DEPARTAