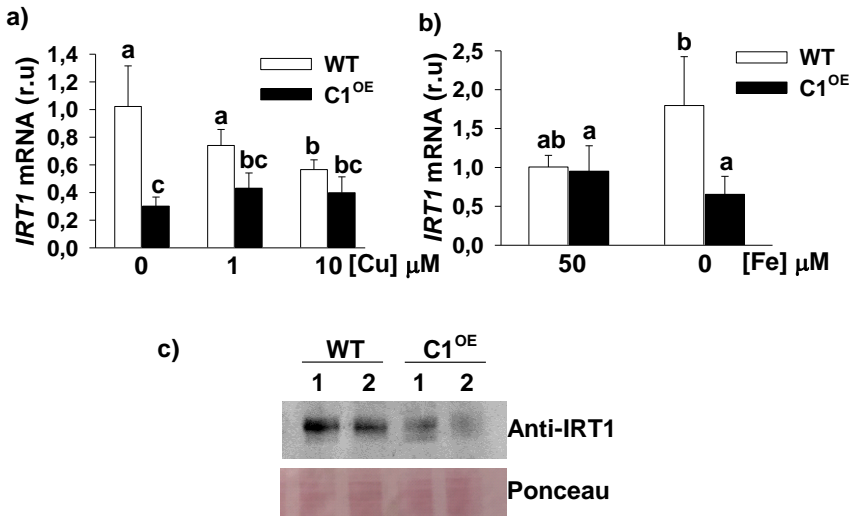


Figura R2.19. Expresión del transportador de hierro *IRT1*. a) Expresión génica del transportador *IRT1* en plantas WT y C1^{OE} de 7 días en una escala de CuSO_4 . b) Expresión génica del transportador *IRT1* en plantas WT y C1^{OE} de 7 días en dos condiciones, deficiencia de Fe (0 μM FeSO_4) y suficiencia de Fe (50 μM FeSO_4). Gen de la *UBQ* (ubiquitina) utilizado como control. Los valores representados son la media \pm SD de $n \geq 2$ réplicas. c) Western-blot para detectar el transportador Irt1 en plántulas WT y C1^{OE} de 7 d cultivadas en deficiencia de Fe (0 μM FeSO_4). La tinción de proteínas con el colorante rojo de *Ponceau* se utilizó como control de carga. Las muestras con una letra en común no son significativamente diferentes ($p\text{-value} > 0,05$).

la expresión del transportador y la cantidad de Fe es menor (Figura R2.19-c). Se observó que ésta es menor en las plantas C1^{OE} cultivadas en deficiencia de Fe.

Estos resultados en conjunto muestran que las plantas sobreexpresoras de *COPT1* tienen un menor contenido endógeno de Fe ya que no se activa la expresión de los genes de respuesta a deficiencia de Fe, como son la reductasa *FRO2* y el transportador *IRT1*. Por lo tanto, la entrada exacerbada de Cu⁺ en estas plantas está alterando la respuesta a la deficiencia de Fe, impidiendo que se expresen los genes implicados en el transporte del metal, lo que finalmente afecta al contenido de Fe endógeno de la planta.

2.9 Caracterización de la ruta de los flavonoides en las plantas de *Arabidopsis* COPT1^{OE} en respuesta a la deficiencia de hierro.

Las plantas con estrategia I de captación de Fe también pueden secretar ciertas sustancias flavonoides que ayudan a acomplejar el Fe para mejorar la adquisición del metal del suelo (Rodríguez-Celma et al., 2013). Dado que las plantas sobreexpresoras C1^{OE} contienen menos Fe y que los datos moleculares no muestran una respuesta génica de las plantas a dicha deficiencia de Fe, se estudió si había diferencias en la secreción de sustancias flavonoides. Dado que los compuestos flavonoides emiten fluorescencia, si se exponen las plantas a luz UV se puede observar el exudado producido por las raíces (Rodríguez-Celma et al., 2013). Para ello, se cultivaron las plantas WT y C1^{OE} 7 días en medio de crecimiento con suficiencia de Fe (50 μM FeSO₄) con un pH 5,7 sobre una membrana de nylon. De este modo, pasados los 7 días, una parte de las placas se traspasaron a nuevas placas con el mismo medio, o a un medio deficiente de Fe (0 μM FeSO₄), al mismo pH (5,7) o con un pH más alcalino (7,2) para exacerbar la dificultad en la adquisición de Fe. Las placas se expusieron a luz UV mediante un transiluminador (*BIORAD*) durante unos segundos y se obtuvieron las imágenes de la fluorescencia observada (Figura R2.20). Las plantas presentaron mayor emisión de fluorescencia

en las condiciones de deficiencia de FeSO_4 ($0 \mu\text{M FeSO}_4$) a ambos pH, siendo en pH alcalino donde se observó más claramente la diferencia entre las plantas WT, que presentan mayor fluorescencia, y las C1^{OE} .

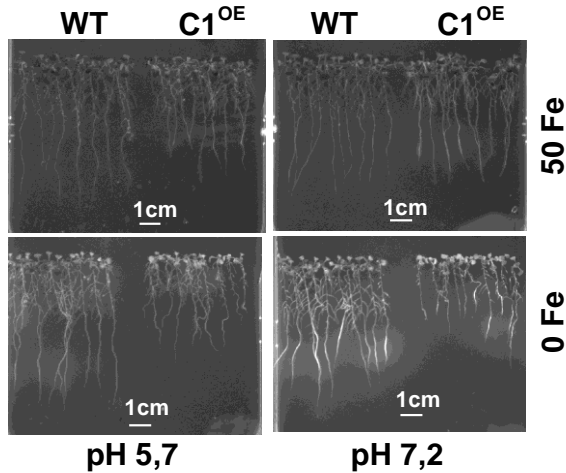


Figura R2.20. Fluorescencia de las raíces de las plantas de *Arabidopsis* en respuesta a la deficiencia de hierro. Imágenes representativas de plantas silvestres (WT) y sobreexpresoras (C1^{OE}) cultivadas durante 7 días en medio con suficiencia de Fe y pH 5,7 y cambiadas durante 3-4 días a medios con suficiencia de Fe ($50 \mu\text{M FeSO}_4$) y pH normal (pH 5,7) o alcalino (pH 7,2), o medio deficiente en Fe ($0 \mu\text{M FeSO}_4$) y pH normal (pH 5,7) o alcalino (pH 7,2). Imágenes capturadas aplicando luz UV a 635 nm durante varios segundos en un transiluminador *BIORAD*.

Se realizaron medidas de la longitud de la raíz a los 10 días de crecimiento a partir de fotografías procesadas con el programa *Image J* (Figura R2.21). Se observó cómo las plantas WT presentaban mayor longitud cuando se cultivaron en medio deficiente en Fe y pH normal ($0 \mu\text{M FeSO}_4$ pH 5,7) (14 % mayor que la condición de suficiencia en el mismo pH), mientras que en el resto de condiciones no se observaron diferencias. En todos los casos, las plantas sobreexpresoras presentaron una menor longitud de la raíz, produciéndose mayor acortamiento en las condiciones de deficiencia de Fe ($0 \mu\text{M FeSO}_4$), tanto a pH 5,7 (42 % menos respecto al WT en la misma condición) como a pH 7,2 (52 % menos respecto al WT en la misma condición).

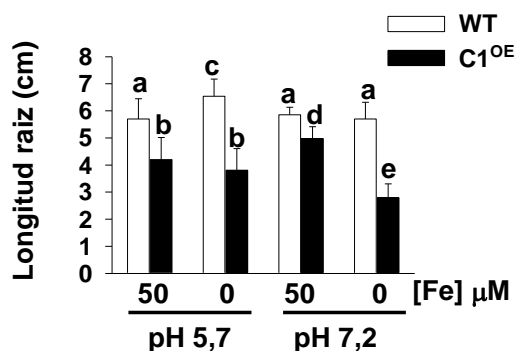


Figura R2.21. Longitud de la raíz de plantas de *Arabidopsis* en medios con diferente aporte de Fe y pH. Longitud de la raíz de plantas silvestres (WT) y sobreexpresoras (C1^{OE}) cultivadas durante 7 días en medio con suficiencia de Fe y pH 5,7 y cambiadas durante 3-4 días a medios con suficiencia de Fe (50 μM FeSO₄) y pH normal (pH 5,7) o alcalino (pH 7,2), o medio deficiente en Fe (0 μM FeSO₄) y pH normal (pH 5,7) o alcalino (pH 7,2). Medidas realizadas a partir de imágenes procesadas con el programa *Image J*. Los valores representados son la media ± SD de n=10 réplicas. Las muestras con una letra en común no son significativamente diferentes (p-value > 0,05).

A continuación, se estudiaron los genes clave en la intersección de la ruta de síntesis de compuestos flavonoides que separan la ruta de las cumarinas y de las ligninas (Figura R2.22). Se obtuvo RNA de plantas silvestres (WT) y sobreexpresoras (C1^{OE}) crecidas durante 7 días en condiciones de suficiencia (50 μM FeSO₄) y deficiencia de Fe (0 μM FeSO₄) (Figura R2.23-b). De la ruta de las ligninas se estudiaron los genes Cinnamyl-Alcohol Deshidrogenasa 8 (*CAD8*) y la Cinnamoyl CoA Reductase 1 (*CCR1*) (EC: 1.1.1.195, EC:1.2.1.44, Kegg Pathway; Babar Ali y McNear, 2014). Los resultados mostraron que las plantas C1^{OE} presentan menor expresión de *CCR1* en la condición de deficiencia de Fe (0 μM FeSO₄). En cuanto a la ruta de las cumarinas, se analizó la expresión del gen de la -glucosidasa 23 (*BGLU23*) y la 2-oxoglutarato (2OG) oxigenasa dependiente de Fe(II) (*F6'H1*) (EC: 3.2.1.21, EC:1.14.11.-, Kegg Pathway; Kai et al., 2008) (Figura R2.22-a). Los datos mostraron un descenso de la expresión en la *BGLU23* en las plantas C1^{OE} en deficiencia de Fe (0 μM FeSO₄) y un aumento de la expresión de

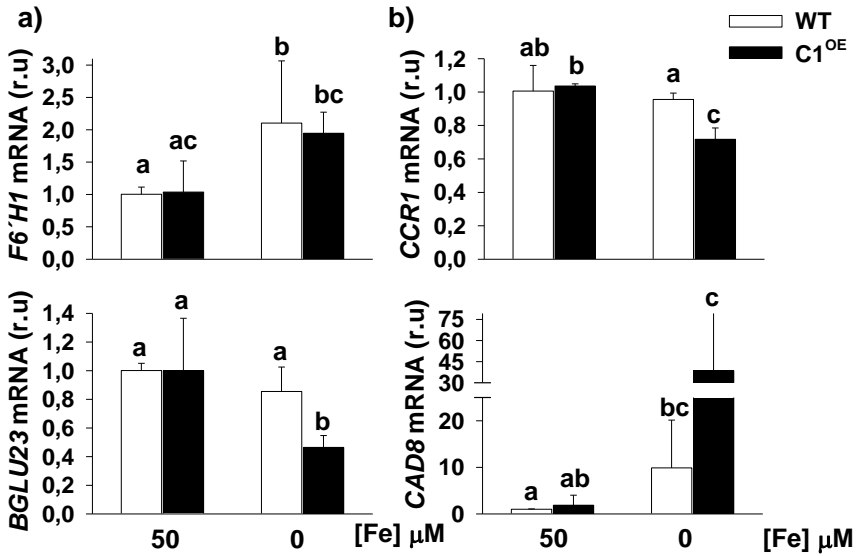


Figura R2.22. Expresión de los genes de la ruta de las cumarinas y las ligninas.

a) Expresión de los genes de la ruta de las cumarinas *F6'H1* y *BGLU23* en plantas silvestres (WT) y sobreexpresoras (C1^{OE}) de 7 días cultivadas en suficiencia (50 μM FeSO₄) y deficiencia de Fe (0 μM FeSO₄). b) Expresión de los genes de la ruta de las ligninas *CCR1* y *CAD8* en plantas silvestres (WT) y sobreexpresoras (C1^{OE}) de 7 días cultivadas en suficiencia (50 μM FeSO₄) y deficiencia de Fe (0 μM FeSO₄). Gen de la *UBQ* (ubiquitina) utilizado como control. Los valores representados son la media ± SD de n=2 réplicas. Las muestras con una letra en común no son significativamente diferentes (p-value > 0,05).

la *F6'H1* en la misma condición (0 μM FeSO₄), tanto en las plantas WT como en las C1^{OE}.

Por lo tanto, los datos moleculares obtenidos de la expresión de genes de la ruta de biosíntesis de cumarinas no se corresponden con la diferencia en la fluorescencia observada en las imágenes de luz UV entre las plantas WT y C1^{OE} en deficiencia de Fe. Sin embargo, no se puede descartar que la diferencia de fluorescencia observada se produzca como consecuencia de cambios en la expresión de otros genes de la ruta no analizados. En todo caso, la incorporación de Fe a través de compuestos fenólicos también está inhibida en las plantas C1^{OE}.

2.10 Estudio de factores reguladores de la deficiencia de hierro.

Con el objetivo de estudiar los posibles factores reguladores implicados en las alteraciones observadas en las plantas C1^{OE}, se estudió la expresión de diferentes reguladores de la homeostasis del Fe, previamente descritos.

Dado que estudios anteriores relacionaban un aumento de la expresión del factor de transcripción *UPB1* en plantas deficientes en *fer1-3-4* (Reyt et al., 2015) y la alteración observada de los niveles de *FER1* en la escala de Cu, en las plantas C1^{OE} (Figura R2.17), se comprobó la expresión del factor de transcripción *UPB1* en plantas silvestres y sobreexpresoras (Figura R2.23). En las plantas WT la expresión de *UPB1* disminuyó en suficiencia de Cu (1 μ M CuSO₄), pero no se detectó diferencia en exceso (10 μ M CuSO₄) respecto a las otras dos condiciones. Sin embargo, la expresión de *UPB1* se encuentra inducida en las plantas sobreexpresoras tanto en deficiencia como en suficiencia (0 μ M CuSO₄ y 1 μ M CuSO₄).

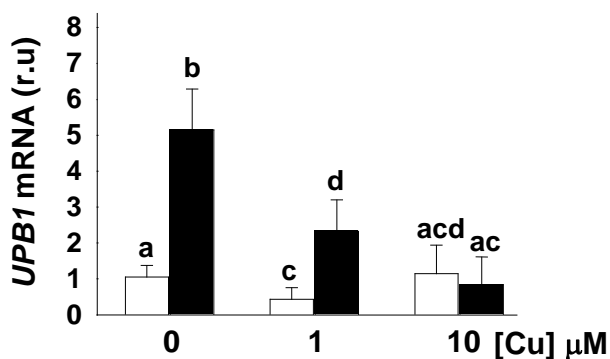


Figura R2.23. Expresión génica del factor *UPBEAT1* en plantas sobreexpresoras de C1^{OE}. Expresión génica del factor *UPB1* en plántulas de *Arabidopsis* WT y C1^{OE} de 7días cultivadas en diferentes concentraciones de CuSO₄ en el medio. Gen de la *UBQ* (ubiquitina) utilizado como control. Los valores representados son la media \pm SD de n=3 réplicas. Las muestras con una letra en común no son significativamente diferentes (p-value > 0,05).

La entrada de Cu^+ en las células produce ROS (Rodrigo-Moreno et al., 2013). *UPB1* regula la expresión de otros genes en función de los ROS presentes en la zona radicular de transición entre proliferación y diferenciación celular y se ha relacionado la inducción de *UPB1* con la inhibición de la longitud de las raíces (Tsukagoshi et al., 2010). Dado que las plantas C1^{OE} muestran una menor longitud de la raíz (Figura 2.20), se comprobó la expresión del factor de transcripción *UPB1* en las condiciones de suficiencia y deficiencia de Fe, a pH 5,7 (Figura R2.24). Los resultados mostraron que las plantas sobreexpresoras C1^{OE} presentaban mayor expresión del factor *UPB1* en ambas condiciones, sugiriendo una posible explicación para el acortamiento de la raíz en estas plantas.

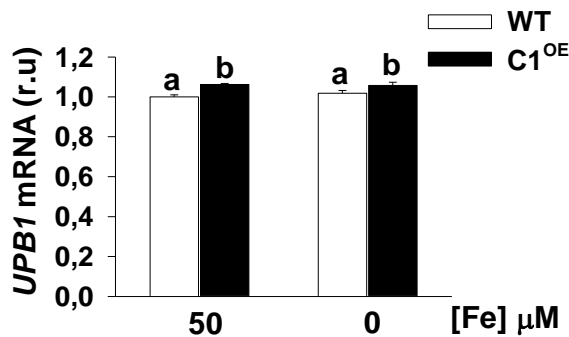


Figura R2.24. Expresión del factor *UPBEAT1* en diferente aporte de FeSO_4 en el medio de crecimiento. Expresión génica del factor *UPB1* en plantas WT y C1^{OE} de 7 días de crecimiento en medio con suficiencia (Fe 50 μM FeSO_4) o deficiencia FeSO_4 (0 μM FeSO_4) a pH 5,7. Gen de la *UBQ* (ubiquitina) utilizado como control. Los valores representados son la media \pm SD de n=2 réplicas. Las muestras con una letra en común no son significativamente diferentes (p-value > 0,05).

Dado que la expresión del factor *BRUTUS* (*BTS*) se induce en respuesta a bajas concentraciones de Fe (Long et al., 2010) y la concentración de Fe endógeno es menor en las plantas C1^{OE} , se comprobó la expresión del factor *BTS* en las plantas WT y C1^{OE} en una escala de CuSO_4 (Figura R2-25). Los resultados mostraron que la expresión de *BTS* se indujo en suficiencia (1 μM CuSO_4) o exceso (10 μM CuSO_4)

de Cu en el medio, en comparación con la deficiencia (0 μM CuSO_4). Del mismo modo, la expresión de *BTS* en las plantas C1^{OE} aumenta respecto al WT en deficiencia y exceso de Cu (0 μM CuSO_4 y 10 μM CuSO_4), aunque en esta última

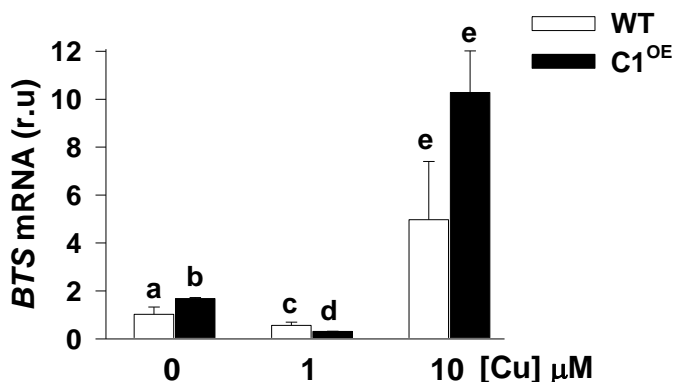


Figura R2.25. Expresión génica del factor *BTS* en plantas sobreexpresoras de C1^{OE} . Expresión génica del factor *BTS* en plántulas de *Arabidopsis* WT y C1^{OE} de 7 días cultivadas en diferentes concentraciones de CuSO_4 en el medio. Gen de la *UBQ* (ubiquitina) utilizado como control. Los valores representados son la media \pm SD de $n=3$ réplicas. Las muestras con una letra en común no son significativamente diferentes ($p\text{-value} > 0,05$).

condición las diferencias no son significativas.

Dado que la concentración de Fe interna es menor en las plantas C1^{OE} y que los genes de incorporación de Fe también se encuentran alterados en estas plantas, se estudió la expresión de otros factores implicados en la respuesta a deficiencia de Fe, que siguen una vía independiente de *BTS*, pertenecientes al grupo de los denominados factores de transcripción tipo beta hélice-vuelta-hélice (bHLH), como *FIT* (bHLH29) y los del subgrupo Ib (bHLH38, bHLH39, bHLH100 y bHLH101) (Colangelo y Gueriot, 2004; Wang et al., 2007).

Se analizó la expresión de varios de estos factores en plantas silvestres cultivadas durante 7 días con diferente aporte de FeSO_4 en el medio de crecimiento (Figura R2.26). En los tres genes analizados, *FIT*, *bHLH38* y *bHLH39*, se produce

una mayor expresión en la condición de deficiencia de Fe ($0 \mu\text{M FeSO}_4$), mientras que en suficiencia ($50 \mu\text{M FeSO}_4$) y exceso ($100 \mu\text{M FeSO}_4$) la expresión es comparativamente menor.

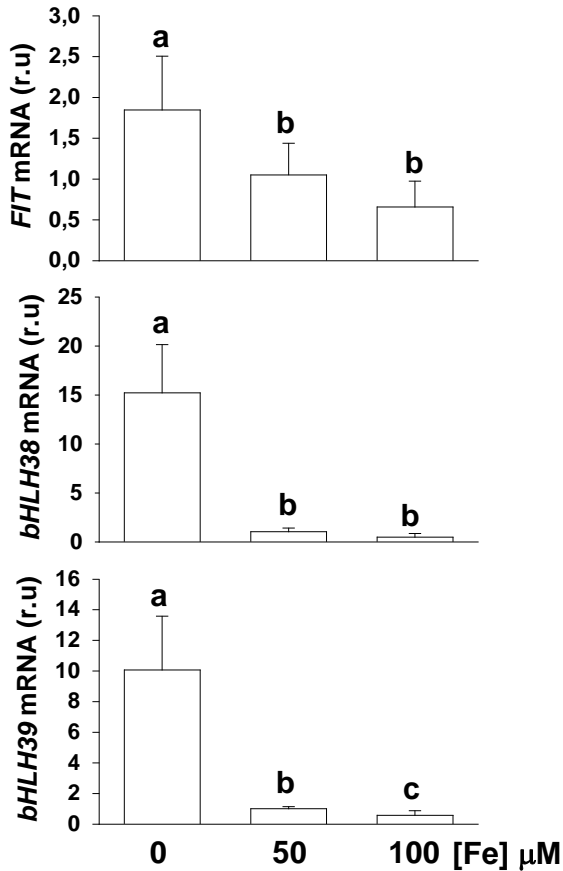


Figura R2.26. Expresión de los factores bHLH en plantas silvestres con diferentes concentraciones de FeSO_4 en el medio. Expresión génica de los factores *FIT*, *bHLH38* y *bHLH39* en plantas silvestres (WT) de 7 días en medios con diferente aporte de FeSO_4 ; deficiencia ($0 \mu\text{M FeSO}_4$), suficiencia ($50 \mu\text{M FeSO}_4$) y exceso de Fe ($100 \mu\text{M FeSO}_4$). Gen de la *UBQ* (ubiquitina) utilizado como control. Los valores representados son la media \pm SD de $n=3$ réplicas. Las muestras con una letra en común no son significativamente diferentes ($p\text{-value} > 0,05$).

Los resultados obtenidos corroboraron los datos previamente publicados para la expresión de estos genes en deficiencia de Fe (Colangelo y Guerinot, 2004; Wang et al., 2007).

A continuación, se analizó la expresión de estos genes variando el contenido de Cu en el medio. La expresión del factor *FIT*, que es clave en la regulación por deficiencia de Fe (Colangelo y Guerinot, 2004), mostró una menor expresión en deficiencia de Cu (0 μM CuSO_4) y en exceso (25 μM CuSO_4) (Figura R2.27-a). Este hecho sugiere que para la expresión óptima de este regulador maestro se requieren condiciones de suficiencia de Cu. A continuación, se comprobó la expresión de dos factores del grupo Ib: *bHLH 38* y *bHLH39* (Figura R2.27-b). En las plantas WT se observó que la expresión de ambos factores era mayor conforme aumentaba el CuSO_4 en el medio de crecimiento. Sin embargo, aunque las plantas C1^{OE} presentaron una tendencia similar, el óptimo de expresión se desplazó a concentraciones más altas de Cu (10 μM CuSO_4). Se estudiaron el resto de factores del grupo Ib, *bHLH100* y *bHLH101*, aunque no se observó el aumento progresivo de expresión conforme aumenta el CuSO_4 en las plantas WT, en ambos casos la expresión fue mayor en exceso de Cu (25 μM CuSO_4) respecto a la deficiencia del mismo (0 μM CuSO_4) (Figura R2.27-c). En las plantas sobreexpresoras C1^{OE} la expresión fue menor en todas las condiciones respecto al WT, excepto en la condición de exceso de Cu (10 μM CuSO_4), en la que se observó una elevada expresión. Por lo tanto, en la condición de 10 μM CuSO_4 , los factores reguladores *bHLH38*, *bHLH39*, *bHLH100* y *bHLH101* activan su expresión.

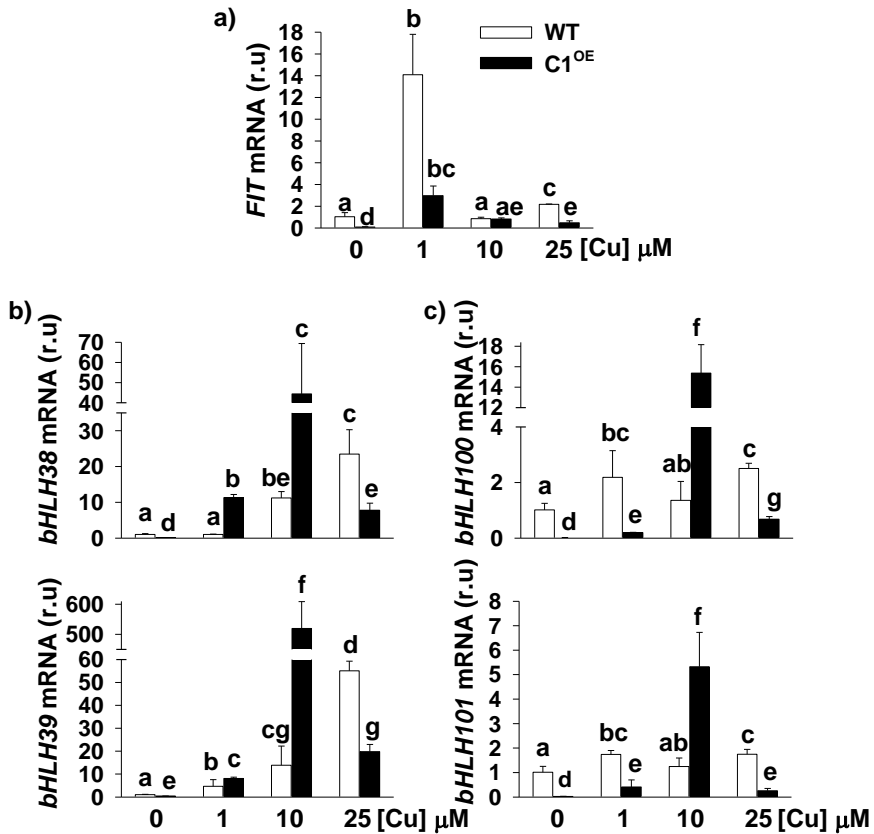


Figura R2.27. Expresión génica de los factores reguladores de la transcripción tipo bHLH: *FIT1* y el subgrupo Ib. a) Expresión génica del factor de transcripción *FIT* en plantas WT y C1^{OE} de 7 d, cultivadas en una escala de Cu; desde deficiencia (0 μM CuSO₄), hasta elevado exceso (25 μM CuSO₄). b) Expresión génica de los factores de transcripción *bHLH38* y *bHLH39* en plantas WT y C1^{OE} de 7 días, cultivadas en las mismas condiciones que en a). b) Expresión génica de los factores de transcripción *bHLH100* y *bHLH101* en plantas WT y C1^{OE} de 7 días, cultivadas en las mismas condiciones que en a). Gen de la *UBQ* (ubiquitina) utilizado como control. Los valores representados son la media ± SD de n=3 réplicas. Las muestras con una letra en común no son significativamente diferentes (p-value > 0,05).

Los resultados obtenidos ponen en evidencia que la alteración de la homeostasis del Cu por la sobreexpresión del transportador COPT1 y, por tanto, la mayor entrada de Cu⁺, produce una deficiencia de Fe en las plantas C1^{OE}. Efectivamente, los niveles de Fe en las plantas C1^{OE} están reducidos y dichas plantas muestran una mayor sensibilidad a la deficiencia de Fe (Figura R2.16). Aunque esta deficiencia provoca la inducción de la expresión de reguladores de homeostasis del Fe como los genes bHLH del subgrupo Ib, no induce la activación de la expresión del gen central de la regulación de deficiencia de Fe, *FIT*. Dado que *FIT* y los bHLH del subgrupo Ib se requieren conjuntamente para activar la respuesta molecular de deficiencia de Fe (Wang et al., 2007; Yuan et al., 2008), la falta de inducción de *FIT* hace que no se pueda activar la expresión de genes como la reductasa de la membrana *FRO2* o el transportador *IRT1*, claves para la adquisición de Fe.

Discusión Capítulo 2

Estudios previos demostraron que el factor AtCth2 de *Arabidopsis* está implicado en la formación de paredes celulares y en la formación de las anteras, provocando que plantas mutantes deficientes en *cth2* sean estériles (Chai et al., 2015). Sin embargo, en la levadura *S. cerevisiae*, Cth2 está implicado en la respuesta a la deficiencia de Fe, mediando la degradación de mensajeros cuyos productos unen Fe (Puig et al., 2005; Puig et al., 2008). A pesar de que dichas funciones son aparentemente diferentes, se considera a la pared celular como uno de los principales sumideros de metales y, en ese sentido, la remodelación de la misma podría influir en la movilización y biodisponibilidad de los metales (Ye et al., 2015).

El estudio *in silico* de los sitios ARE en el extremo 3'UTR de los genes, que podrían actuar como posibles dianas de AtCth2, muestra dos funciones biológicas sobrerrepresentadas: la "actividad desaturasa" (p-value $8,39 \cdot 10^{-4}$) y la "unión de metales" (p-value $1,06 \cdot 10^{-4}$) (Figura R2.2). Una vez más, estas dos funciones podrían estar relacionadas, ya que el aumento en el contenido en ácidos grasos insaturados es capaz de activar a las H⁺-ATPasas de la membrana plasmática y, con ello, favorecer la movilización del Fe (Oh et al., 2016).

Entre los genes de la homeostasis del Fe que tienen secuencias ARE se encuentra la ferritina *FER3*, implicada en el almacenaje de Fe (Petit et al., 2001) y genes que codifican para proteínas que contienen Fe, como citocromos y proteínas con centros Fe-S, así como implicadas en la regulación de la respuesta a deficiencia de Fe, como el factor de transcripción bHLH39 (Yuan et al., 2008). En cuanto a los genes relacionados con la homeostasis del Cu, tienen AREs el transportador de Cu de alta afinidad *COPT6*, implicado con la movilización del Cu desde la raíz hacia la parte aérea (Jung et al., 2012; Garcia-Molina et al., 2013), y genes que codifican proteínas que contienen Cu, entre ellas dos lacasas implicadas en la formación de las paredes celulares, la plantacianina implicada en la formación de las anteras (Dong et al., 2005) y el principal regulador de la transcripción en deficiencia de Cu *SPL7* (Nagae et al., 2008; Yamasaki et al., 2009). La presencia de AREs en genes tan importantes para la regulación global de la expresión génica como los factores

Discusión Capítulo 2

de respuesta a deficiencia de Fe (*bHLH39*) (Wang et al., 2007) y de Cu (*SPL7*) (Yamasaki et al., 2009), sugiere que AtCth2 podría regular de forma global ambos procesos de homeostasis de Fe y de Cu. Esta regulación podría ejercerse de forma parecida al papel de ScCth2 en levadura en deficiencia de Fe, regulando a nivel postranscripcional la expresión de genes implicados en la homeostasis del Fe (Puig et al., 2005; Puig et al., 2008). Sin embargo, ScCth2 no se ha relacionado con la homeostasis del Cu y nuestros resultados en el Capítulo 1 de la presente tesis no dejan claro si, a pesar de su regulación por altos niveles de Cu, existe una implicación directa en los efectos observados sobre sus dianas (Figuras R1.10 y R1.12).

De acuerdo con la ausencia de elementos *cis* de regulación por deficiencia de Fe (IDE) o por deficiencia de Cu (CuRE) en el promotor de *AtCTH2*, su expresión no se regula por la cantidad de Fe presente en el medio, pero en exceso de Cu aumenta su expresión, independientemente de la cantidad de Fe (Figura R2.4).

El ensayo de triple híbrido en levadura permitió demostrar que AtCth2 interacciona con secuencias ARE (Figura R2.3). De acuerdo con que la expresión de *AtCTH2* está regulada por el contenido de Cu en el medio, la expresión alterada del transportador COPT1 en plantas C1^{OE} (Andrés-Colás et al., 2010) incrementa los niveles de *AtCTH2* (Figura R2.7). Por ese motivo, las plantas C1^{OE} podrían servir para caracterizar la respuesta de *Arabidopsis* a niveles altos de Cth2, y cómo afecta a diferentes parámetros relacionados con las homeostasis del Cu y del Fe.

La disminución en la respiración de las raíces de las plantas C1^{OE} tanto en deficiencia como en exceso de Cu (Figura R2.8) coincide con lo que ocurre en levadura al aumentar el transporte de Cu⁺ (Figura R1.15). Esta disminución de la respiración podría deberse a la labilidad de los transportadores de electrones de la cadena mitocondrial, y más específicamente a los transportadores con centros Fe-S, que son muy sensibles al estrés oxidativo (Gleason et al., 2011) y al exceso de Cu⁺ (Gross et al., 2000; Foster et al., 2014).

La entrada de Cu⁺ en las plantas C1^{OE} se ha demostrado que causa mayor producción de radicales hidroxilo (OH^{*}) en el citosol, con consecuencias en la

activación de los canales de K^+ y Ca^{+2} que aumentan a su vez el daño oxidativo producido por el Cu^+ (Rodrigo-Moreno et al., 2013). De acuerdo con estos datos, el análisis de expresión global en plantas $C1^{OE}$ realizado con anterioridad (Perea-García, 2013) indicó que varios genes que codifican proteínas con centros Fe-S (*At-NEET*, *NIR1*, *IPSG*, *RAD3*) se encuentran reprimidos en la planta $C1^{OE}$ frente a la WT (Tabla R2.4) (Figura R2.10 y R2.11). Por lo tanto, la desregulación espacio-temporal de la entrada de Cu^+ en las plantas $C1^{OE}$, afecta de forma general a la expresión de genes que codifican a las proteínas con centros Fe-S (Andrés-Colás et al., 2010).

En el caso de que *AtCth2* pudiera tener un papel relacionado con la homeostasis metálica y dado que el homólogo de levadura *ScCth2* tiene entre sus dianas diversas proteínas con centros Fe-S (Puig et al., 2005), la regulación de las proteínas con clústeres Fe-S indicaría que funcionaría como activador. Entre otros factores de tipo TZF que pudieran ejercer la función de reguladores negativos de la expresión de los genes que codifican para proteínas con centros Fe-S, se encuentran los factores TZF del grupo IX, que son los que más se asemejan en la estructura de los dedos de Zn a *AtCth2* (Wang et al., 2008). De ellos, el único que podría ser compatible con ejercer una función como regulador negativo de la expresión de proteínas con centros Fe-S es el factor SOME-like por su expresión incrementada en las plantas sobreexpresoras (Figura R2.12).

Dado que los datos obtenidos mostraban que la alteración de la entrada de Cu^+ en la planta sobreexpresora $C1^{OE}$ afectaba a varios genes de la homeostasis del Fe, el segundo apartado de este capítulo se centró en estudiar la homeostasis de Fe en las plantas $C1^{OE}$. Además, varios parámetros fisiológicos indican la mayor sensibilidad a la deficiencia de Fe de las plantas $C1^{OE}$ (Figura R2.16) y, en consonancia, la concentración de Fe interno es menor en las plantas $C1^{OE}$ en todas las condiciones de crecimiento (Figura R2.17). De acuerdo con estos datos, la expresión del gen de la ferritina *FER1*, que es la que presenta mayores niveles de expresión (Petit et al., 2001), disminuyó conforme aumenta la concentración de Cu en el medio (Figura R2.18), lo que concuerda con que se requiera menos, dado su

papel en el almacenaje de Fe (Jeong y Guerinot, 2009). Estudios previos relacionan a *UPB1* con la represión de *FER1* (Reyt et al., 2015). Sin embargo, en nuestras condiciones experimentales, no se ha encontrado la relación esperada entre la expresión del factor *UPB1* y la de *FER1*, ni en la escala de Cu ni en la de Fe (Figura R2.24 y R2.25). La expresión de *UBP1* en las plantas C1^{OE} aumentó en todas las condiciones de la escala de Cu (Figura R2.24). Estos resultados explicarían por qué las plantas C1^{OE} presentan raíces más cortas en todas las condiciones de crecimiento de Cu, ya que se ha relacionado el aumento de la expresión de *UPB1* con el acortamiento de la raíz (Tsukagoshi et al., 2010).

La causa del menor contenido endógeno de Fe en las plantas C1^{OE} está relacionada con que la alteración de la entrada de Cu⁺ por la expresión expresión ubicua de *COPT1*, impide la activación de la expresión de la reductasa *FRO2* (Figura R2.19), encargada de reducir el Fe en las raíces (Robinson et al., 1999), y el transportador *IRT1* (Figura R2.20), encargado de la incorporación del Fe una vez reducido (Jeong y Guerinot, 2009), lo que redundaría en que las plantas C1^{OE} tienen mermada la capacidad de reducir el Fe⁺³ a Fe⁺² (Figura R2.19) y de incorporarlo. Esta inhibición también ocurre cuando hay deficiencia de Fe en el medio (Figura R2.19 y R2.20), lo que explicaría por qué las plantas C1^{OE} presentan un menor contenido de Fe, ya que son incapaces de activar el mecanismo de adquisición del metal.

Otra de las vías de entrada del metal en *Arabidopsis*, en condiciones de deficiencia de Fe, es mediante la secreción de cumarinas, compuestos de la ruta de los fenilpropanoides, que ayudan a asimilar el Fe presente en el suelo, sobretodo en condiciones alcalinas (Jeong et al., 2017). Nuevamente, las plantas C1^{OE} presentan una capacidad de secretar cumarinas reducida con respecto a las plantas silvestres (Figura R2.21 y R2.22), aunque no se han determinado los genes responsables de la inhibición (Figura R2.23).

Además de cumarinas, a partir del metabolismo de los fenilpropanoides (feruloil-CoA) se sintetizan exudados con actividad redox y/o moléculas capaces de unir Fe en condiciones de deficiencia del metal (Rajniak et al., 2018). En la ruta de

síntesis de estos compuestos se necesitan enzimas con Fe, como la 2-OGDO codificada por *F6'H1*, el citocromo P450, codificado por *CYP82C4*, y ambos se encuentran reprimidos (-1,03 y -2,60, respectivamente) en las plantas C1^{OE} en presencia de Cu. Dado que ambos codifican ferropoteínas, la represión podría reflejar una deficiencia prolongada del metal en las plantas C1^{OE} y esta represión afecta a la capacidad de las plantas para adquirir Fe.

No solo los diferentes mecanismos de incorporación de Fe, sino también el transporte, el almacenamiento y la asimilación están inhibidos en las plantas C1^{OE}, especialmente en exceso de Cu (Figuras R2.18, R2.19, R2.20 y R2.10). Sin embargo, la ruta de síntesis de péptidos de tipo IRONMAN (IMA) (Grillet et al., 2018; Hirayama et al., 2018) se encuentra inducida en condiciones de exceso de Cu en las plantas C1^{OE} como corresponde al bajo contenido de Fe. Efectivamente, *IMA2/FEP2* con un valor de +3,32 y *IMA1/FEP3* con +2,47 se encuentran entre los genes más inducidos en plantas C1^{OE} en exceso de Cu. La inducción de estos péptidos se ha propuesto que actúe como una señal de la deficiencia de Fe entre la parte aérea y las raíces que está destinada a incrementar la toma de Fe en plantas con estrategia I (Hirayama et al., 2018). Sin embargo, dicha inducción no es suficiente para la activación de la respuesta en las plantas C1^{OE}.

Dado que las plantas C1^{OE} no son capaces de activar diversos mecanismos de incorporación de Fe, el estudio de la expresión de factores de transcripción claves conocidos como bHLH (Pires y Dolan, 2010) podría servir para averiguar a qué parte de la señalización de la deficiencia de Fe está afectada por el Cu⁺. En este sentido, FIT (bHLH29) interacciona y forma heterodímeros con los bHLH del grupo Ib (bHLH38, bHLH39, bHLH100 y bHLH101) para inducir la respuesta a la deficiencia de Fe (Wang et al., 2007; Yuan et al., 2008). La expresión de *FIT* aumenta en deficiencia de Fe (Colangelo y Guerinot, 2004; Wang et al., 2007) (Figura R2.27). Sin embargo, se podría especular que se necesita un aporte adecuado y regulado de Cu para que la expresión de *FIT* sea óptima, ya que la expresión de *FIT* se reprime tanto en deficiencia como en exceso de Cu y en las plantas C1^{OE} (Figura R2.28), y con ella la percepción de la deficiencia de Fe. Sin

embargo, la expresión de los factores bHLH del grupo Ib presenta dos patrones diferenciados: *bHLH38* y *bHLH39* se activan conforme aumenta el Cu, mientras que *bHLH100* y *bHLH101* no (Figura R2.28). Este aumento en la expresión de *bHLH38* y *bHLH39* no tiene como consecuencia la activación de los genes de incorporación de Fe, como son la reductasa *FRO2* y el transportador *IRT1* (Figura R2.19 y R2.20), posiblemente debido a la falta de expresión de *FIT* (Colangelo y Guerinot, 2004; Sivitz et al., 2012).

Otro componente aguas arriba en la señalización de la respuesta a deficiencia de Fe es la E3 ubiquitin ligasa BTS, que se ha relacionado con la disminución de la estabilidad del complejo POPEYE-IRL3 en respuesta a bajas concentraciones de Fe (Selote et al., 2015). Curiosamente, la expresión de los genes diana del complejo POPEYE-IRL3, entre los que se encuentran *At-NEET*, las *ferritinas* (*FER1/3/4*), el transportador de la vacuola *VTL2* y la *nicotianamina sintasa 4* (*NAS4*) (Tissot et al., 2019) está reprimida (Tabla R2.7), al contrario de lo que cabría esperar tras el aumento observado de la expresión de *BTS* (Figura R2.26). Estos datos sugieren que BTS no estaría haciendo su papel como E3 ubiquitin ligasa de POPEYE-IRL3 y quizás debido al aumento de la estabilidad de este complejo, a su vez se reprimiría la expresión sus genes diana, como *At-NEET* (Figura R2.10) (Figura D2.1). Dada la variedad de dominios de BTS, como los dominios hemeritrina (HHE), que afectan a su función, se ha postulado que BTS actúe como un sensor en el que convergen diferentes señales como los niveles de Fe, el daño en los centros Fe-S, los niveles de O₂ y las condiciones redox celulares (Kobayashi y Nishizawa, 2014; Kobayashi, 2019; Rodríguez-Celma et al., 2019). La alteración de la entrada de Cu⁺ a través de COPT1 podría afectar a la función de BTS, probablemente mediante la unión o bien directamente del Cu⁺ a los diferentes motivos de BTS, o indirectamente a través del estrés oxidativo y/o las alteraciones en los clústeres Fe-S que produce el Cu⁺ se podría alterar la función de este regulador de la respuesta a la deficiencia de Fe.

Un papel también como sensor de metales y estrés oxidativo se ha atribuido a la familia de proteínas NEET, que están implicadas en la homeostasis del Fe, Fe-S y ROS. Estas proteínas juegan importantes funciones en la apoptosis y autofagia, en las que parece ser clave la especial labilidad del clúster [2Fe-2S] con actividad redox que poseen (Karmi et al., 2018). At-NEET reside en cloroplastos y mitocondrias y funciona en el desarrollo y en la senescencia de las plantas (Nechushtai et al., 2012; Su et al., 2013; Inupakutika et al., 2017). En este sentido, la inhibición de la expresión de *At-NEET* en las plantas C1^{OE} podría participar en la

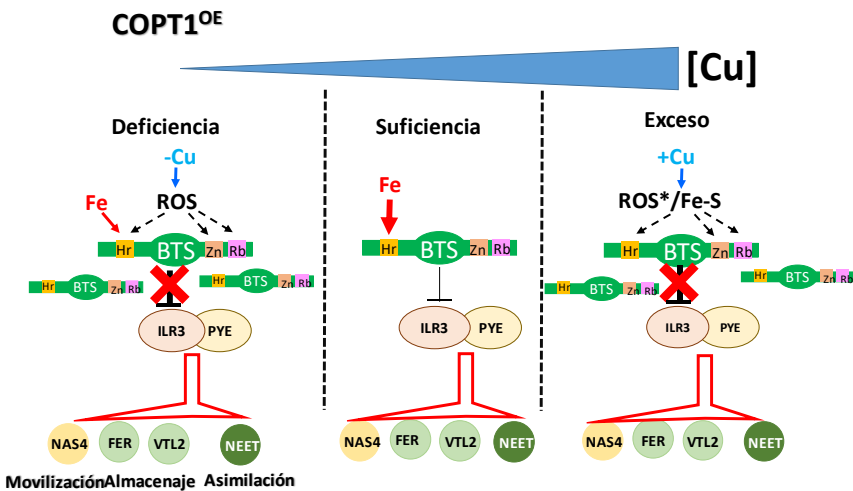


Figura D2 1. Esquema representativo del efecto del cobre en la respuesta del sensor BTS en plantas C1^{OE}. Diferentes respuestas llevadas a cabo por el sensor BTS en función del Cu presente en el medio en las plantas sobreexpresoras del transportador COPT1. En deficiencia de Cu, la entrada de Cu a través del transportador porcaría una serie de ROS que se uniría a los dominios Hemeretrina (Hr), dedos de Zn (Zn) o rubredoxina (Rb) y como consecuencia haría que BTS no desestabilizaría la unión ILR3-PYE y por tanto estos seguirían inactivando la expresión de genes de respuesta a deficiencia de Fe, tanto a la movilización (NAS4), almacenaje (FER y TVL2) o asimilación (NEET). En condiciones de suficiencia de Cu, el Fe presente se uniría al dominio Hr, produciendo una pequeña desestabilización de ILR3-PYE y por tanto activando la expresión de sus dianas. Por último, en condiciones de exceso de Cu, se producirían una serie de ROS*, diferentes a los de deficiencia, o se afectarían los centros Fe-S, produciendo un efecto similar al de deficiencia de Cu, no desestabilizando ILR3-PYE y por tanto reprimiéndose los genes de respuesta a deficiencia de Fe.

falta de respuesta a la deficiencia de Fe, especialmente en condiciones de deficiencia de Cu, que es donde se induce la expresión de *At-NEET* en las plantas WT (Figura R2.10).

Finalmente, se ha demostrado que la expresión de los genes implicados en la homeostasis de metales en las células vegetales muestra oscilaciones circadianas, que se considera que están encaminadas a optimizar el momento más adecuado del día para la entrada de estos elementos, que podrían resultar tóxicos (Andrés-Colás et al., 2010; Hermans et al., 2010; Chen et al., 2013; Hong et al., 2013; Salomé et al., 2013). Las consecuencias de la entrada de Cu^+ , y el incremento que produce en el estrés oxidativo (Rodrigo-Moreno et al., 2013), se minimizarían si los transportadores funcionaran en momentos puntuales que no interfieran con otros procesos oxidativos (Perea-García et al., 2016). Además, la nutrición mineral forma parte de las múltiples ruedas entrelazadas que constituyen la base molecular de los ritmos circadianos (Andrés-Colás et al., 2010; Chen et al., 2013; Hong et al., 2013; Salomé et al., 2013; Peñarrubia et al., 2015). El desajuste sostenido en los ciclos de entrada de Cu^+ y sus implicaciones sobre el estrés oxidativo, y cómo éste afecta a su vez a los sensores de metales y a sus respuestas, puede estar en el origen de que las plantas C1^{OE} no puedan responder a la deficiencia de Fe.

Resultados Capítulo 3

3. ESTUDIO DE LA SOBREENPRESIÓN DEL TRANSPORTADOR DE COBRE DE ALTA AFINIDAD DE *ARABIDOPSIS* (ATCOPT1) EN *Oryza sativa*

3.1. Caracterización de la respuesta nutricional al cobre en *Oryza sativa*.

Para evaluar cómo cambia el contenido de Cu endógeno en el arroz en relación con el Cu exógeno presente en el medio y determinar los rangos de los diferentes estados nutricionales, se cultivaron plántulas de 8 días en placas de 1/2 MS suplementadas con concentraciones de CuSO₄ entre 0 y 100 μM (Figura R3.1-a). Observamos una correlación positiva entre la concentración endógena de Cu determinada en brotes de plántulas de 8 días de edad y el Cu agregado al medio de cultivo. Según el rango de suficiencia de CuSO₄ establecido para plantas superiores (5-20 μg / g P.S.) (Märschner, 2012), los brotes de plántulas de arroz cultivadas en medio sin suplemento de CuSO₄ (CuSO₄ 0 μM) contienen niveles de Cu en el límite inferior de suficiencia (5,1 μg / g P.S.), mientras que el exceso de Cu se estableció en plantas cultivadas en los medios suplementados con concentraciones de CuSO₄ 10 μM (28,6 μg / g P.S.) y superiores (Figura R3.1-a).

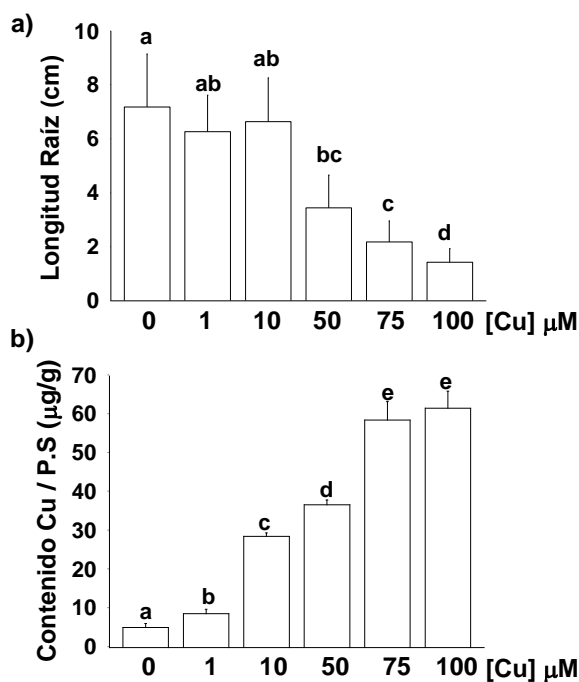


Figura R3.1. Caracterización de plantas de *O. sativa* cultivadas en medios con diferentes concentraciones de cobre. (a) Concentración de Cu endógeno de brotes de plántulas WT de 8 días cultivadas en una escala de Cu desde la ligera deficiencia (0 μM CuSO_4) a severo exceso (100 μM CuSO_4). El Cu se determinó por espectrometría de absorción atómica. (b) Longitud de la raíz de plantas WT cultivadas en las mismas condiciones que en (a). Los valores representados son la media \pm SD de n= 3 réplicas. Las muestras con una letra en común no son significativamente diferentes (p -value > 0,05) test de Kruskal-Wallis.

A nivel fisiológico, el efecto tóxico del Cu en plántulas de arroz se manifiesta en forma de inhibición del crecimiento de la raíz. El exceso de Cu produjo una reducción significativa en la longitud de la raíz, con una disminución del 50 % en el medio suplementado con CuSO_4 50 μM (Figura R3.1b). Una tendencia similar se ha observado anteriormente en plantas de *Arabidopsis* (Andrés-Colás *et al.*, 2013).

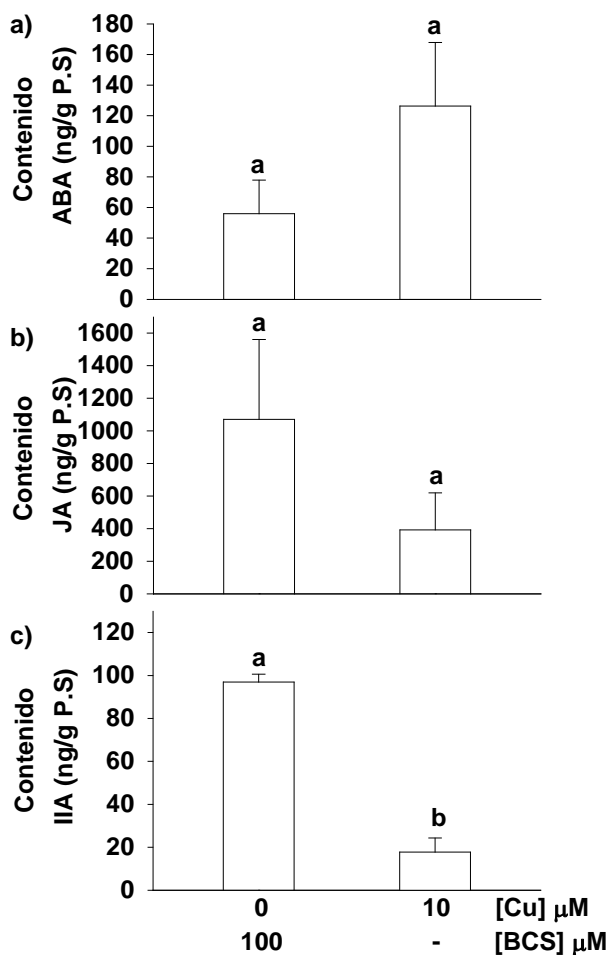


Figura R3.2. Concentración de hormonas en plantas de *O. sativa*. (a) Concentración de ABA en brotes de plántulas WT de 8 días cultivadas en severa deficiencia (BCS 100 μM) o suficiencia (10 μM CuSO₄) de Cu. (b) Concentración de JA en brotes de plántulas WT de 8 d cultivadas en las mismas condiciones que en (a). (c) Concentración de IAA en brotes de plántulas WT de 8 d cultivadas en las mismas condiciones que en (a). Los valores representan la media ± SD de n=3 réplicas. Las muestras con una letra en común no son significativamente diferentes (p-value >0,05).

Sin embargo, el aporte de Cu no tuvo efecto en el contenido de fitohormonas en los brotes, como el ácido abscísico (ABA) y el jasmonato (JA) (Figura R3.2-a-b), analizados en un medio de deficiencia de CuSO₄ obtenido al agregar un quelante

Cu (deficiencia Cu: 0 μM CuSO_4 + 100 μM BCS), o en exceso de CuSO_4 (10 μM CuSO_4). Sin embargo, las concentraciones de auxinas (IAA) en brotes revelaron diferencias significativas, con niveles reducidos en exceso de CuSO_4 (Figura R3.2-c).

Dado que la expresión de los transportadores de Cu de alta afinidad de la membrana plasmática se considera un buen marcador de la deficiencia de CuSO_4 en *Arabidopsis* (Yamasaki *et al.*, 2009; Bernal *et al.*, 2012; Andrés-Colás *et al.*, 2013), se determinó el nivel de expresión del gen *OsCOPT1* (LOC_Os01g56420) mediante qPCR en las plántulas de arroz cultivadas en un amplio rango de concentraciones de CuSO_4 como el anteriormente mencionado. Los niveles de expresión de *OsCOPT1* fueron altos a 0 μM CuSO_4 y disminuyeron drásticamente cuando el medio se suplementó con CuSO_4 (Figura R3.3-a). Por el contrario, los niveles de transcripción de la metalotioneína *OsMT1c* (LOC_Os12g38010), que se considera un marcador de exceso de Cu en *Arabidopsis* (Andrés-Colás *et al.*, 2013), aumentaron en las plántulas cultivadas en los medios que contenían más de 10 μM CuSO_4 (Figura R3.3-b).

Esta tendencia coincidió con la variación de la concentración de Cu endógeno (Figura 1a) y confirmó que 10 μM de CuSO_4 puede considerarse un medio con exceso de Cu. Sin embargo, para 0 μM de CuSO_4 , las plantas experimentaron una ligera deficiencia de Cu a nivel molecular al expresar el transportador de Cu de alta afinidad *OsCOPT1*.

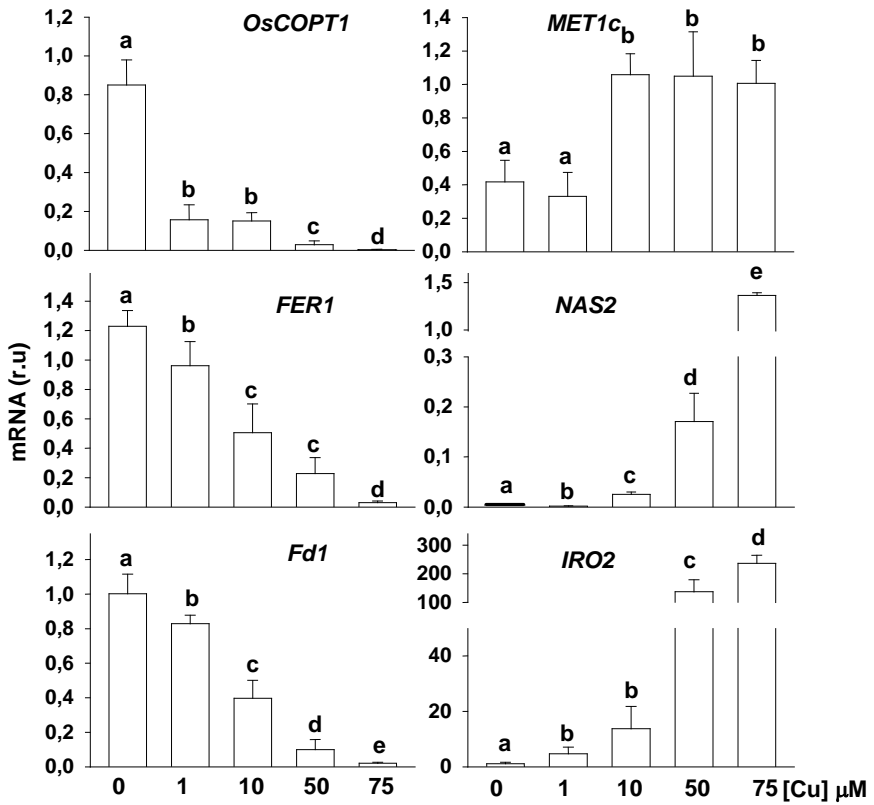


Figura R3.3. Expresión de genes implicados en la homeostasis metálica a diferentes concentraciones de cobre. (a) Expresión relativa de genes inducidos por deficiencia de Cu. La expresión de *OsCOPT1*, *OsFER2* y *OsFd1* se determinó por qPCR de brotes de plántulas de 8 días cultivadas en una escala de Cu que comprende desde condiciones control (0 μM CuSO_4) hasta exceso de metal (75 μM CuSO_4). (b) Expresión relativa de genes inducidos en exceso de Cu. Expresión de *OsMET1c*, *OsNAS2* and *OsIRO2* en las mismas condiciones indicadas en (a). El gen de la *actina* se usó como control. El nivel de mRNA se expresó en unidades relativas (ru). Los valores son relativos al nivel de expresión en 0 μM CuSO_4 en (a) y frente al nivel de expresión en 75 μM CuSO_4 en (b). Los valores representados son la media \pm SD de n=3 réplicas. Las muestras con una letra en común no son significativamente diferentes (p-value > 0,05).

Por lo tanto, hemos establecido los rangos nutricionales de Cu para plántulas de arroz en nuestras condiciones experimentales, en función de la concentración de metales, parámetros fisiológicos y las respuestas moleculares, que reflejan el estado nutricional dependiendo del contenido endógeno del metal.

3.2. Perfil transcriptómico de *Oryza* e influencia del cobre en la homeostasis del hierro.

Para obtener una mayor comprensión de las respuestas moleculares que dependen del estado nutricional de Cu, se utilizaron brotes de plántulas de *O. sativa* de 8 días para realizar un análisis de expresión génica global mediante micromatrices de DNA. Se compararon dos condiciones con diferente concentración de CuSO₄ en el medio de crecimiento, control estándar ½ MS (CuSO₄ 0 μM) y exceso de Cu (CuSO₄ 75 μM), ya que se ha demostrado que esta concentración afecta significativamente a la concentración endógena de metal, a la longitud de la raíz y prácticamente elimina la expresión de *OsCOPT1* (Figuras R3.1 y R3.2). La Tabla R3.1 contiene la lista de los genes expresados diferencialmente, indicando el número de veces de cambio (FC de *fold change*), considerando un mínimo de 2 veces para la condición de exceso de Cu, representada como $\log_2(FC) \geq |1|$. La cuantificación de la expresión por qPCR de *OsCOPT1* y la metalotioneína *OsMT1c*, que se inducen, respectivamente, en la condición control y en exceso de CuSO₄, sirvieron para validar nuestras condiciones experimentales (Figura R3.3). Curiosamente, las expresiones de varios genes implicados en la homeostasis del Fe se encuentran alteradas. La expresión de la ferritina (*OsFER2*) (LOC_Os12g01330) y la ferredoxina (*OsFd1*) (LOC_Os08g01380) están inducidas en ligera deficiencia de CuSO₄ (medio control), mientras que la nicotianamina sintasa (*OsNAS2*) (LOC_Os03g19420) y el factor de transcripción *OsIRO2* (LOC_Os01g72370) se inducen en exceso de CuSO₄ (Tabla R3.1).

Tabla R3.1. Genes expresados diferencialmente en exceso de Cu. Comparación de expresión de genes en micromatrices de plántulas WT de 8 días de *O. sativa* cultivadas en condiciones de exceso de CuSO₄ (CuSO₄ 75 μM) frente al control (CuSO₄ 0 μM) (valor p <0,05). Se muestran genes que presentan una diferencia mínima de 2 veces (log₂FC ≥ |1|) en el nivel de expresión.

Gene Name	Gene ID	Annotation	log ₂ FC	p-value
Repressed genes under Cu excess				
	LOC_Os01g10400	expressed protein	-1.743	1.08e-05
OsCOPT1	LOC_Os01g56420	ctr copper transporter family protein, putative, expressed	-1.590	8.02e-07
	LOC_Os06g39730	#N/A	-1.332	1.96e-03
OsATX1	LOC_Os02g32814	heavy metal-associated domain containing protein, expressed	-1.242	5.98e-04
<i>OsAP2_ERF</i>	LOC_Os09g11460	AP2 domain containing protein, expressed	-1.236	7.01e-05
OsFER2	LOC_Os12g01530	ferritin-1, chloroplast precursor, putative, expressed	-1.188	1.97e-05
OsFd1	LOC_Os08g01380	2Fe-2S iron-sulfur cluster binding domain containing protein, expressed	-1.092	3.33e-06
	chr05:11696945	#N/A	-1.016	2.30e-06
	LOC_Os06g41610	retrotransposon protein, putative, unclassified, expressed	-1.002	1.70e-03
	LOC_Os12g08790	TPR domain protein, putative, expressed	-0.999	3.21e-03
Induced genes under Cu excess				
	LOC_Os12g38064	#N/A	3.22	3.04e-06
OsNAS2	LOC_Os03g19420	nicotianamine synthase, putative, expressed	2.18	1.61e-03
OsMT1c	LOC_Os12g38010	metallothionein, putative, expressed	2.13	9.38e-08
OsMT1f	LOC_Os12g38051	metallothionein, putative, expressed	2.09	6.78e-04
OsIRO2	LOC_Os01g72370	helix-loop-helix DNA-binding domain containing protein, expressed	1.97	8.37e-08
OsNAS1	LOC_Os03g19427	nicotianamine synthase, putative, expressed	1.80	3.41e-06
	LOC_Os03g32490	DUF1230 domain containing protein, expressed	1.74	5.29e-06
OsNAAT1	LOC_Os02g20360	tyrosine aminotransferase, putative, expressed	1.73	2.06e-03
	LOC_Os01g46720	expressed protein	1.55	1.31e-04
	LOC_Os08g43840	expressed protein	1.41	9.44e-04
	LOC_Os12g42960	expressed protein	1.37	2.54e-06
	LOC_Os01g35310	expressed protein	1.31	1.62e-04
<i>OsSKP1</i>	LOC_Os06g02350	S-phase kinase-associated protein 1A, putative, expressed	1.31	7.80e-03
	LOC_Os03g01090	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase, cyclophilin type, putative, expressed	1.31	1.34e-04
	LOC_Os05g15770	#N/A	1.23	5.06e-02
	LOC_Os11g29370	haloacid dehalogenase-like hydrolase family protein, putative, expressed	1.18	1.25e-04
<i>OsLEA1</i>	LOC_Os03g20680	late embryogenesis abundant protein 1, putative, expressed	1.16	5.57e-04
	LOC_Os05g38210	mitochondrial glycoprotein, putative, expressed	1.14	8.86e-03
	LOC_Os08g08170	transposon protein, putative, CACTA, En/Spm sub-class	1.11	4.49e-02
	chr03:307064	#N/A	1.10	1.30e-03
	LOC_Os10g14050	expressed protein	1.06	2.30e-04
<i>OsRNAsaT2</i>	LOC_Os09g36680	ribonuclease T2 family domain containing protein, expressed	1.04	3.57e-04
	LOC_Os09g17590	expressed protein	1.00	1.21e-03
	LOC_Os03g38970	metal ion binding protein, putative, expressed	1.00	1.19e-05

Para validar el perfil transcriptómico y continuar analizando la respuesta al Cu, se realizaron análisis cuantitativos, mediante qPCR, de la expresión de genes en las muestras de las plántulas cultivadas dentro del rango de concentraciones de CuSO_4 (0-75 μM). Los niveles de transcripción de *OsFER2* y *OsFd1* disminuyeron a medida que la concentración de CuSO_4 aumentaba en el medio de crecimiento (Figura R3.3). Por otro lado, los niveles de expresión de *OsIRO2* y su diana *OsNAS2* aumentaron a medida que crecía la concentración de CuSO_4 en el medio (Figura R3.3). Otras dianas de *OsIRO2*, tales como *OsNAS1* y *OsNAAT1* (Ogo *et al.*, 2007), así como la metalotioneína *OsMT1f* también se inducían en exceso de Cu (Tabla R3.1). Todos ellos fueron confirmados por qPCR (Figura R3.4). Dado que la expresión de *OsCOPT5* y *OsCOPT7* se induce en deficiencia de CuSO_4 (Yuan *et al.*, 2010), estos genes también se incluyeron como controles en el análisis. Mientras *OsCOPT7* sí que mostró inducción en ligera deficiencia de CuSO_4 (condición control), la expresión de *OsCOPT5* no se alteró en nuestras condiciones experimentales (Figura R3.4). Otros genes relacionados con la homeostasis del Fe, como los que codifican la superóxido dismutasa de Fe, *OsFSD1.1* y *OsFSD1.2*, y la proteína con dominio Fe-S *OsCDGSH1*, homóloga a *At-NEET* (que muestran un valor Log_2 (FC) de -0.615) se encuentran reprimidos en condiciones de exceso de CuSO_4 (Figura R3.5).

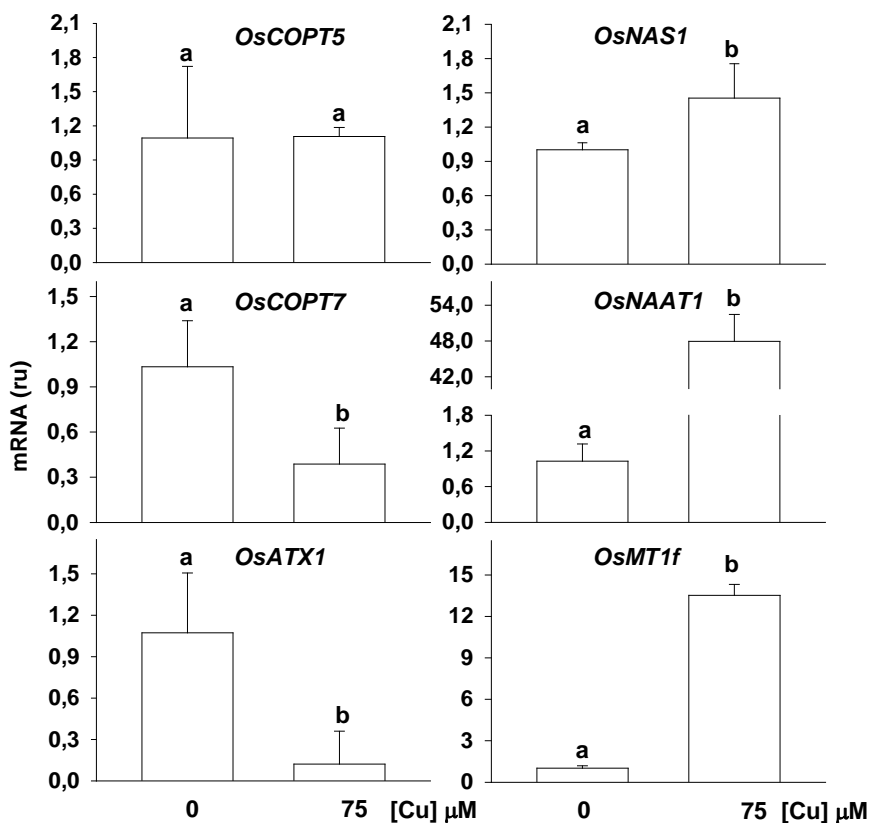


Figura R3.4. Expresión génica en plantas WT con diferente aporte de cobre.

(a) Expresión relativa de los genes *OsCOPT5*, *OsCOPT7*, *OsATX1* en brotes de plántulas WT de 8 días cultivadas en condiciones control (0 μM CuSO₄) y exceso de CuSO₄ (75 μM CuSO₄). (b) Expresión relativa de los genes *OsNAS1*, *NAAT1*, *OsMT1f* en brotes de plántulas WT de 8 días cultivadas en las mismas condiciones que en (a). Los valores de expresión son relativos a las plántulas cultivadas en condiciones control. Los valores representan la media ± SD de n=3 réplicas. Las muestras con una letra en común no son significativamente diferentes (p-value>0,05).

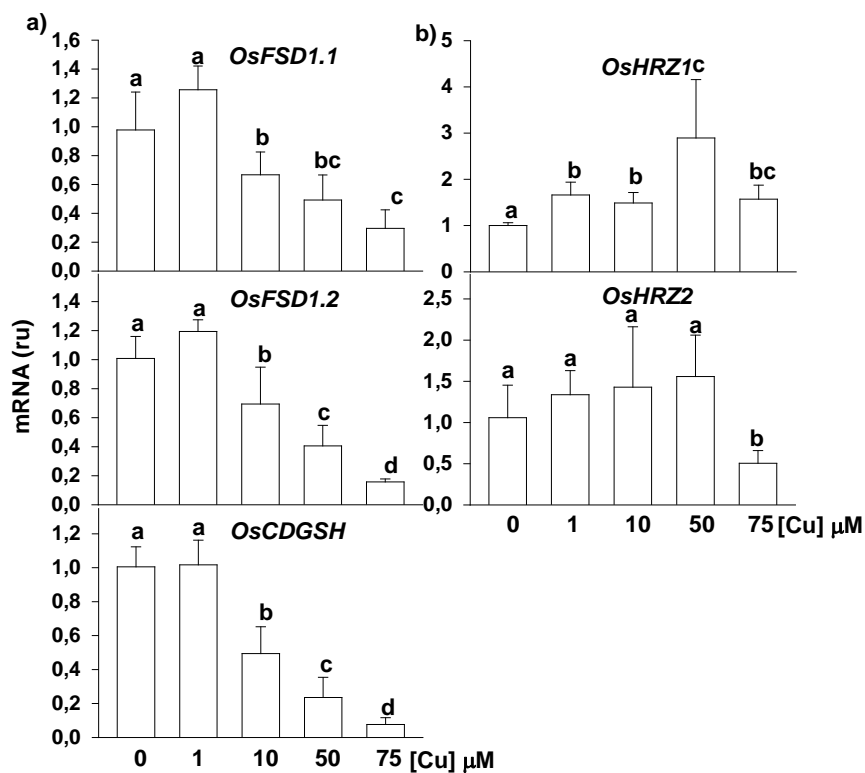


Figura R3.5. Expresión génica en plantas WT con diferente aporte de cobre. (a) Expresión relativa de los genes *OsFSD1.1*, *OsFSD1.2*, *OsCDGSH* de brotes de plántulas WT de 8 días cultivadas en una escala de CuSO_4 desde condiciones de control ($0 \mu\text{M CuSO}_4$) hasta exceso ($75 \mu\text{M CuSO}_4$). (b) Expresión relativa de los genes *OsHRZ1* and *OsHRZ2* de plántulas de WT de 8 días cultivadas en las mismas condiciones que en (a). Los valores de expresión son relativos a las plántulas cultivadas en condiciones de deficiencia. Los valores representan la media \pm SD de $n=3$ réplicas. Las muestras con una letra en común no son significativamente diferentes ($p\text{-value} > 0,05$).

Tomados en conjunto, tanto el análisis de expresión global, como los patrones cuantitativos de expresión de RT-PCR, indican que el estado nutricional del Cu en arroz influye en la homeostasis del Fe al alterar la expresión de varios genes relacionados con la misma.

3.3. Análisis de la influencia de la expresión ectópica de *AtCOPT1* en la homeostasis del hierro.

Los estudios de expresión global en brotes de plántulas de arroz sugirieron que el Cu tiene un impacto en la homeostasis del Fe (Tabla R3.1). Para estudiar más a fondo la relación entre el Cu y el Fe, se generaron dos líneas transgénicas independientes de *O. sativa* que sobreexpresan ectópicamente la proteína de transporte de *Arabidopsis* AtCOPT1, fusionada al extremo carboxi terminal con el epítipo de la hemaglutinina (HA) del virus la gripe humana bajo el control del promotor del RNA 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV35S) y el terminador del gen de la nopalina sintasa (NOS). Estas plantas transgénicas *CaMV35S::AtCOPT1-HA::NOS* se denominaron AtCOPT1^{OE-1} (C1^{OE-1}) y AtCOPT1^{OE-2} (C1^{OE-2}). Para verificar que las líneas transgénicas obtenidas expresan la construcción *CaMV35S::AtCOPT1-HA::NOS*, se analizaron las plantas resistentes a la kanamicina mediante diferentes técnicas. En primer lugar, el cDNA obtenido de las plántulas de 8 días de WT, C1^{OE-1} y C1^{OE-2} se analizaron mediante sqRT-PCR (Figura R3.6). El gen *AtCOPT1* se detectó únicamente en las líneas transgénicas. La adición del epítipo HA permitió detectar la proteína AtCOPT1 mediante Western-blot revelado con anticuerpos específicos para dicho epítipo (Figura R3.6-b).

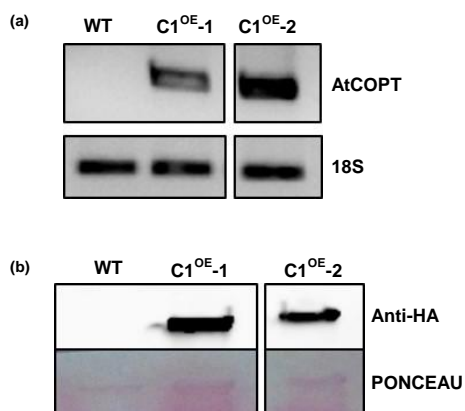


Figura R3.6. Expresión de *AtCOPT1* en plantas transgénicas de *O. sativa*. (a) Expresión génica de *AtCOPT1* se determinó por sqPCR de plántulas WT, C1^{OE-1} y C1^{OE-2} de 8 días. El gen *18S* se usó como control de carga. (b) El análisis de Western-Blot se utilizó para detectar el epítipo HA en plántulas WT, C1^{OE-1} and C1^{OE-2} cultivadas en las mismas condiciones que en (a). El anticuerpo primario (anti-HA) se encuentra conjugado con peroxidasa. La tinción de proteínas con el colorante rojo de *Ponceau* se utilizó como control de carga.

Aunque se procesó una cantidad similar de proteína total en las tres muestras (panel inferior en la Figura R3.6-b), el epítipo HA se detectó sólo en las plántulas C1^{OE} (panel superior en la Figura R3.6-b). Estos resultados corroboran que las dos líneas transgénicas (C1^{OE-1} y C1^{OE-2}) expresan el gen *AtCOPT1*, y que se traduce a proteína.

Para caracterizar las consecuencias de la sobreexpresión de *AtCOPT1* en arroz, las plántulas C1^{OE-1} y C1^{OE-2} se cultivaron durante 8 días en medios con concentraciones crecientes de CuSO₄, y luego se midieron las longitudes de los brotes y las raíces (Figura R3.7). Tanto en plantas WT como transgénicas, las longitudes de los brotes y raíces disminuyeron cuando se añadieron 50 µM o concentraciones de Cu más altas al medio (Figura R3.7). Es importante destacar que el acortamiento de brotes y raíces fue más pronunciado en las líneas transgénicas. Específicamente, la línea transgénica C1^{OE-1} mostró una disminución significativa en la longitud del tallo en comparación con las plántulas WT, mientras

que la C1^{OE-2} no mostró diferencias significativas, probablemente debido a una mayor variabilidad (Figura R3.7-a). Con respecto a la longitud de la raíz, se produjo una reducción del 27 % y el 19 % del crecimiento de la raíz en las plántulas WT a 50 y 75 μM Cu SO₄, respectivamente, mientras que la inhibición de crecimiento de la raíz fue significativamente mayor (29-52 %) en ambas líneas C1^{OE-1} y C1^{OE-2}

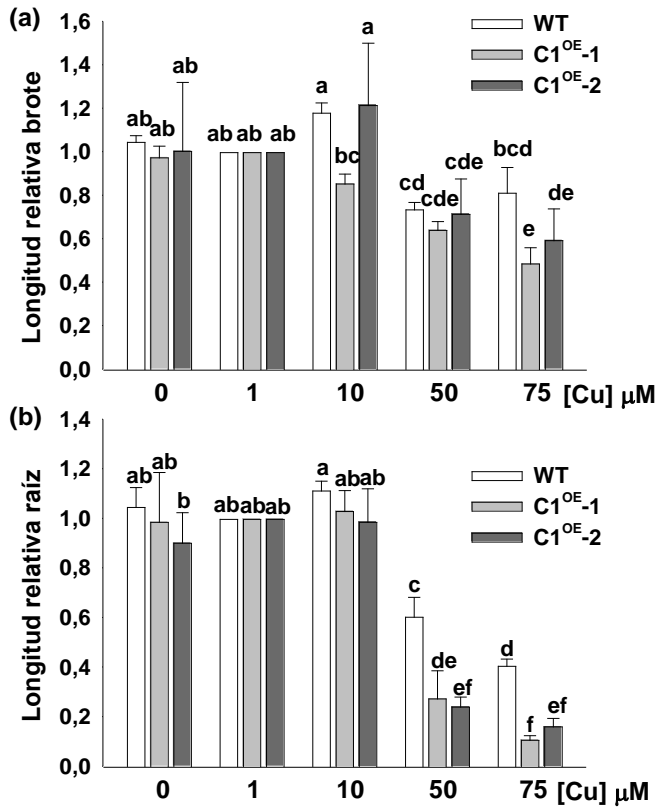


Figura R3.7. Longitud del brote y la raíz de *O. sativa* en plántulas WT y C1^{OE}.

(a) Longitud relativa de los brotes de las líneas WT, C1^{OE-1} y C1^{OE-2} de 8 días cultivadas en una escala de Cu desde ligera deficiencia (0 μM CuSO₄) a exceso (75 μM CuSO₄). (b) Longitud relativa de las raíces medida en las mismas condiciones que en (a). La relación se calculó y se normalizó para cada genotipo frente a la condición de suficiencia (1 μM CuSO₄). Los valores representan la media \pm SD de n=3 réplicas. Las muestras con una letra en común no son significativamente diferentes (p -value>0,05).

(Figura R3.7-b). Estos resultados indican que las plantas de arroz C1^{OE} son más sensibles que las WT al Cu presente en el medio de cultivo.

Para comprobar si las plantas transgénicas mostraban alteración en la acumulación de Cu y de Fe, los niveles endógenos de ambos metales se determinaron en raíces y brotes mediante ICP-MS (Figura R3.8). En las condiciones de Cu ensayadas (0 y 75 μM de CuSO_4), no se observaron diferencias significativas en los niveles de Cu endógeno en los brotes de las plantas transgénicas en comparación con WT. Con respecto al contenido de Fe, en condiciones control (sin CuSO_4 añadido), las raíces C1^{OE-1} y C1^{OE-2} acumularon 60-36 % menos de Fe que

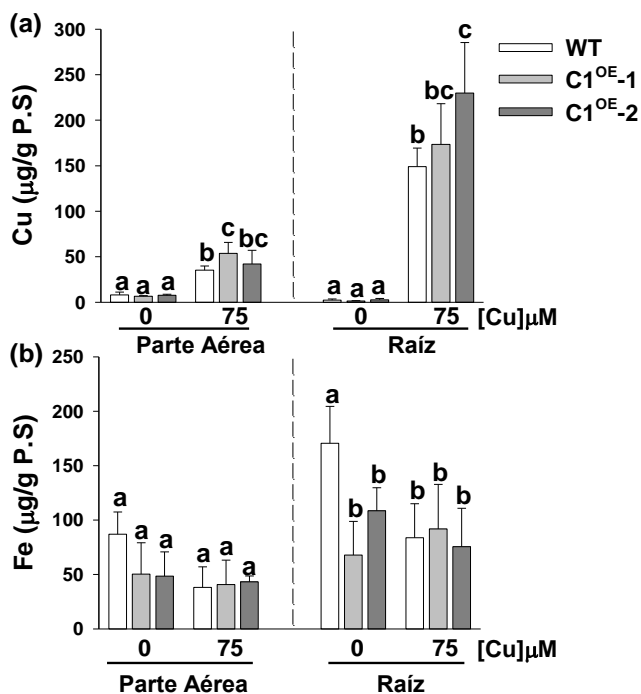


Figura R3.8. Concentración de metales en plantas de *O. sativa* C1^{OE} cultivadas en medios con diferente contenido de Cu. (a) Concentración de Cu en brotes y raíz en plántulas de 8 días de las líneas WT, C1^{OE-1} y C1^{OE-2} cultivadas en condiciones de deficiencia (0 μM CuSO_4) o exceso (75 μM CuSO_4) de Cu. (b) Concentración de Fe en brotes y raíces de plántulas de WT, C1^{OE-1} y C1^{OE-2} cultivadas en las mismas condiciones que en (a). Los valores representan la media \pm SD de n=3 réplicas. Las muestras con una letra en común no son significativamente diferentes (p-value>0,05).

las líneas WT, respectivamente (Figura R3.8-b). Estos datos indican que la expresión de *AtCOPT1* en el arroz disminuye significativamente la acumulación de Fe en la raíz.

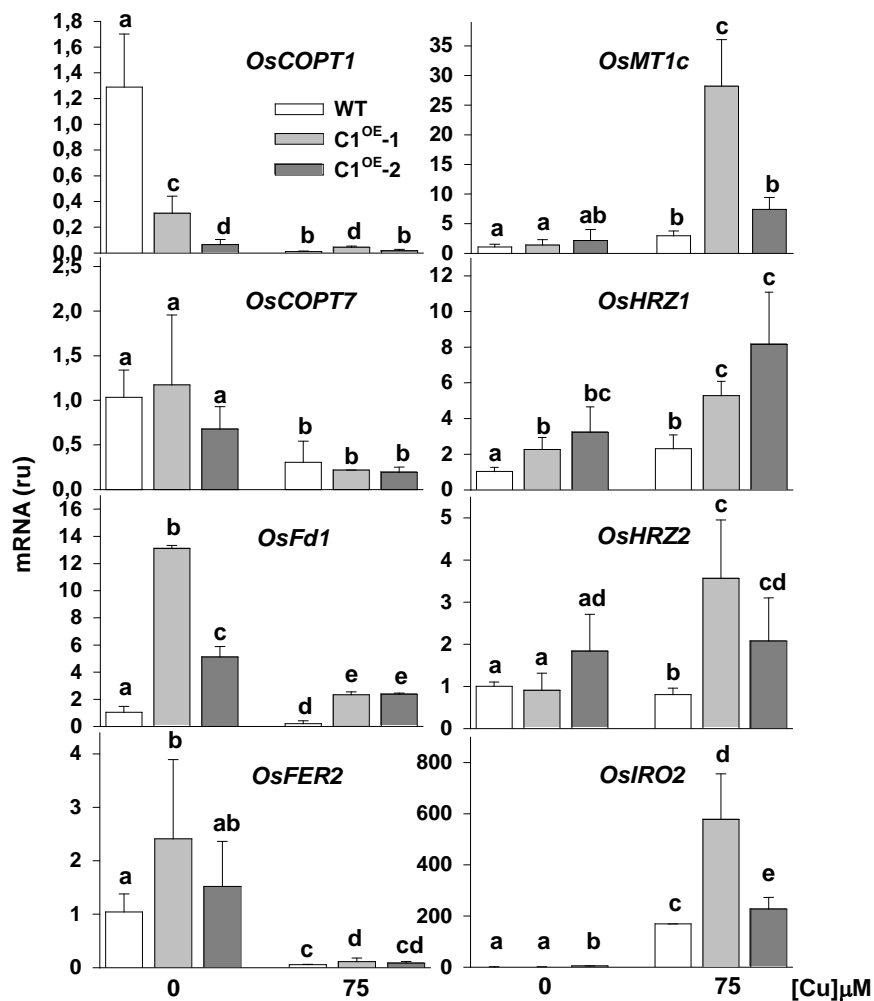


Figura R3.9. Expresión relativa de los genes *OsCOPT1*, *OsCOPT7*, *OsMT1c*, *OsFd1*, *OsFER2*, *OsHRZ1*, *OsHRZ2* y *OsIRO2* en plantas de arroz WT y las sobreexpresoras C1^{OE}. Expresión relativa de los genes analizada por qPCR de brotes de plántulas WT y C1^{OE} cultivadas en condiciones control (0 μM CuSO₄) y exceso de CuSO₄ (75 μM CuSO₄). La expresión del gen de la actina se usó como control. El nivel de mRNA se expresa en unidades relativas (ru). Los valores son relativos a las plántulas WT cultivadas en deficiencia. Los valores son la media ± SD de n=3 réplicas. Las muestras con una letra en común no son significativamente diferentes (p-value >0,05).

La expresión de los genes de la homeostasis del Cu y del Fe se analizó mediante qPCR en las plantas transgénicas C1^{OE}. Seleccionamos como genes representativos *OsCOPT1* y *OsMT1c*, que estaban regulados positivamente por la deficiencia de Cu y el exceso de Cu, respectivamente (Figura R3.3). La expresión endógena de *OsCOPT1* fue menor en las dos líneas transgénicas C1^{OE} a 0 μ M de CuSO₄ (Figura R3.9). Este resultado sugiere que, a pesar de que no se observaron cambios globales en los niveles de Cu de la planta por ICP-MS (Figura R3.8), las plantas transgénicas podrían detectar un aumento en la concentración de Cu en el compartimento nucleo-citosólico. Por debajo de 75 μ M CuSO₄, la expresión de *OsMT1c* fue mayor en las dos líneas transgénicas C1^{OE} que en las plántulas WT (Figura R3.9), lo que también indica que las plantas C1^{OE} están detectando niveles más altos de Cu. En conjunto, estos datos muestran que las líneas C1^{OE} presentan cambios en la expresión génica compatibles con la percepción de niveles incrementados de Cu intracelular y que la expresión de genes marcadores específicos es más sensible que el contenido total de metales para evaluar el estado nutricional de Cu en el espacio celular nucleo-citosólico.

A continuación, analizamos la expresión de genes relacionados con la homeostasis del Fe. Mientras que la expresión de *OsFER2* no mostró cambios, la expresión de *OsHRZ1*, *OsHRZ2*, *OsIRO2* y *OsFd1* fue mayor en las líneas transgénicas, al menos en CuSO₄ 75 μ M (Figura R3.9). Dado el papel negativo postulado para los posibles sensores *OsHRZ1* y *OsHRZ2* en la adquisición de Fe (Kobayashi *et al.*, 2013), estos resultados apuntan a una alteración de la homeostasis del Fe cuando la captación de Cu aumenta en las líneas C1^{OE}. Sin embargo, la expresión de los supuestos sensores de Fe *OsHRZ1* y *OsHRZ2* en plantas WT fue similar en los diferentes niveles de suministro de Cu, con una disminución para *OsHRZ2* a 75 μ M CuSO₄ (Figura R3.5).

En Arabidopsis, la sustitución de la superóxido dismutasa de Cu-Zn (SOD-Cu/Zn) por su equivalente de Fe es una característica específica de la respuesta de deficiencia de Cu (Abdel-Ghany *et al.*, 2005a; Waters *et al.*, 2012). Dado que la

sustitución de SOD implicaría un aumento de la demanda de Fe en deficiencia de Cu, verificamos si también se producía en *Oryza sativa* (Figura R3.10).

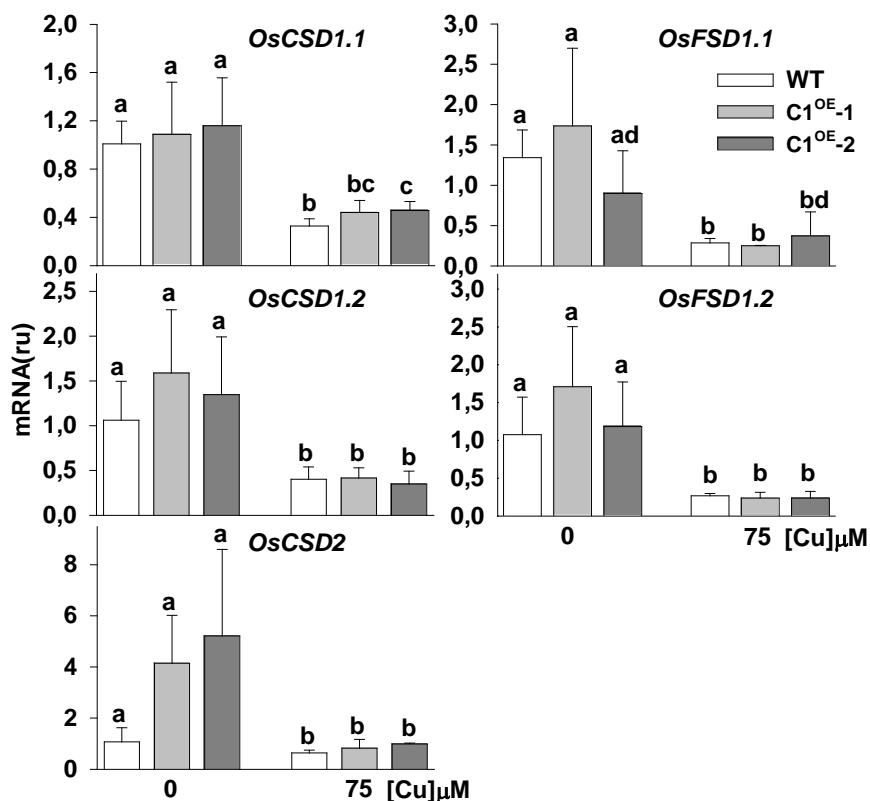


Figura R3.10. Expresión de los genes SOD en plantas de arroz WT y sobreexpresoras At-C1^{OE}. La expresión relativa de los genes *OsCSD1.1*, *OsCSD1.2*, *OsCSD2* (codifican Cu, Zn SODs), *OsFSD1.1* y *OsFSD1.2* (codifican Fe SODs) de los brotes de plántulas WT y C1^{OE} de 8 días cultivadas en condiciones control (0 μM CuSO₄) y exceso (75 μM CuSO₄). Los valores son relativos a las plántulas WT control. Los valores son la media ± SD de n=3 réplicas. Las muestras con una letra en común no son significativamente diferentes (p-value >0,05).

Los diferentes genes que codificaban SOD dependientes de Cu (*OsCSD1.1*, *OsCSD1.2* y *OsCSD2*) mostraron mayor expresión en la deficiencia de CuSO₄ que,

en las condiciones de exceso de CuSO_4 , en lugar de ser reprimidas por deficiencia de CuSO_4 como se describe para los homólogos de *Arabidopsis* (Abdel-Ghany y Pilon, 2008; Waters *et al.*, 2012). La expresión de SOD dependientes de Fe (*OsFSD1.1* y *OsFSD1.2*) también fue mayor en deficiencia de CuSO_4 que en exceso, lo que indica una mayor producción de radicales superóxido en deficiencia de CuSO_4 . Sin embargo, no se detectaron diferencias significativas en la expresión de genes SOD entre las líneas transgénicas WT y C1^{OE} (Figura R3.10), lo que sugiere que la sustitución de SOD no está implicada en los fenotipos observados.

3.4. Fenotipo de las líneas transgénicas sobreexpresoras *AtCOPT1* en diferentes condiciones de cobre y hierro en el medio.

Para investigar más a fondo la posible interacción entre el Cu y el Fe, analizamos varios parámetros de las plántulas WT y C1^{OE} cultivadas en presencia de diferentes concentraciones de CuSO_4 y FeSO_4 (Figura R3.11). La línea WT y las dos líneas C1^{OE} mostraron una longitud de raíz similar cuando se cultivaron en placas en el medio control (+ Cu + Fe). Sin embargo, las líneas transgénicas C1^{OE} fueron más sensibles a la deficiencia sólo de CuSO_4 (-Cu+Fe, 35 %-42 % de reducción de la longitud de la raíz), y especialmente a la falta de FeSO_4 (+Cu-Fe, reducción del 75 % -69 %) y a la doble deficiencia (-Cu-Fe: 71 % -76 % de reducción) (Figura R3.11).

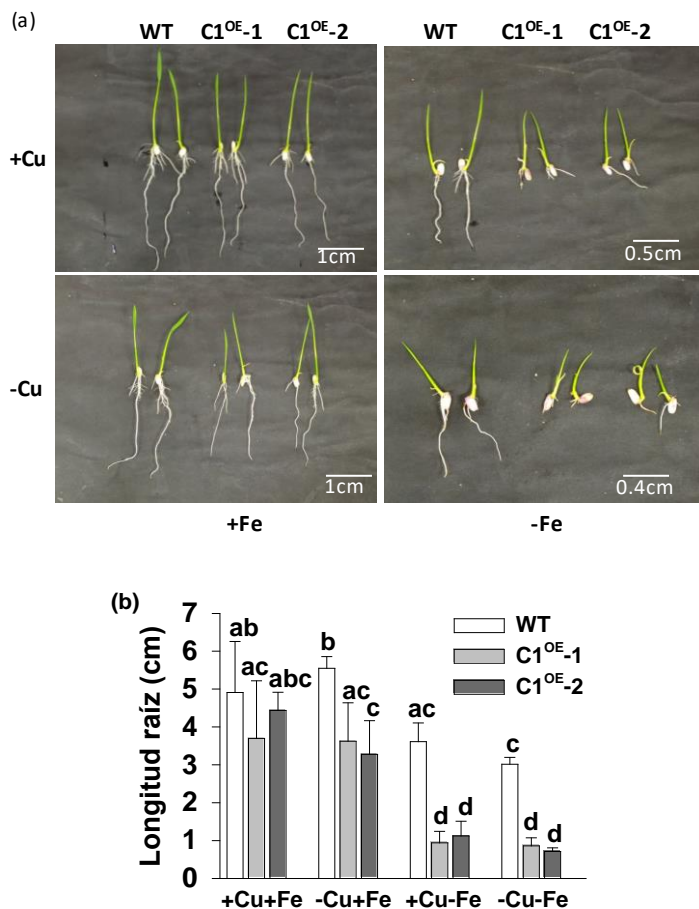
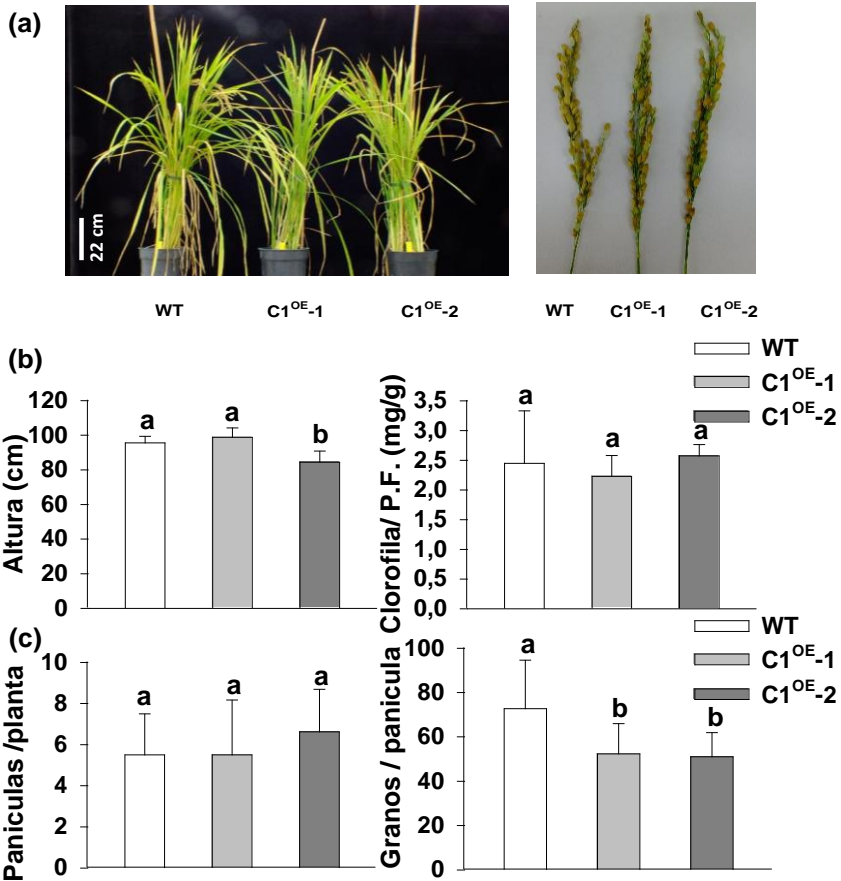


Figura R3.11. Caracterización de plantas C1^{OE} de *O. sativa* cultivadas en medio con diferente contenido de cobre y hierro. (a) Fotografías representativas de plántulas WT, C1^{OE}-1 y C1^{OE}-2 cultivadas con diferentes medios: suficiencia de CuSO₄ y FeSO₄ (+Cu+Fe), deficiencia de CuSO₄ (-Cu+Fe), deficiencia de FeSO₄ (+Cu-Fe), deficiencia de CuSO₄ y FeSO₄ (-Cu-Fe). (b) Longitud de la raíz de plántulas WT, C1^{OE}-1 y C1^{OE}-2 de 8 días cultivadas en las mismas condiciones que en (a). Los valores representan la media ± SD de n=3 réplicas. Las muestras con una letra en común no son significativamente diferentes (p-value>0,05).

Con el fin de verificar si había diferencias entre las líneas de arroz WT y C1^{OE} se cultivaron en condiciones normales de invernadero y se analizaron diferentes parámetros agronómicos (Figura R3.12). Las alturas de las plantas permanecieron mayormente inalteradas, excepto por una ligera disminución (alrededor del 15 %) en la línea C1^{OE}-2 (Figuras R3.12-a y b).



1 y C1^{OE}-2 de 5 meses. (b) Altura de las plantas y contenido de clorofila de las hojas por gramo de peso fresco de plantas de arroz WT y C1^{OE}. (c) Panículas por planta y granos por panícula de plantas WT and C1^{OE}. Los valores representan la media \pm SD de n=3 réplicas. Las muestras con una letra en común no son significativamente diferentes (p -value > 0,05).

Resultados capítulo 3

La concentración de metales se determinó tanto en hojas jóvenes como viejas de plantas de 4 y 5 meses. Mientras que los metales se mantuvieron apenas sin cambios en las hojas viejas de las plantas de 5 meses de edad, las concentraciones de Cu y Fe aumentaron en las hojas jóvenes de las líneas de arroz C1^{OE} (Figura R3.13). La concentración de clorofila y la producción de panículas por planta no se vieron afectadas en las líneas de C1^{OE} en estas condiciones de crecimiento (Figuras

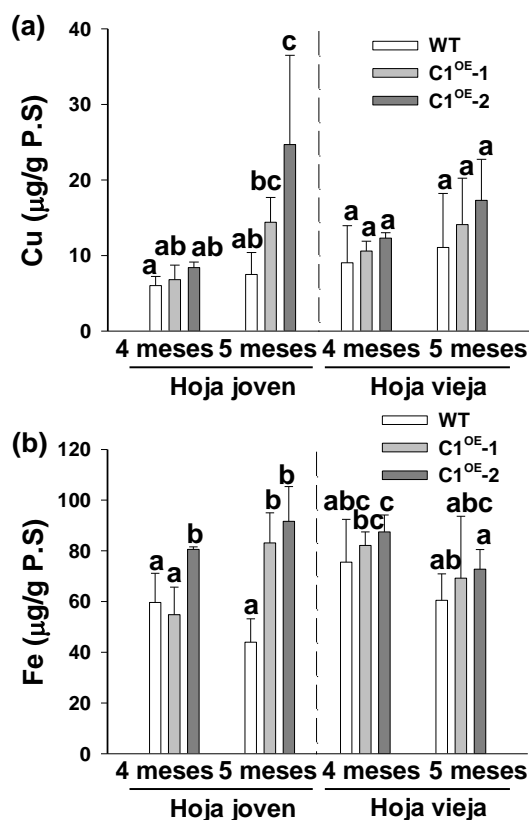


Figura R3.13. Concentración de metales de plantas de arroz WT y sobreexpresoras C1^{OE} cultivadas en suelo. (a) Concentración de Cu en hojas jóvenes y viejas de plantas WT y C1^{OE} de 4 y 5 meses cultivadas en suelo. (b) Concentración de Fe en plantas WT y C1^{OE} cultivadas en las mismas condiciones que en (a). Los valores representan la media \pm SD de n=3 réplicas. Las muestras con una letra en común no son significativamente diferentes (p-value>0,05).

R3.12-b y c). Sin embargo, el número de granos por panícula sí se redujo ligeramente en las líneas C1^{OE} (Figura R3.12-c).

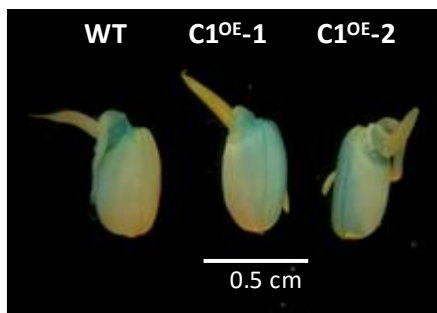


Figura R3.14. Tinción de Perl de granos de arroz sin pulir de plantas WT y C1^{OE}. Las semillas fueron germinadas durante 3 días en ½MS y fotografiadas después de la tinción de Perl.

La localización de Fe detectada por el método de tinción de Perl (Stacey *et al.*, 2008) indicó que Fe estaba presente en las líneas WT y C1^{OE} (Figura R3.14).

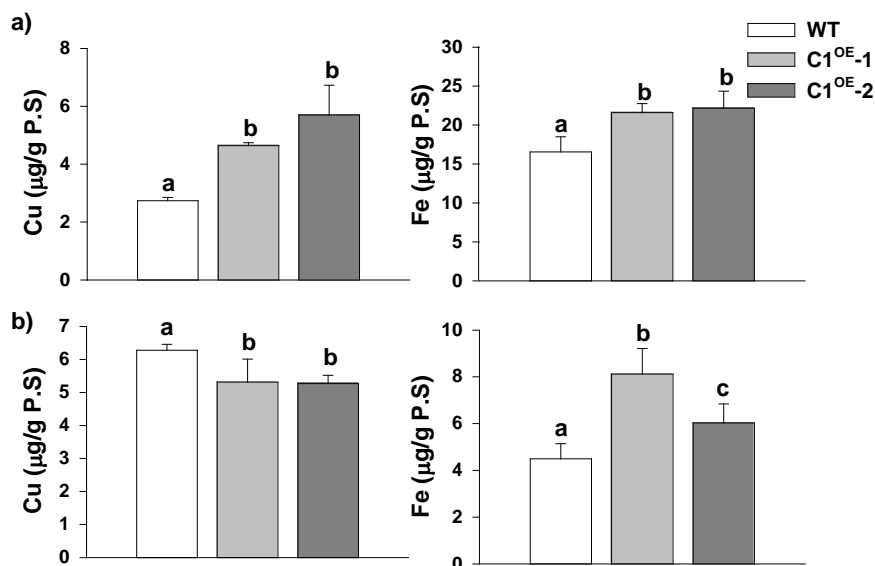


Figura R3.15. Contenido de metales en plantas C1^{OE} de *O. sativa* cultivadas en invernadero. a) Contenido de Cu y Fe de granos de arroz sin pulir de plantas WT and C1^{OE}. b) Contenido de CuSO₄ y FeSO₄ de granos de arroz pulidos de plantas WT and C1^{OE}. Los valores representan la media \pm SD de n=3 réplicas. Las muestras con una letra en común no son significativamente diferentes (p-value>0,05).

Sin embargo, el contenido de Cu y Fe en el grano de arroz sin pulir de ambas líneas C1^{OE} fue mayor que en los controles (Figura R3.15-a). Mientras que el contenido de Cu disminuyó ligeramente en los granos pulidos de las líneas C1^{OE} en comparación con los controles, el contenido de Fe fue aún más alto que en el WT (Figura R3.15-b). En conjunto, la expresión ectópica de *AtCOPT1* en el arroz conduce a una alteración de la homeostasis del Fe con un mayor contenido de Fe en los órganos sumidero, como las hojas jóvenes y los granos de arroz sin pulir.

Discusión Capítulo 3

En este capítulo evaluamos las características fisiológicas y los efectos moleculares causados por el Cu en las plantas de *O. sativa* al agregar Cu a los medios de cultivo y también cuando las plantas sobreexpresan el transportador de Cu de alta afinidad COPT1 de *A. thaliana*. En lugar de la cuantificación de metales, el estudio de la expresión de los marcadores moleculares de la homeostasis del Cu resultó ser un indicador más fiable del contenido metálico a nivel simplástico. Las determinaciones de metales en las células vegetales son incapaces de discriminar el reparto metálico entre los compartimentos intracelulares (simplesma) y apoplástico, ya que los metales están fuertemente unidos a las paredes celulares (Ye *et al.*, 2015). En *A. thaliana*, la expresión de los genes de los transportadores COPT de la membrana plasmática (AtCOPT1, AtCOPT2 y AtCOPT6) se ha demostrado que sirve como marcador de las condiciones de deficiencia de Cu (Sancenón *et al.*, 2003; Andrés-Colás *et al.*, 2010; Garcia-Molina *et al.*, 2013). El hecho de que la expresión de *OsCOPT1* esté finamente regulada, de acuerdo con la concentración de Cu en el medio, sugiere que este transportador es también un excelente marcador del estado de Cu celular endógeno en brotes de plántulas de arroz (Figura R3.3). Así, al considerar el patrón de la expresión *OsCOPT1*, se establecieron tres condiciones diferentes de nivel de Cu en los medios de cultivo en *O. sativa*. La deficiencia de Cu se alcanzó en el medio sin suplemento de Cu (0 μM CuSO_4), dónde la expresión del transportador *OsCOPT1* está marcadamente inducida, y la expresión aumentada de *OsCOPT7*, *OsATX1*, *OsFSD1.1* y *OsFSD1.2* también corrobora las condiciones de deficiencia intracelulares (Figuras R3.4 y R3.5). La suficiencia de Cu corresponde a las condiciones entre 1 μM y 10 μM de CuSO_4 en los medios, donde *OsCOPT1* mostró una expresión basal. El exceso de Cu en el arroz se observó a 50 μM de CuSO_4 y a concentraciones más altas de Cu (75 μM CuSO_4), cuando la expresión de *OsCOPT1* apenas se detectó (Figura. R3.3). Para el exceso de Cu, los datos del arroz difieren de los obtenidos en *Arabidopsis*, donde el exceso de metal se observa a partir de 10 μM CuSO_4 (Andrés-Colás *et al.*, 2013).

Para realizar un estudio global de cambios de expresión génica en arroz, se seleccionó como la condición de exceso 75 μM de CuSO_4 y se comparó con la

condición estándar control (0 μM CuSO_4). La inducción de la *OsMT1c*, en las condiciones de 50 μM y 75 μM de CuSO_4 en el medio, confirmó que éstas representaban el exceso de metal (Figura R3.3). La expresión de otro gen que codifica MTs, *OsMT1f*, también se indujo en exceso de Cu (Tabla R3.1 y Figura R3.4), lo que es indicativo de que son buenos candidatos como marcadores moleculares de exceso de Cu en arroz. La inducción de metalotioneínas tipo 1 por el exceso de Cu responde a un proceso de protección que afecta a la eliminación de ROS (Hassinen *et al.*, 2011). La expresión de los genes relacionados con complejos metal-NA, como *OsNAS1*, *OsNAS2* y *OsNAAT1* también aumentaron (Figura R3.3, R3.5) y podrían ser utilizados como marcadores moleculares de exceso de Cu en el arroz.

Para examinar el efecto que tiene la alteración de la incorporación de Cu, se sobreexpresó el transportador *AtCOPT1* en las plantas de *O. sativa*. *AtCOPT1* comparte un 51 % de identidad de secuencia y un 66 % de similitud de secuencia con *OsCOPT1* (Yuan *et al.*, 2010). Por otra parte, *AtCOPT1* es capaz de complementar el fenotipo de las cepas de *S. cerevisiae* deficientes en el transporte de Cu (Puig y Thiele, 2002; Sancenón *et al.*, 2003). Confirmamos que las líneas de arroz C1^{OE} obtenidas, expresan el gen heterólogo y producen la proteína codificada (Figura R3.6). A nivel fenotípico, y en condiciones de exceso de Cu, el acortamiento de la longitud de la raíz fue más marcado en las plantas C1^{OE} que en las WT (Figura R3.7). Estos resultados son consistentes con los descritos en *Arabidopsis* (Andrés-Colás *et al.*, 2010), y están de acuerdo con estudios previos en los que se encontró que el exceso de Cu causaba una reducción en el peso de las plantas de arroz (Mostofa *et al.*, 2014). Esto podría deberse a la incorporación de Cu en las plantas como Cu^+ , que resulta perjudicial ya que produce ROS (Rodrigo-Moreno *et al.*, 2013). La reducida expresión del gen endógeno *OsCOPT1* en las líneas transgénicas en las condiciones control indicó que en las líneas de C1^{OE} se percibían niveles de Cu endógenos más altos, como resultado de la actividad de *AtCOPT1* (Figura R3.8). Asimismo, la alta expresión de la metalotioneína *OsMT1c* bajo exceso de Cu (Figura R3.9) indica una mayor percepción del contenido de Cu en las líneas C1^{OE}.

Hay evidencias de la relación entre Cu y Fe en otros organismos, como la levadura o las algas, donde el Cu es necesario para la incorporación y distribución de Fe (Puig *et al.*, 2007; Gulec y Collins, 2014). En *Arabidopsis*, el Cu y las deficiencias de Fe inducen la expresión del transportador de Cu de alta afinidad *COPT2*, y los mutantes *copt2* son más tolerantes que las plantas WT a la condición de doble deficiencia de Cu y Fe (Colangelo y Guerinot, 2004; Perea-García *et al.*, 2013). De acuerdo con estos datos, la sobreexpresión de *AtCOPT1* en arroz produjo mayor sensibilidad a la doble deficiencia de Cu y Fe (Figura R3.11). La deficiencia severa de Cu conduce a un aumento de la síntesis de auxinas en el arroz (Figura R3.2), como también se ha descrito que ocurre en deficiencia de Fe en *Arabidopsis*, que resulta en un aumento de la expresión de los genes de biosíntesis de auxinas (Cheng *et al.*, 2007). Aunque el papel de IAA en la relación entre Cu y la homeostasis de Fe merece una mayor caracterización (Peñarrubia *et al.*, 2015), nuestros resultados prevén que las plantas sometidas a múltiples deficiencias nutricionales también presenten una mayor cantidad de auxinas.

La interferencia entre la homeostasis del Cu y del Fe en condiciones de exceso de Cu podría ser al menos parcialmente explicada por el aumento de la expresión del regulador de la transcripción *OsIRO2* (homólogo de los factores bHLH del subgrupo Ib de *Arabidopsis*), que podría justificar la expresión de las dianas de la estrategia II de captación de Fe, relacionadas con la biosíntesis de DMA como *OsNAS1*, *OsNAS2* y *OsNAAT1* (Tabla R3.1; Figura R3.3 y R3.4) (Ogo *et al.*, 2007). La expresión de *OsIRO2* está sujeta al control de *OsIDEF1* (específico de plantas gramíneas), que se ha postulado que actúa como sensor de Fe. Usando la proteína recombinante *OsIDEF1* en experimentos *in vitro*, Kobayashi *et al.* (2012) demostraron que el Fe⁺² y otros metales divalentes, incluyendo Cu⁺², se unen a *OsIDEF1* a través de las repeticiones de histidina-asparagina y regiones ricas en prolina. Basándonos en su capacidad de unir metales en proporción a su abundancia relativa en las células, se podría proponer que el Cu⁺² competiría con el Fe⁺² por los dominios de unión de metales de *OsIDEF1* y ejercer así el efecto observado. De acuerdo con esto, se ha propuesto que *OsIDEF1* es capaz de percibir el balance nutricional de los diferentes metales en el medio, detectando la relación

de Fe frente a otros metales, en lugar de percibir la concentración absoluta de Fe (Kobayashi *et al.*, 2012). Así, el exceso de Cu podría afectar al menos a algunas de las respuestas de deficiencia de Fe, tales como las que conducen al aumento de la expresión de *OsIRO2* y a sus dianas aguas abajo.

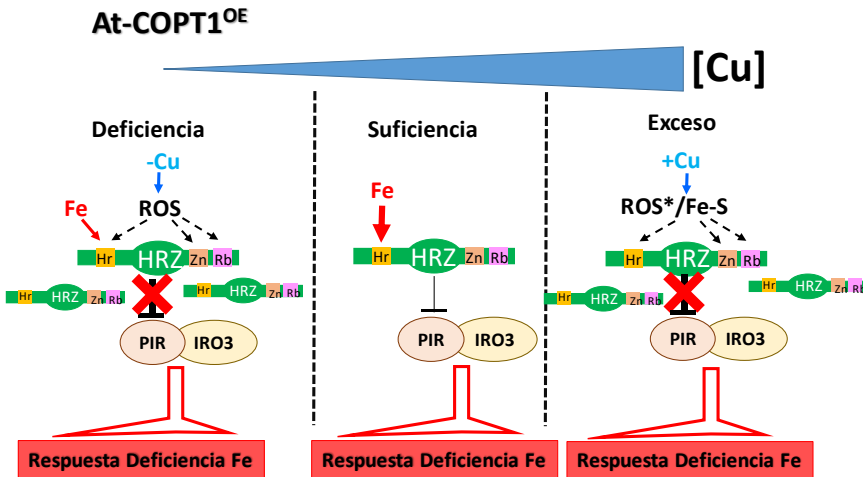


Figura D3. 1. Esquema representativo del efecto del cobre en la respuesta del sensor HRZ en plantas At-C1^{OE}. Diferentes respuestas llevadas a cabo por el sensor HRZ en función del Cu presente en el medio en las plantas sobreexpresoras del transportador At-COPT1. En deficiencia de Cu, la entrada de Cu a través del transportador porcaría una serie de ROS que se uniría a los dominios Hemeretrina (Hr), dedos de Zn (Zn) o rubredoxina (Rb) y como consecuencia haría que HRZ no desestabilizaría la unión PIR-IRO3 y por tanto estos seguirían inactivando la expresión de genes de respuesta a deficiencia de Fe. En condiciones de suficiencia de Cu, el Fe presente se uniría al dominio Hr, produciendo una pequeña desestabilización de PIR-IRO3 y por tanto activando la expresión de sus dianas. Por último, en condiciones de exceso de Cu, se producirían una serie de ROS*, diferentes a los de deficiencia, o se afectarían los centros Fe-S, produciendo un efecto similar al de deficiencia de Cu, no desestabilizando PIR-IOR3 y por tanto reprimiéndose los genes de respuesta a deficiencia de Fe.

Los supuestos sensores del estado redox y de Fe, *OsHRZ1* y *OsHRZ2* (homólogos a BTS en Arabidopsis) actúan como reguladores negativos de la homeostasis del Fe (Kobayashi *et al.*, 2013). La expresión de *OsHRZ1* y de *OsHRZ2*

podría verse afectada por los efectos de la absorción de Cu^+ , ya que aumentó en las plantas C1^{OE} (Figura R3.9), pero en exceso de Cu en el medio, al igual que ocurre en *Arabidopsis* (Figura. R3.4, R2.24, D3.1). El desajuste en la entrada de Cu^+ y el subsecuente estrés oxidativo podrían afectar a estos sensores BTS/HRZ como se ha explicado en la discusión del capítulo 2.

Las concentraciones de Cu y de Fe en los diferentes órganos de la planta son probablemente el resultado de múltiples procesos en los que ambos metales se enfrentan a interacciones diversas y complejas en su camino desde la fuente hacia los órganos del sumidero, incluyendo las semillas. El NA funciona como quelante en el transporte de metales en la vía del floema para la translocación del Fe hacia los órganos sumidero (Tsukamoto *et al.*, 2009). Como los complejos Cu^{+2} -NA son muy estables (von Wirén *et al.*, 1999), el aumento de la expresión de *OsNAS1*, *OsNAS2* y *OsNAAT1* en exceso de Cu (Figuras R3.3 y R3.4) podría reflejar no solo el aumento del contenido de Cu, sino también podría afectar a la movilización de Fe y a su acumulación en los órganos sumidero. Dado que el contenido de Fe aumentó en las hojas jóvenes de las plantas adultas sobreexpresoras de AtCOPT1 (Figura R3.13) y basándonos en la menor concentración de Fe en las raíces en deficiencia de Cu (Figura R3.8), se podría proponer que la señalización de deficiencia de Fe podría resultar en un aumento de la movilización de Fe a los órganos sumidero. Curiosamente, los contenidos de Fe en granos pulidos y sin pulir de las plantas C1^{OE} de arroz aumentaron un 60 y un 30 %, respectivamente (Figura. R3.15). Además, las plantas C1^{OE} eran similares a las WT en términos de rendimiento agronómico cuando se cultivaron en las condiciones habituales de invernadero (Figura R.12). Sin embargo, los 8 μg de Fe / g DW aproximados obtenidos mediante este enfoque (Figura R3.15) son menores que los contenidos obtenidos por otras estrategias biotecnológicas que van desde 10 a 19 μg de Fe / g DW (Johnson *et al.*, 2011; Oliva *et al.*, 2014; Boonyaves *et al.*, 2016; Trijatmiko *et al.*, 2016). Tomados en conjunto, estos resultados indican que tanto la deficiencia de Cu como el exceso de Cu pueden interferir con la percepción de Fe y su movilización en el arroz. La comprensión de estas interacciones podría ser útil

Discusión Capítulo 3

para diseñar enfoques biotecnológicos encaminados a mejorar el contenido nutricional de Fe de las partes comestibles de los cultivos.

DISCUSIÓN GENERAL

Los resultados obtenidos en este trabajo ponen en evidencia que las homeostasis del Cu y del Fe se encuentran estrechamente relacionadas en diferentes organismos, ya que la alteración de la entrada del Cu afecta a la expresión de genes de la homeostasis del Fe, produciendo cambios que modifican el contenido celular interno del metal. Si comparamos las consecuencias de la alteración de la entrada de Cu en la levadura *S. cerevisiae* CTR1Δ300 (Capítulo 1) con las observadas en la planta *A. thaliana* C1^{OE} (Capítulo 2), en relación con los respectivos silvestres, podemos extraer las similitudes y diferencias entre ambos sistemas (Tabla DG.1).

Tabla DG.1. Comparación de los cambios observados por la sobreexpresión del transportador de Cu de alta afinidad tipo Ctr entre *S. cerevisiae* y *A. thaliana*. ↑ indica que hay un aumento en *CTR1Δ300/C1^{OE}* respecto a los WT, ↓ indica que hay una disminución en *CTR1Δ300/C1^{OE}* respecto a los WT.

Parámetro	<i>S. cerevisiae</i> CTR1Δ300	<i>A. thaliana</i> C1^{OE}
Contenido Cu	↑	↑
Contenido Fe	↑	↓
Expresión Cth2	↑ en +Cu	↑ en +Cu
Dianas de Cth2	Represor	Activador (?)
Expresión Centros Fe-S	↓	↓
Consumo O ₂	↓ en +Cu	↓ en +Cu

Las similitudes entre los cambios observados ponen en evidencia que en ambos organismos la desregulación del transportador de alta afinidad de Cu tipo Ctr provoca que el contenido de Cu interno sea mayor. Esta entrada induce cambios de expresión de genes relacionados con la homeostasis del Fe, como son los genes que codifican proteínas con centros Fe-S. Por consiguiente, dicha alteración de la expresión inhibe el consumo de O₂, posiblemente debido a que la cadena de transporte de electrones de las mitocondrias no funciona adecuadamente.

Discusión General

Sin embargo, aunque la expresión del factor de respuesta a deficiencia de Fe, Cth2, aumenta en ambos casos cuando hay exceso de Cu en el medio, la regulación de sus dianas es diferente. Mientras que en levadura la acción de Cth2 media la degradación de sus dianas (Puig *et al.*, 2005), los datos preliminares en *Arabidopsis* indican que la función sería como activador de la expresión de sus posibles dianas (Figura R2.5). En ambos casos, los resultados sugieren que la alteración de los genes de la homeostasis del Fe y con centros Fe-S no depende directamente de Cth2 (Figura R1.12, R2.9 y R2.10). Además, los datos del contenido de Fe, ponen de manifiesto que la regulación de la homeostasis del Fe en ambos sistemas es aparentemente opuesta. En levadura, la alteración en la entrada de Cu⁺ provoca un aumento del contenido de Fe endógeno, mientras que en *Arabidopsis* se altera la expresión de genes clave de la homeostasis que finalmente conducen a una disminución del contenido de Fe.

Por otro lado, la comparación de los resultados obtenidos tras la alteración en la entrada de Cu⁺ entre las plantas *A. thaliana* y *O. sativa*, demuestra que en ambas el contenido en Cu aumenta al sobreexpresar C1^{OE}. Sin embargo, el contenido de Fe en *Arabidopsis* es menor en todas las condiciones de crecimiento, mientras que en *Oryza* sólo se altera en las raíces, en condiciones de exceso de Cu en el medio de crecimiento (Tabla DG.2). Ambas plantas presentan una disminución en la longitud de las raíces en medios con exceso de Cu.

Tabla DG.2. Comparación de las características observadas en las plantas de *A. thaliana* y *O. sativa* al sobreexpresar el transportador de Cu COPT1.

Parámetros	<i>A. thaliana</i> C1^{OE}	<i>O. sativa</i> At-C1^{OE}
Contenido Cu	↑	↑ parte aérea
Contenido Fe	↓	↓raíz
Longitud de la raíz	↓ en +Cu	↓ en +Cu

En cuanto al análisis de la expresión de los genes de respuesta a deficiencia de Fe, cabe destacar que los factores considerados activadores de la respuesta a

deficiencia de Fe (*bHLH Ib/ IRO2*) se activan por el exceso de Cu presente en el medio en las plantas silvestres (Tablas DG.3). Las dianas de dichos factores también aumentan su expresión por exceso de Cu, excepto el transportador *IRT1* en *Arabidopsis*.

Tabla DG. 3. Comparación de la expresión de los genes reguladores de respuesta a deficiencia de hierro y sus dianas en las plantas de *A. thaliana* y *O. sativa* en respuesta a los niveles de Cu del medio. Con flechas se indica la tendencia de la condición de exceso, respecto a la deficiencia de Cu. ↑ indica aumento, ↓ indica disminución, = indica que la expresión no muestra diferencias en los diferentes medios.

-Cu +Cu			
<i>A. thaliana</i>		<i>O. sativa</i>	
Regulador	Dianas	Regulador	Dianas
<i>FIT</i> =	<i>IRT1</i> ↓		<i>NAS1</i> ↑
<i>bHLH Ib</i> ↑	<i>FRO2</i> ↑	<i>IRO2</i> ↑	<i>NAS2</i> ↑
			<i>NAAT1</i> ↑
<i>BTS</i> ↑	<i>At-NEET</i> ↓	<i>HRZ1</i> ↑	<i>OsCDSGH</i> ↓
		<i>HRZ2</i> ↓	<i>FER</i> ↓
			<i>Fd</i> ↓

La expresión de los sensores de deficiencia de Fe de tipo E3 ligasas con dominios hemeritina, *BTS/HRZ1*, aumenta también (Figura R2.25 y R3.5). *BTS/HRZ1* regulan de forma negativa, mediante ubiquitinación y la correspondiente degradación, a factores de transcripción que, a su vez, tienen como dianas a los genes de la homeostasis del Fe (Kobayashi *et al.*, 2019). En este sentido, el aumento de la expresión de los sensores, en todo caso, debería producir una disminución de la expresión de los genes aguas abajo. Sin embargo, se observa el efecto contrario y, por lo tanto, para explicar el resultado obtenido cabe sugerir que la entrada de Cu altera la percepción del contenido de Fe, probablemente a través de la modificación de la función de las proteínas sensoras *BTS/HRZ1*, impidiendo la correcta respuesta a la deficiencia de Fe.

Discusión General

Cuando se altera la entrada de Cu sobreexpresando constitutivamente el transportador de alta afinidad COPT1 en *Arabidopsis*, además de incrementar la entrada de Cu⁺, se desregula la adecuación espacio-temporal en la entrada del metal (Andrés-Colás et al., 2010). Al estudiar la expresión de los mismos genes anteriores en estas plantas, se observa el mismo efecto en las dianas de la homeostasis del Fe, disminuyendo la expresión de *At-NEET*, mientras que en arroz estas dianas aumentan la expresión, al contrario de lo que pasaba en las plantas silvestres. Estos datos indican, que la entrada de Cu no es el único factor que afecta a la expresión de los genes de respuesta a deficiencia de Fe, sino que posiblemente la modificación espacio-temporal de la entrada también sea clave en dicha alteración (Andrés-Colás et al., 2010; Perea-García et al., 2016).

El análisis de la expresión de los genes que se encuentran alterados facilita la comprensión de los efectos fisiológicos que se observan en ambos organismos. En *Arabidopsis*, los genes que se encuentran alterados son el transportador *IRT1* y *At-NEET*. Por lo tanto, la planta no es capaz de introducir el Fe presente en el medio, lo que explicaría el menor contenido de Fe observado en estas plantas. En *Oryza*, se encuentran inducidos los genes de proteínas que participan en la asimilación y almacenaje, produciendo un mayor aumento del contenido de Fe en las semillas, posiblemente ayudado por un aumento en el transporte de Fe a larga distancia (Tabla DG3 y DG.4).

Tabla DG.4. Resumen de la expresión de los genes reguladores y de sus dianas en plantas de *A. thaliana* y *O. sativa* sobreexpresoras de *COPT1*. Los datos se muestran en dos condiciones de crecimiento en deficiencia de Cu y exceso de Cu en el medio de crecimiento. Los genes reguladores activadores de la respuesta a deficiencia de Fe, y sus respectivas dianas, se encuentran subrayados. ↑ indica aumento, ↓ indica disminución, ⇒↓ indica ligeramente menor, = indica que la expresión no muestra diferencias significativas con respecto al WT.

Deficiencia de Cu		Exceso de Cu	
<u><i>A. thaliana</i></u>	<u><i>O. sativa</i></u>	<u><i>A. thaliana</i></u>	<u><i>O. sativa</i></u>
Reguladores		Reguladores	

<i>FIT</i> ↓		<i>FIT</i> ⇒ ↓	
<i>bHLH Ib</i> ↓	<i>IRO2</i> =	<i>bHLH Ib</i> ↑	<i>IRO2</i> ↑
<i>BTS</i> ↑	<i>HRZ1</i> ↑	<i>BTS</i> ↑	<i>HRZ1</i> ↑
	<i>HRZ2</i> ↑		<i>HRZ2</i> ↑
Dianas		Dianas	
<i>IRT</i> ⇒ ↓	<i>NAS1</i> ---	<i>IRT</i> ⇒ ↓	<i>NAS1</i> ---
<i>FRO2</i> ↓	<i>NAS2</i> ---	<i>FRO2</i> ↓	<i>NAS2</i> ---
	<i>NAAT1</i> ---		<i>NAAT1</i> ---
<i>At-NEET</i> ↓	<i>OsCDSGH</i> ↑	<i>At-NEET</i> ↓	<i>OsCDSGH</i> = <i>FER</i> ↑
	<i>FER</i> ↑		<i>FER</i> ↑
	<i>Fd</i> ↑		<i>Fd</i> ↑

La falta de respuesta a la deficiencia de Fe observada en *Arabidopsis* corrobora que FIT es el regulador principal de dicha respuesta (Colangelo y Guerinot, 2004), ya que sin su activación, la incorporación de Fe no puede aumentar, independientemente de la activación de otros factores bHLH. En arroz, a pesar de que no hemos estudiado la expresión de los genes regulados por IRO2, se observa un menor contenido de Fe en las raíces. Esto indica que la incorporación podría estar alterada. Sin embargo, sí hemos observado el aumento de la expresión de que los genes de proteínas de almacenaje (*FER* y *Fd*), lo que concuerda con un mayor contenido de Fe en órganos sumidero como hojas jóvenes y semillas.

Finalmente, los componentes de la homeostasis de metales tales como: reductasas, transportadores de influjo y eflujo, carabinas, quelantes y ligandos movilizadores y metaloproteínas, están básicamente conservados entre organismos eucariotas, desde levaduras a plantas superiores (Rutherford y Bird, 2004; Peñarrubia *et al.*, 2015). Sin embargo, la regulación de la expresión génica de estos componentes, así como los sensores metálicos, no están conservados, detectándose diferencias notables incluso entre plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas (Kobayashi *et al.*, 2019; Kobayashi, 2019; Rodríguez-Celma *et al.*,

Discusión General

2019). En ese sentido, este trabajo pone de manifiesto la importancia de conocer los mecanismos sensores de metales y cómo les afectan las diferentes combinaciones en los niveles de metales en el medio de crecimiento. Asimismo el estrés oxidativo provocado por la entrada de los metales, también podría desempeñar un papel clave en la función de dichos mecanismos sensores, tanto en plantas superiores, como en organismos de interés biotecnológico, como la levadura. Este conocimiento podría ayudar a pronosticar y recomendar las combinaciones adecuadas de contenido de metales en los diferentes medios y suelos cultivados para optimizar el crecimiento y el contenido nutricional de la levadura y las plantas de interés agronómico.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este trabajo han llevado a la obtención de las siguientes conclusiones:

- La eliminación del extremo carboxilo-terminal de la proteína CTR1 de levadura en la cepa *CTR1Δ300* provoca un aumento en la entrada de Cu con respecto a la cepa silvestre. El efecto tóxico producido por el Cu disminuye la viabilidad celular.
- El incremento en la entrada de Cu en la cepa *CTR1Δ300* induce la expresión de genes de metalotioneínas de detoxificación del metal (*CR55* y *CUP1*), así como de genes del regulón de Fe.
- El aumento en la entrada de Cu en la cepa *CTR1Δ300* inhibe la expresión de los genes que codifican proteínas con centros Fe-S, lo que provoca una disminución en el consumo de oxígeno y la dificultad de la cepa *CTR1Δ300* para crecer en medios donde las células se fuerzan a respirar. Sin embargo, esta regulación no depende del factor Cth2.
- El estudio por triple híbrido en levadura corrobora la unión de la proteína de *Arabidopsis* AtCth2 a los mRNAs con secuencias ARE.
- Aunque el estudio *in silico* de las posibles dianas de AtCth2 señala como candidatos a genes de proteínas con centros Fe-S, la expresión en plantas con niveles alterados de *AtCTH2* de las posibles dianas no concuerda con la función de AtCth2 como represor, sino que sugiere una posible función indirecta o de activación.
- Las plántulas de *Arabidopsis* sobreexpresoras del transportador de Cu de alta afinidad *COPT1* presentan un contenido de Fe menor que los controles.
- Las plantas C1^{OE} no inducen la expresión de los genes de incorporación de Fe, *IRT1* y *FRO2*, en condiciones de exceso de Cu en el medio, ni la secreción de cumarinas al medio para aumentar la solubilidad del Fe.
- Aunque los factores de transcripción bHLH Ib aumentan su expresión en las plantas C1^{OE}, la falta de activación de la expresión del factor *FIT* podría ser la clave para que no se produzca la respuesta a la deficiencia de Fe.

Conclusiones

- La inhibición de la expresión de genes de almacenamiento y translocación de Fe como *FER1* y *At-NEET* sugiere que la percepción de Fe por sensores como BTS podría estar alterada en las plantas *CI^{OE}* como consecuencia directa o indirecta del aumento de Cu⁺.
- El cultivo de *Oryza sativa* en medios con Cu afecta al crecimiento de la raíz. La expresión de genes como el transportador de Cu de alta afinidad *OsCOPT1* o la metalotioneína *OsMT1f* son marcadores del estado del Cu dentro de las células e indican que 50 μM de Cu en el medio supone un exceso de metal.
- El análisis de expresión global en *Oryza sativa* ha permitido identificar que el exceso de Cu provoca cambios de expresión en varios genes de la homeostasis del Fe, entre ellos genes de almacenamiento (*OsFER2* y *OsFd1*), movilización (*OsNAS1*, *OsNAS2*, *OsNAAT1*, *OsCDGSH*), así como reguladores de la respuesta a deficiencia de Fe (*OsIRO2*).
- La sobreexpresión del transportador de Cu de alta afinidad de *Arabidopsis* *AtCOPT1* en arroz provoca un aumento de la entrada de Cu, la represión de la expresión del transportador endógeno *OsCOPT1* y la activación de genes de detoxificación como *OsMT1f*. Las alteraciones en los sensores *OsIRO2*, *OsHRZ1* y *OsHRZ2* se traducen en un menor contenido de Fe en las raíces, pero también en una mayor movilización del mismo hacia las hojas jóvenes y las semillas, hecho que podría tener aplicaciones biotecnológicas.

BIBLIOGRAFÍA

- Abdel-Ghany SE, Burkhead JL, Gogolin KA, Andrés-Colás N, Bodecker JR, Puig S, Peñarrubia L, Pilon M** (2005a) AtCCS is a functional homolog of the yeast copper chaperone Ccs1/Lys7. *FEBS Lett* **579**: 2307-2312
- Abdel-Ghany SE, Müller-Moulé P, Niyogi KK, Pilon M, Shikanai T** (2005b) Two P-Type ATPases are required for copper delivery in *Arabidopsis thaliana* chloroplasts. *Plant Cell* **17**: 1233-1251
- Abdel-Ghany SE, Pilon M** (2008) MicroRNA-mediated systemic down-regulation of copper protein expression in response to low copper availability in *Arabidopsis*. *J Biol Chem* **283**: 15932-15945
- Alloway BJ** (1995) Heavy metals in soils, 2.^a ed. Springer. Países Bajos
- Andrés-Colás N, Carrió-Seguí A, Abdel-Ghany SE, Pilon M, Peñarrubia L** (2018) Expression of the intracellular COPT3-mediated Cu transport is temporally regulated by the TCP16 transcription factor. *Front Plant Sci* **9**: 1-16
- Andrés-Colás N, Perea-García A, Mayo de Andrés S, García-Molina A, Dorcey E, Rodríguez-Navarro S, Pérez-Amador MA, Puig S, Peñarrubia L, Mayo de Andrés S, y otros** (2013) Comparison of global responses to mild deficiency and excess copper levels in *Arabidopsis* seedlings. *Metallomics* **5**: 1234-1246
- Andrés-Colás N, Perea-García A, Puig S, Peñarrubia L** (2010) Dereglated copper transport affects *Arabidopsis* development especially in the absence of environmental cycles. *Plant Physiol* **153**: 170-184
- Andrés-Colás N, Sancenón V, Rodríguez-Navarro S, Mayo S, Thiele DJ, Ecker JR, Puig S, Peñarrubia L** (2006) The *Arabidopsis* heavy metal P-type ATPase HMA5 interacts with metallochaperones and functions in copper detoxification of roots. *Plant J* **45**: 225-236
- Andrés F, Galbraith DW, Talón M, Domingo C** (2009) Analysis of PHOTOPERIOD SENSITIVITY5 sheds light on the role of phytochromes in photoperiodic flowering in rice. *Plant Physiol* **151**: 681-690
- Babar Ali M, McNear DH** (2014) Induced transcriptional profiling of phenylpropanoid pathway genes increased flavonoid and lignin content in *Arabidopsis* leaves in response to microbial products. *BMC Plant Biol* **14**: 1-14
- Balandin T, Castresana C** (2002) AtCOX17, an *Arabidopsis* homolog of the yeast copper

- chaperone COX17. *Plant Physiol* **129**: 1852-1857
- Benjamini Y, Hochberg Y** (1995) Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J R Stat Soc Ser B* **57**: 289-300
- Bernal M, Casero D, Singh V, Wilson GT, Grande A, Yang H, Dodani SC, Pellegrini M, Huijser P, Connolly EL, y otros** (2012) Transcriptome sequencing identifies SPL7-regulated copper acquisition genes FRO4/FRO5 and the copper dependence of iron homeostasis in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **24**: 738-761
- Beutler E, Hoffbrand AV, Cook JD** (2003) Iron deficiency and overload. *Hematology Am Soc Hematol* **1**: 40-61
- Bogamuwa S, Jang JC** (2013) The *Arabidopsis* tandem CCCH zinc finger proteins AtTZF4, 5 and 6 are involved in light-, abscisic acid- and gibberellic acid-mediated regulation of seed germination. *Plant, Cell Environ* **36**: 1507-1519
- Boonyaves K, Gruissem W, Bhullar NK** (2016) NOD promoter-controlled AtIRT1 expression functions synergistically with NAS and FERRITIN genes to increase iron in rice grains. *Plant Mol Biol* **90**: 207-215
- Briat JF, Ravet K, Arnaud N, Duc C, Boucherez J, Touraine B, Cellier F, Gaymard F** (2010) New insights into ferritin synthesis and function highlight a link between iron homeostasis and oxidative stress in plants. *Ann Bot* **105**: 811-822
- Bruska MK, Stiebritz MT, Reiher M** (2015) Binding of reactive oxygen species at Fe- S cubane clusters. *Chem A Eur J* **21**: 19081-19089
- Burkhead JL, Gogolin Reynolds KA, Abdel-Ghany SE, Cohu CM, Pilon M** (2009) Copper homeostasis. *New Phytol* **182**: 799-816
- Carrió-Seguí À, Romero P, Curie C, Mari S, Peñarrubia L** (2019) Copper transporter COPT5 participates in the crosstalk between vacuolar copper and iron pools mobilisation. *Sci Rep* **9**: 1-14
- Castillon A, Shen H, Huq E** (2007) Phytochrome interacting factors: central players in phytochrome-mediated light signaling networks. *Trends Plant Sci* **12**: 514-521
- Chai G, Kong Y, Zhu M, Yu L, Qi G, Tang X, Wang Z, Cao Y, Yu C, Zhou G** (2015) *Arabidopsis* C3H14 and C3H15 have overlapping roles in the regulation of secondary wall thickening and anther development. *J Exp Bot* **66**: 2595-2609

- Chen Y-Y, Wang Y, Shin L-J, Wu J-F, Shanmugam V, Tsednee M, Lo J-C, Chen C-C, Wu S-H, Yeh K-C** (2013) Iron is involved in the maintenance of circadian period length in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **161**: 1409-1420
- Cheng L, Wang F, Shou H, Huang F, Zheng L, He F, Li J, Zhao FJ, Ueno D, Ma JF** (2007) Mutation in nicotianamine aminotransferase stimulated the Fe(II) acquisition system and led to iron accumulation in rice. *Plant Physiol* **145**: 1647-1657
- Colangelo EP, Guerinot ML** (2004) The essential basic helix-loop-helix protein FIT1 is required for the iron deficiency response. *Plant Cell* **16**: 3400-3412
- Crichton RR, Pierre JL** (2001) Old iron, young copper : from mars to venus. *Biometals* **14**: 99-112
- Crouch PJ, White AR, Bush AI** (2007) The modulation of metal bio-availability as a therapeutic strategy for the treatment of Alzheimer's disease. *FEBS J* **274**: 3775-3783
- Culotta VC, Klomp LWJ, Strain J, Casareno RLB, Krems B, Gitlin JD** (1997) The copper chaperone for superoxide dismutase. *J Biol Chem* **272**: 469-23473
- Curie C, Cassin G, Couch D, Divol F, Higuchi K, Le Jean M, Misson J, Schikora A, Czernic P, Mari S** (2009) Metal movement within the plant: contribution of nicotianamine and yellow stripe 1-like transporters. *Ann Bot* **103**: 1-11
- Dancis A, Yuan DS, Haile D, Askwith C, Eide D, Moehle C, Kaplan J, Klausner RD** (1994) Molecular characterization of a copper transport protein in *S. cerevisiae*: an unexpected role for copper in iron transport. *Cell* **76**: 393-402
- Darbani B, Briat JF, Holm PB, Husted S, Noeparvar S, Borg S** (2013) Dissecting plant iron homeostasis under short and long-term iron fluctuations. *Biotechnol Adv* **31**: 1292-1307
- Deng F, Yamaji N, Xia J, Ma JF** (2013) A member of the heavy metal P-type ATPase OshMA5 is involved in xylem loading of copper in rice. *Plant Physiol* **163**: 1353-1362
- Dong J, Kim ST, Lord EM** (2005) Plantacyanin plays a role in reproduction in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **138**: 778-789
- Duy D, Wanner G, Meda AR, von Wiren N, Soll J, Philippar K** (2007) PIC1, an ancient permease in *Arabidopsis* chloroplasts, mediates iron transport. *Plant Cell* **19**: 986-1006
- Figuroa P, León G, Elorza A, Holuigue L, Jordana X** (2001) Three different genes

encode the iron-sulfur subunit of succinate dehydrogenase in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol* **46**: 241-250

La Fontaine S, Quinn JM, Nakamoto SS, Page MD, Göhre V, Moseley JL, Kropat J, Merchant S (2002) Copper-dependent iron assimilation pathway in the model photosynthetic eukaryote *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eukaryot Cell* **1**: 736-757

Foster AW, Dainty SJ, Patterson CJ, Pohl E, Blackburn H, Wilson C, Hess CR, Rutherford JC, Quaranta L, Corran A, y otros (2014) A chemical potentiator of copper-accumulation used to investigate the iron-regulons of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* **93**: 317-330

Gamsjaeger R, Liew CK, Loughlin FE, Crossley M, Mackay JP (2007) Sticky fingers: zinc-fingers as protein-recognition motifs. *Trends Biochem Sci* **32**: 63-70

García-Molina A, Andrés-Colás N, Perea-García A, Neumann U, Dodani SC, Huijser P, Peñarrubia L, Puig S (2013) The *Arabidopsis* COPT6 transport protein functions in copper distribution under copper-deficient conditions. *Plant Cell Physiol* **54**: 1378-1390

García-Molina A, Andrés-Colás N, Perea-García A, Del Valle-Tascón S, Peñarrubia L, Puig S (2011) The intracellular *Arabidopsis* COPT5 transport protein is required for photosynthetic electron transport under severe copper deficiency. *Plant J* **65**: 848-860

Gaspar-Cordeiro A, Marques Caetano S, Amaral C, Rodrigues-Pousada C, Pimentel C (2018) Ace1 prevents intracellular copper accumulation by regulating Fet3 expression and thereby restricting Aft1 activity. *FEBS J* **285**: 1861-1872

Georgatsou E, Mavrogiannis LA, Fragiadakis GS, Alexandraki D, Embo S (1997) The yeast Fre1p / Fre2p cupric reductases facilitate copper uptake and are regulated by the copper-modulated Mac1p activator. *J Biol Chem* **272**: 13786-13792

Gietz RD, Woods RA (2006) Yeast transformation by the LiAc/SS carrier DNA/PEG method. *Methods Mol Biol* **313**. Humana Press, Totowa, NJ.

Gleason C, Huang S, Thatcher LF, Foley RC, Anderson CR, Carroll AJ, Millar AH, Singh KB (2011) Mitochondrial complex II has a key role in mitochondrial-derived reactive oxygen species influence on plant stress gene regulation and defense. *Proc Natl Acad Sci USA* **108**: 10768-10773

Glerum DM, Shtanko A, Tzagoloff A (1996) Characterization of COX17, a yeast gene

- involved in copper metabolism and assembly of cytochrome oxidase. *J Biol Chem* **271**: 14504-14509
- Graden JA, Winge DR** (1997) Copper-mediated repression of the activation domain in the yeast Mac1p transcription factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 5550-5555
- Gralla EB, Thielett DJ, Silart P, Valentine S** (1991) ACE1, a copper-dependent transcription factor, activates expression of the yeast copper, zinc superoxide dismutase gene. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 8558-8562
- Grillet L, Lan P, Li W, Mokkalapati G, Schmidt W** (2018) IRON MAN is a ubiquitous family of peptides that control iron transport in plants. *Nat Plants* **4**: 953–963
- Grillet L, Mari S, Schmidt W, Sperotto RA, Kobayashi T, Higuchi K** (2014a) Iron in seeds: loading pathways and subcellular localization. *Front Plant Sci* **4**. doi: 10.3389/fpls.2013.00535
- Grillet L, Ouerdane L, Flis P, Hoang MTT, Isaure MP, Lobinski R, Curie C, Mari S** (2014b) Ascorbate efflux as a new strategy for iron reduction and transport in plants. *J Biol Chem* **289**: 2515-2525
- Gross C, Kelleher M, Iyer VR, Brown PO, Winge DR** (2000) Identification of the copper regulon in *Saccharomyces cerevisiae* by DNA microarrays. *J Biol Chem* **275**: 32310-32316
- Gulec S, Collins JF** (2014) Molecular mediators governing iron-copper interactions. *Annu Rev Nutr* **34**: 95-116
- Halliwell B, Gutteridge JM** (1984) Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem J* **219**: 1-14
- Hassett R, Dix DR, Eide DJ, Kosman DJ** (2000) The Fe(III) permease Fet4p functions as a low affinity copper transporter and supports normal copper trafficking in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cultures* **484**: 477-484
- Hassinen VH, Tervahauta AI, Schat H, Kärenlampi SO** (2011) Plant metallothioneins: metal chelators with ROS scavenging activity? *Plant Biol* **13**: 225-232
- Hermans C, Vuylsteke M, Coppens F, Craciun A, Inzé D, Verbruggen N** (2010) Early transcriptomic changes induced by magnesium deficiency in *Arabidopsis thaliana* reveal the alteration of circadian clock gene expression in roots and the triggering of abscisic acid-responsive genes. *New Phytol* **187**: 119-131

- Hiei Y, Ohta S, Komari T, Kumashiro T** (1994) Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. *Plant J* **6**: 271-282
- Hirayama T, Kieber JJ, Hirayama N, Kogan M, Guzman P, Nourizadeh S, Alonso JM, Dailey WP, Dancis A, Ecker JR** (1999) RESPONSIVE-TO-ANTAGONIST1, a Menkes/Wilson disease-related copper transporter, is required for ethylene signaling in *Arabidopsis*. *Cell* **97**: 383-393
- Hirayama T, Lei GJ, Yamaji N, Nakagawa N, Ma JF** (2018) The putative peptide gene FEP1 regulates iron deficiency response in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol* **59**: 1739-1752
- Hong S, Kim SA, Guerinot ML, McClung CR** (2013) Reciprocal interaction of the circadian clock with the iron homeostasis network in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **161**: 893-903
- Hua Z, Vierstra RD** (2011) The cullin-RING ubiquitin-protein ligases. *Annu Rev Plant Biol* **62**: 299-334
- Inupakutika MA, Sengupta S, Nechushtai R, Jennings PA, Onuchic JN, Azad RK, Padilla P, Mittler R** (2017) Phylogenetic analysis of eukaryotic NEET proteins uncovers a link between a key gene duplication event and the evolution of vertebrates. *Sci Rep* **7**: 1-10
- Ishimaru Y, Masuda H, Bashir K, Inoue H, Tsukamoto T, Takahashi M, Nakanishi H, Aoki N, Hirose T, Ohsugi R, Nishizawa N K** (2010) Rice metal-nicotianamine transporter, OsYSL2, is required for the long-distance transport of iron and manganese. *Plant J* **62**: 379-390
- Ishimaru Y, Suzuki M, Tsukamoto T, Suzuki K, Nakazono M, Kobayashi T, Wada Y, Watanabe S, Matsuhashi S, Takahashi M, Nakanishi H, Mori S, Nishizawa N K** (2006) Rice plants take up iron as an Fe³⁺-phytosiderophore and as Fe²⁺. *Plant J* **45**: 335-346
- Jang JC** (2016) Arginine-rich motif-tandem CCCH zinc finger proteins in plant stress responses and post-transcriptional regulation of gene expression. *Plant Sci* **252**: 118-124
- Jensen LT, Posewitz MC, Srinivasan C, Winge DR** (1998) Mapping of the DNA binding domain of the copper-responsive transcription factor Mac1 from *Saccharomyces*

- cerevisiae*. J Biol Chem **273**: 23805-23811
- Jeong J, Guerinot M Lou** (2009) Homing in on iron homeostasis in plants. Trends Plant Sci **14**: 280-285
- Jeong J, Merkovich A, Clyne M, Connolly EL** (2017) Directing iron transport in dicots: regulation of iron acquisition and translocation. Curr Opin Plant Biol **39**: 106-113
- Johnson AAT, Kyriacou B, Callahan DL, Carruthers L, Stangoulis J, Lombi E, Tester M** (2011) Constitutive overexpression of the OsNAS gene family reveals single-gene strategies for effective iron- and zinc-biofortification of rice endosperm. PLoS One **6**: e24476
- Jones S** (2004) An overview of the basic helix-loop-helix proteins. Genome Biol **5**: 1-6
- Joshi A, Serpe M, Kosman DJ** (1999) Evidence for (Mac1p)₂-DNA ternary complex formation in Mac1p-dependent transactivation at the CTR1 promoter. J Biol Chem **274**: 218-226
- Jung H II, Gayomba SR, Rutzke MA, Craft E, Kochian L V, Vatamaniuk OK** (2012) COPT6 is a plasma membrane transporter that functions in copper homeostasis in *Arabidopsis* and is a novel target of SQUAMOSA promoter-binding protein-like 7. J Biol Chem **287**: 33252-33267
- Jungmann J, Reins HA, Lee J, Romeo A, Hassett R, Kosman D, Jentsch S** (1993) MAC1, a nuclear regulatory protein related to Cu-dependent transcription factors is involved in Cu/Fe utilization and stress resistance in yeast. EMBO J **12**: 5051-6
- Kai K, Mizutani M, Kawamura N, Yamamoto R, Tamai M, Yamaguchi H** (2008) Scopoletin is biosynthesized via ortho -hydroxylation of feruloyl CoA by a 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase in *Arabidopsis thaliana*. Plant J **989**-999
- Kampfenkel K, Kushnir S, Babiychuk E, Inzé D, Van Montagu M** (1995) Molecular characterization of a putative *Arabidopsis thaliana* copper transporter and its yeast homologue. J Biol Chem **270**: 28479-28486
- Karmi O, Baptiste H, Luca M, Carloni P, Onuchic JN, Jennings PA, Mittler R, Nechushtai R** (2018) The unique fold and lability of the [2Fe - 2S] clusters of NEET proteins mediate their key functions in health and disease. J Biol Inorg Chem **23**: 599-612
- Klaumann S, Nickolaus SD, Fürst SH, Starck S, Schneider S, Ekkehard Neuhaus H,**

- Trentmann O** (2011) The tonoplast copper transporter COPT5 acts as an exporter and is required for interorgan allocation of copper in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytol* **192**: 393-404
- Knight SAB, Labeé S, Know LF, Kosman DJ, Thiele DJ** (1996) A widespread transposable element masks expression of a yeast copper transport gene. *Genes Dev* **10**: 1917-1929
- Kobayashi T** (2019) Understanding the complexity of iron sensing and signaling cascades in plants. *Plant Cell Physiol* **00**: 1-7
- Kobayashi T, Itai RN, Aung MS, Senoura T, Nakanishi H, Nishizawa NK** (2012) The rice transcription factor IDEF1 directly binds to iron and other divalent metals for sensing cellular iron status. *Plant J* **69**: 81-91
- Kobayashi T, Nagasaka S, Senoura T, Itai RN, Nakanishi H, Nishizawa NK** (2013) Iron-binding haemerythrin RING ubiquitin ligases regulate plant iron responses and accumulation. *Nat Commun* **4**: 2792
- Kobayashi T, Nishizawa NK** (2012) Iron uptake, translocation, and regulation in higher plants. *Annu Rev Plant Biol* **63**: 131-152
- Kobayashi T, Nishizawa NK** (2014) Iron sensors and signals in response to iron deficiency. *Plant Sci* **224**: 36-43
- Kobayashi T, Nozoye T, Nishizawa NK** (2019) Iron transport and its regulation in plants. *Free Radic Biol Med* **133**: 11-20
- Kobayashi Y, Kuroda K, Kimura K, Southron-Francis JL, Furuzawa A, Kimura K, Iuchi S, Kobayashi M, Taylor GJ, Koyama H** (2008) Amino acid polymorphisms in strictly conserved domains of a P-type ATPase HMA5 are involved in the mechanism of copper tolerance variation in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **148**: 969-980
- Labbe-Bois R** (1990) The ferrochelatase from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **265**: 7278-7283
- Labbé S, Thiele DJ** (1999) Pipes and wiring: the regulation of copper uptake and distribution in yeast. *Trends Microbiol* **7**: 500-505
- Labbé S, Zhu Z, Thiele DJ** (1997) Copper-specific transcriptional repression of yeast genes encoding critical components in the copper transport pathway. *J Biol Chem* **272**: 15951-15958

- Labeé S, Peña MMO, Fernandes AR, Thiele DJ** (1999) A copper-sensing transcription factor regulates iron uptake genes in *Schizosaccharomyces pombe*. *J Biol Chem* **274**: 36252-36260
- Lill R, Hoffmann B, Molik S, Pierik AJ, Rietzschel N, Stehling O, Uzarska MA, Webert H, Wilbrecht C, Mühlenhoff U** (2012) The role of mitochondria in cellular iron-sulfur protein biogenesis and iron metabolism. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res* **1823**: 1491-1508
- Lin S, Pufahl RA, Dancis A, Halloran TVO, Culotta VC** (1997) A role for the *Saccharomyces cerevisiae* ATX1 gene in copper trafficking and iron transport. *J Biol Chem* **272**: 9215-9220
- Ling H-Q, Koch G, Bäumllein H, Ganai MW** (1999) Map-based cloning of chloronerva, a gene involved in iron uptake of higher plants encoding nicotianamine synthase. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 7098-7103
- Ling HQ, Bauer P, Bereczky Z, Keller B, Ganai M** (2002) The tomato fer gene encoding a bHLH protein controls iron-uptake responses in roots. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**: 13938-13943
- Lippard S, Berg J** (1994) Principles of bioinorganic chemistry. University Science Books, New York, NY, USA
- Liu Z** (2003) *Arabidopsis* UVH6, a homolog of human XPD and yeast RAD3 DNA repair genes, functions in DNA repair and is essential for plant growth. *Plant Physiol* **132**: 1405-1414
- Livak KJ, Schmittgen TD** (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods* **25**: 402-408
- Long TA, Tsukagoshi H, Busch W, Lahner B, Salt DE, Benfey PN** (2010) The bHLH transcription factor POPEYE regulates response to iron deficiency in *Arabidopsis* roots. *Plant Cell Online* **22**: 2219-2236
- López-Torrejón G, Jiménez-Vicente E, Buesa JM, Hernandez JA, Verma HK, Rubio LM** (2016) Expression of a functional oxygen-labile nitrogenase component in the mitochondrial matrix of aerobically grown yeast. *Nat Commun* **7**: 1-6
- Märschner P** (2012) Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants, Third Edition.
- Massari ME, Murre C** (2000) Helix-Loop-Helix Proteins: regulators of transcription in

Eucaryotic organisms. *Mol Cell Biol* **20**: 429-440

Matthiadis A, Long TA (2016) Further insight into BRUTUS domain composition and functionality. *Plant Signal Behav* **11**: 1-6

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

Mostofa MG, Seraj Z, Fujita M (2014) Exogenous sodium nitroprusside and glutathione alleviate copper toxicity by reducing copper uptake and oxidative damage in rice (*Oryza sativa L.*) seedlings. *Protoplasma* **251**: 1373-1386

Mukherjee I, Campbell NH, Ash JS, Connolly EL (2006) Expression profiling of the *Arabidopsis* ferric chelate reductase (FRO) gene family reveals differential regulation by iron and copper. *Planta* **223**: 1178-1190

Mumberg D, Müller R, Funk M (1995) Yeast vectors for the controlled expression of heterologous proteins in different genetic backgrounds. *Gene* **156**: 119-122

Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* **15**: 493-497

Murre P, McCaw SB, Cornelis D (1989) A new DNA binding and dimerization motif in immunoglobulin enhancer binding, daughterless, MyoD, and myc proteins. *Cell* **56**: 777-783

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

Nechushtai R, Conlan AR, Harir Y, Song L, Yogev O, Eisenberg-Domovich Y, Livnah O, Michaeli D, Rosen R, Ma V, y otros (2012) Characterization of *Arabidopsis* NEET reveals an ancient role for NEET proteins in iron metabolism. *Plant Cell* **24**: 2139-2154

Nishida K, Silver PA (2012) Induction of biogenic magnetization and redox control by a component of the target of rapamycin complex 1 signaling pathway. *PLoS Biol* **10**: e1001269. doi: 10.1371/journal.pbio.1001269

Ogo Y, Itai RN, Kobayashi T, Aung MS, Nakanishi H, Nishizawa NK (2011) OsIRO2 is responsible for iron utilization in rice and improves growth and yield in calcareous soil. *Plant Mol Biol* **75**: 593-605

- Ogo Y, Itai RN, Nakanishi H, Inoue H, Kobayashi T, Suzuki M, Takahashi M, Mori S, Nishizawa NK** (2006) Isolation and characterization of IRO2, a novel iron-regulated bHLH transcription factor in graminaceous plants. *J Exp Bot* **57**: 2867-2878
- Ogo Y, Nakanishi Itai R, Nakanishi H, Kobayashi T, Takahashi M, Mori S, Nishizawa NK** (2007) The rice bHLH protein OsIRO2 is an essential regulator of the genes involved in Fe uptake under Fe-deficient conditions. *Plant J* **51**: 366-377
- Oh CK, Park SH, Kim J, Moon Y** (2016) Non-mutagenic suppression of enterocyte ferroportin 1 by chemical ribosomal inactivation via p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK)-mediated regulation evidence for environmental hemochromatosis. *J Biol Chem* **291**: 19858-19872
- Oliva N, Chadha-Mohanty P, Poletti S, Abrigo E, Atienza G, Torrizo L, Garcia R, Dueñas C, Poncio MA, Balindong J, y otros** (2014) Large-scale production and evaluation of marker-free indica rice IR64 expressing phytoferritin genes. *Mol Breed* **33**: 23-37
- Parsons TR, Strickland JDH** (1963) Discussion of spectrophotometric determination of marine-plant pigments, with revised equations for ascertaining chlorophylls and carotenoids. *Deep Sea Res Oceanogr Abstr* **21**: 155-163. doi: 10.1016/0011-7471(65)90662-5
- Peñarrubia L, Romero P, Carrió-Seguí A, Andrés-Bordería A, Moreno J, Sanz A** (2015) Temporal aspects of copper homeostasis and its crosstalk with hormones. *Front Plant Sci* **6**: 1-18
- Perea-García A** (2013) Regulación espacio-temporal de la homeostasis del cobre en *Arabidopsis thaliana*. Universitat de València
- Perea-García A, Andrés-Bordería A, Mayo de Andrés S, Sanz A, Davis AM, Davis SJ, Huijser P, Peñarrubia L** (2016) Modulation of copper deficiency responses by diurnal and circadian rhythms in *Arabidopsis thaliana*. *J Exp Bot* **67**: 391-403
- Perea-García A, García-Molina A, Andrés-Colás N, Vera-Sirera F, Pérez-Amador MA, Puig S, Peñarrubia L** (2013) *Arabidopsis* copper transport protein COPT2 participates in the cross talk between iron deficiency responses and low-phosphate signaling. *Plant Physiol* **162**: 180-194
- Petit JM, Van Wuytswinkel O, Briat JF, Lobréaux S** (2001) Characterization of an iron-

- dependent regulatory sequence involved in the transcriptional control of AtFer1 and ZmFer1 plant ferritin genes by iron. *J Biol Chem* **276**: 5584-5590
- Pfaffl MW** (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* **29**: e45. doi 10.1093/nar/29.9.e45
- Philpott CC, Protchenko O** (2008) Response to iron deprivation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell* **7**: 20-27
- Pilon M, Abdel-Ghany SE, Cohu CM, Gogolin KA, Ye H** (2006) Copper cofactor delivery in plant cells. *Curr Opin Plant Biol* **9**: 256-263
- Pilon M, Cohu CM, Ravet K, Abdel-Ghany SE, Gaymard F** (2009) Essential transition metal homeostasis in plants. *Curr Opin Plant Biol* **12**: 347-357
- Pires N, Dolan L** (2010) Origin and diversification of Basic-Helix-Loop-Helix proteins in plants. *Mol Biol Evol* **27**: 862-874
- Protchenko O, Ferea T, Rashford J, Tiedeman J, Brown PO, Botstein D, Philpott CC** (2001) Three cell wall mannoproteins facilitate the uptake of iron in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **276**: 49244-49250
- Pufahl RA, Singer CP, Peariso KL, Lin SJ, Schmidt PJ, Fahrni CJ, Culotta VC, Penner-Hahn JE, Halloran TVO** (1997) Metal ion chaperone function of the soluble Cu (I) receptor Atx1. *Science* **278**: 853-856
- Puig S, Andrés-Colás N, García-Molina A, Peñarrubia L** (2007) Copper and iron homeostasis in *Arabidopsis*: responses to metal deficiencies, interactions and biotechnological applications. *Plant Cell Environ* **30**: 271-290
- Puig S, Askeland E, Thiele DJ** (2005) Coordinated remodeling of cellular metabolism during iron deficiency through targeted mRNA degradation. *Cell* **120**: 99-110
- Puig S, Lee J, Lau M, Thiele DJ** (2002) Biochemical and genetic analyses of yeast and human high affinity copper transporters suggest a conserved mechanism for copper uptake. *J Biol Chem* **277**: 26021-26030
- Puig S, Thiele DJ** (2002) Molecular mechanisms of copper uptake and distribution. *Curr Opin Chem Biol* **6**: 171-180
- Puig S, Vergara S V., Thiele DJ** (2008) Cooperation of two mRNA-binding proteins drives metabolic adaptation to iron deficiency. *Cell Metab* **7**: 555-564

- Rajniak J, Giehl RFH, Chang E, Murgia I, Von Wirén N, Sattely ES** (2018) Biosynthesis of redox-active metabolites in response to iron deficiency in plants. *Nat Chem Biol* **14**: 442-450. doi: 10.1038/s41589-018-0019-2
- Ramos-Alonso L, Romero MA, Soler MÀ, Perea-García A, Alepuz P, Puig S, Martínez-Pastor MT** (2018) Yeast Cth2 protein represses the translation of ARE-containing mRNAs in response to iron deficiency. *PLoS Genet* **14**: 1-23
- Rampey RA, Woodward AW, Hobbs BN, Tierney MP, Lahner B, Salt DE, Bartel B** (2006) An *Arabidopsis* basic helix-loop-helix leucine zipper protein modulates metal homeostasis and auxin conjugate responsiveness. *Genetics* **174**: 1841-1857
- Ramsay NA, Glover BJ** (2005) MYB-bHLH-WD40 protein complex and the evolution of cellular diversity. *Trends Plant Sci* **10**: 63-70
- Ravet K, Pilon M** (2013) Copper and iron homeostasis in plants: the challenges of oxidative stress. *Antioxid Redox Signal* **19**: 919-932
- Reddy MCM, Majumdar S, Harris ED** (2000) Evidence for a Menkes-like protein with a nuclear targeting sequence. *Biochem J* **350**: 855-863
- Rees EM, Lee J, Thiele DJ** (2004) Mobilization of intracellular copper stores by the Ctr2 vacuolar copper transporter. *J Biol Chem* **279**: 54221-54229
- Ren F, Logeman BL, Zhang X, Liu Y, Thiele DJ, Yuan P** (2019) X-ray structures of the high-affinity copper transporter Ctr1. *Nat Commun* **10**: 1-9
- Reuscher S** (2012) Functional characterization of the *Arabidopsis thaliana* gene Cysteine Three Histidine 2. Universidad de Heidelberg, Alemania.
- Reyt G, Boudouf S, Boucherez J, Gaymard F, Briat JF** (2015) Iron- and ferritin-dependent reactive oxygen species distribution: Impact on *Arabidopsis* root system architecture. *Mol Plant* **8**: 439-453. doi: 10.1016/j.molp.2014.11.014
- Di Rienzo JA, Casanoves F, Balzarini MG, Gonzalez L, Tablada M, Robledo CW** (2018) InfoStat versión 2018. Centro de Transferencia URL, Argentina.
- Robinson KA, Lopes JM** (2000) *Saccharomyces cerevisiae* basic helix-loop-helix proteins regulate diverse biological processes. *Nucleic Acids Res* **28**: 1499-1505
- Robinson NJ, Procter CM, Connolly EL, Guerinot ML** (1999) A ferric-chelate reductase for iron uptake from soils. *Nature* **397**: 694-697

- Robinson NJ, Winge DR** (2010) Copper Metallochaperones. *Annu Rev Biochem* **79**: 537-562
- Rodrigo-Moreno A, Andrés-Colás N, Poschenrieder C, Gunsé B, Peñarrubia L, Shabala S** (2013) Calcium- and potassium-permeable plasma membrane transporters are activated by copper in *Arabidopsis* root tips: linking copper transport with cytosolic hydroxyl radical production. *Plant Cell Environ* **36**: 844-855
- Rodríguez-Celma J, Chou H, Kobayashi T, Long TA, Balk J** (2019) Hemerythrin E3 ubiquitin ligases as negative regulators of iron homeostasis in plants. *Front Plant Sci* **10**: 1-7
- Rodríguez-Celma J, Lin W-D, Fu G-M, Abadia J, Lopez-Millan A-F, Schmidt W** (2013) Mutually exclusive alterations in secondary metabolism are critical for the uptake of insoluble iron compounds by *Arabidopsis* and *Medicago truncatula*. *Plant Physiol* **162**: 1473-1485
- Ross AC, Caballero B, Cousins RJ, Tucker K, Ziegler TR** (2014) Modern nutrition in health and disease. Wolters Kluwer Health/Lippincott.
- Rutherford JC, Bird AJ** (2004) Metal-responsive transcription factors that regulate iron, zinc, and copper homeostasis in eukaryotic cells. *Eukaryot Cell* **3**: 1-13
- Ryan ED, Tracy JW, Kohlhaw GB** (1973) Subcellular localization of the leucine biosynthetic enzymes in yeast. *J Bacteriol* **116**: 222-225
- Salomé PA, Oliva M, Weigel D, Krämer U** (2013) Circadian clock adjustment to plant iron status depends on chloroplast and phytochrome function. *EMBO J* **32**: 511-23
- Sancenón V, Puig S, Mateu-Andrés I, Dorcey E, Thiele DJ, Peñarrubia L** (2004) The *Arabidopsis* copper transporter COPT1 functions in root elongation and pollen development. *J Biol Chem* **279**: 15348-15355
- Sancenón V, Puig S, Mira H, Thiele DJ, Peñarrubia L** (2003) Identification of a copper transporter family in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol* **51**: 577-587
- Santi S, Schmidt W** (2009) Dissecting iron deficiency-induced proton extrusion in *Arabidopsis* roots. *New Phytol* **183**: 1072-1084
- Sanvisens N, Bañó MC, Huang M, Puig S** (2011) Regulation of ribonucleotide reductase in response to iron deficiency. *Mol Cell* **44**: 759-769

- Sanvisens N, Puig S** (2011) Causes and consequences of nutritional iron deficiency in living organisms. Editor: Merkin TC. Biol. starvation humans other org. Nova Science Publishers, p 245-276
- Sanvisens N, Romero AM, An X, Zhang C, de Llanos R, Martinez-Pastor MT, Bano MC, Huang M, Puig S** (2014) Yeast Dun1 kinase regulates ribonucleotide reductase inhibitor Sml1 in response to iron deficiency. *Mol Cell Biol* **34**: 3259-3271
- Sato T, Chang H-C, Bayeva M, Shapiro JS, Ramos-Alonso L, Kouzu H, Jiang X, Liu T, Yar S, Sawicki KT, y otros** (2018) mRNA-binding protein Tristetraprolin is essential for cardiac response to iron deficiency by regulating mitochondrial function. *Proc Natl Acad Sci* **115**: E6291-E6300
- Schlieff ML, West T, Craig AM, Holtzman DM, Gitlin JD** (2006) Role of the Menkes copper-transporting ATPase in NMDA receptor-mediated neuronal toxicity. *Proc Natl Acad Sci* **103**: 14919-14924
- Schuller A, Auffermann G, Zoschke K, Schmidt U, Ostermann K, Rödel G** (2013) Overexpression of ctr1 Δ 300, a high-affinity copper transporter with deletion of the cytosolic C-terminus in *Saccharomyces cerevisiae* under excess copper, leads to disruption of transition metal homeostasis and transcriptional remodelling of cellular proce. *Yeast* **30**: 201-218
- Seemann M, Wegner P, Schünemann V, Bui BTS, Wolff M, Marquet A, Trautwein AX, Rohmer M** (2005) Isoprenoid biosynthesis in chloroplasts via the methylerythritol phosphate pathway: The (E)-4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl diphosphate synthase (GcpE) from *Arabidopsis thaliana* is a [4Fe-4S] protein. *J Biol Inorg Chem* **10**: 131-137
- Selote D, Samira R, Matthiadis A, Gillikin JW, Long TA** (2015) Iron-Binding E3 Ligase mediates iron response in plants by targeting basic Helix-Loop-Helix transcription factors. *Plant Physiol* **167**: 273–286. doi: 10.1104/pp.114.250837
- Shikanai T, Müller-Moulé P, Munekage Y, Niyogi KK, Pilon M** (2003) PAA1, a P-type ATPase of *Arabidopsis*, functions in copper transport in chloroplasts. *Plant Cell* **15**: 1333-1346
- Sieker LC, Stenkamp RE, Jensen LH, Prickril B, LeGall J** (1986) Structure of rubredoxin from the bacterium *Desulfovibrio desulfuricans*. *FEBS Lett* **208**: 73-76
- De Silva DM, Askwith CC, Eide D, Kaplan J** (1995) The FET3 gene product required for

- high affinity iron transport in yeast is a cell surface ferroxidase. *J Biol Chem* **270**: 1098-1101
- Singh A, Kaur N, Kosman DJ** (2007) The metalloreductase Fre6p in Fe-efflux from the yeast vacuole. *J Biol Chem* **282**: 28619-28626
- Sivitz AB, Hermand V, Curie C, Vert G** (2012) *Arabidopsis* bHLH100 and bHLH101 control iron homeostasis via a FIT-Independent pathway. *PLoS One* **7**: e44843. doi: 10.1371/journal.pone.0044843
- Smyth GK** (2005) *Limma: Linear Models for Microarray Data*. New York.
- Sommer F, Kropat J, Malasarn D, Grosseohme NE, Chen X, Giedroc DP, Merchant SS** (2010) The CRR1 nutritional copper sensor in *Chlamydomonas* contains two distinct metal-responsive domains. *Plant Cell* **22**: 4098-4113
- Stacey MG, Patel A, McClain WE, Mathieu M, Remley M, Rogers EE, Gassmann W, Blevins DG, Stacey G** (2008) The *Arabidopsis* AtOPT3 protein functions in metal homeostasis and movement of iron to developing seeds. *Plant Physiol* **146**: 589-601
- Stenkamp RE** (1994) Dioxygen and Hemerythrin. *Chem Rev* **94**: 715-726
- Su LW, Chang SH, Li MY, Huang HY, Jane WN, Yang JY** (2013) Purification and biochemical characterization of *Arabidopsis* At-NEET, an ancient iron-sulfur protein, reveals a conserved cleavage motif for subcellular localization. *Plant Sci* **213**: 46-54
- Takahashi M, Sasaki Y, Ida S, Morikawa H** (2001) Nitrite reductase gene enrichment improves assimilation of NO₂ in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **126**: 731-41
- Takahashi M, Terada Y, Nakai I, Nakanishi H, Yoshimura E, Mori S, Nishizawa NK** (2003) Role of nicotianamine in the intracellular delivery of metals and plant reproductive development. *Plant Cell* **15**: 1263-80
- Thompson MJ, Lai WS, Taylor GA, Blackshear PJ** (1996) Cloning and characterization of two yeast genes encoding members of the CCCH class of zinc finger proteins: Zinc finger-mediated impairment of cell growth. *Gene* **174**: 225-233
- Tissot N, Robe K, Gao F, Grant-Grant S, Boucherez J, Bellegarde F, Maghiaoui A, Marcelin R, Izquierdo E, Benhamed M, Martin A, Vignols F, Roschttardt H, Gaymard F, Briat J F, Dubos C** (2019) Transcriptional integration of the responses to iron availability in *Arabidopsis* by the bHLH factor ILR3. *New Phytol* **223**:1433-1446. doi: 10.1111/nph.15753

- Trijatmiko KR, Dueñas C, Tsakirpaloglou N, Torrizo L, Arines FM, Adeva C, Balindong J, Oliva N, Sapasap M V, Borrero J, y otros** (2016) Biofortified indica rice attains iron and zinc nutrition dietary targets in the field. *Sci Rep* **6**: 19792
- Tsukagoshi H, Busch W, Benfey PN** (2010) Transcriptional regulation of ROS controls transition from proliferation to differentiation in the root. *Cell* **143**: 606-616
- Tsukamoto T, Nakanishi H, Uchida H, Watanabe S, Matsuhashi S, Mori S, Nishizawa NK** (2009) ⁵²Fe translocation in barley as monitored by a positron-emitting tracer imaging system (PETIS): Evidence for the direct translocation of Fe from roots to young leaves via phloem. *Plant Cell Physiol* **50**: 48-57
- Uauy R, Olivares M, Gonzalez M** (1998) Essentiality of copper in humans. *Am J Clin Nutr* **67**: 952S-959S
- Urbanowski JL, Piper RC** (1999) The iron transporter Fth1p forms a complex with the Fet5 iron oxidase and resides on the vacuolar membrane. *J Biol Chem* **274**: 38061-38070
- Vierstra RD** (2009) The ubiquitin-26S proteasome system at the nexus of plant biology. *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**: 385-397
- Wang D, Guo Y, Wu C, Yang G, Li Y, Zheng C** (2008) Genome-wide analysis of CCCH zinc finger family in *Arabidopsis* and rice. *BMC Genomics* **9**: 44-64
- Wang H, Klatte M, Jakoby M, Bäumllein H, Weisshaar B, Bauer P** (2007) Iron deficiency-mediated stress regulation of four subgroup Ib bHLH genes in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* **226**: 897-908
- Waters BM, Chu H-H, DiDonato RJ, Roberts LA, Eisley RB, Lahner B, Salt DE, Walker EL** (2006) Mutations in *Arabidopsis* Yellow Stripe-Like1 and Yellow Stripe-Like3 reveal their roles in metal ion homeostasis and loading of metal ions in seeds. *Plant Physiol* **141**: 1446-1458
- Waters BM, McInturf SA, Stein RJ** (2012) Rosette iron deficiency transcript and microRNA profiling reveals links between copper and iron homeostasis in *Arabidopsis thaliana*. *J Exp Bot* **63**: 5903-5918
- Westergard L, Christensen HM, Harris DA** (2007) Role in disease. *Biochim Biophys Acta* **1772**: 629-644
- Wintz H, Fox T, Wu YY, Feng V, Chen W, Chang HS, Zhu T, Vulpe C** (2003) Expression profiles of *Arabidopsis thaliana* in mineral deficiencies reveal novel transporters

- involved in metal homeostasis. *J Biol Chem* **278**: 47644-47653
- von Wirén N, Klair S, Bansal S, Briat J-F, Khodr H, Shioiri T, Leigh RA, Hider RC** (1999) Nicotianamine chelates both Fe(III) and Fe(II). Implications for metal transport in plants. *Plant Physiol* **119**: 1107-1114
- Wofford JD, Bolaji N, Dziuba N, Wayne Outten F, Lindahl PA** (2019) Evidence that a respiratory shield in *Escherichia coli* protects a low-molecular-mass Fe II pool from O₂-dependent oxidation. *J Biol Chem* **294**: 50-62
- Wu H, Li L, Du J, Yuan Y, Cheng X, Ling H-Q** (2005) Molecular and biochemical characterization of the Fe(III) chelate reductase gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* **46**: 1505-1514
- Wu X, Sinani D, Kim H, Lee J** (2009) Copper transport activity of yeast Ctr1 is down-regulated via its C terminus in response to excess copper. *J Biol Chem* **284**: 4112-4122
- Yamaguchi-iwai Y, Serpe M, Haile D, Yang W, Kosman DJ, Klausner RD, Dancis A** (1997) Homeostatic regulation of copper uptake in yeast via direct binding of MAC1 protein to upstream regulatory sequences oh FRE1 and CTR1. *J Biol Chem* **272**: 17711-17718
- Yamasaki H, Abdel-Ghany SE, Cohu CM, Kobayashi Y, Shikanai T, Pilon M** (2007) Regulation of copper homeostasis by micro-RNA in *Arabidopsis*. *J Biol Chem* **282**: 16369-16378
- Yamasaki H, Hayashi M, Fukazawa M, Kobayashi Y, Shikanai T** (2009) SQUAMOSA Promoter binding Protein-like7 is a central regulator for copper homeostasis in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **21**: 347-361
- Ye Y, Yuan J, Chang X, Yang M, Zhang L, Lu K, Lian X** (2015) The phosphate transporter gene OsPht1;4 is involved in phosphate homeostasis in rice. *PLoS One* **10**: e0126186
- Yruela I** (2009) Copper in plants: acquisition, transport and interactions. *Funct Plant Biol* **36**: 409
- Yuan M, Chu Z, Li X, Xu C, Wang S** (2010) The bacterial pathogen *Xanthomonas oryzae* overcomes rice defenses by regulating host copper redistribution. *Plant Cell* **22**: 3164-3176
- Yuan M, Li X, Xiao J, Wang S** (2011) Molecular and functional analyses of COPT/Ctr-type

copper transporter-like gene family in rice. *BMC Plant Biol* **11**: 69-80

Yuan Y, Wu H, Wang N, Li J, Zhao W, Du J, Wang D, Ling HQ (2008) FIT interacts with AtbHLH38 and AtbHLH39 in regulating iron uptake gene expression for iron homeostasis in *Arabidopsis*. *Cell Res* **18**: 385-397

Yuan YX, Zhang J, Wang DW, Ling HQ (2005) AtbHLH29 of *Arabidopsis thaliana* is a functional ortholog of tomato FER involved in controlling iron acquisition in strategy I plants. *Cell Res* **15**: 613-621

Zancani M, Peresson C, Biroccio A, Federici G, Urbani A, Murgia I, Soave C, Micali F, Vianello A, Macrì F (2004) Evidence for the presence of ferritin in plant mitochondria. *Eur J Biochem* **271**: 3657-3664

Zhu Z, Labbe S, Peña MMO, Thiele DJ (1998) Copper differentially regulates the activity and degradation of yeast Mac1 transcriptionfactor. *J Biol Chem* **273**: 1277-1280

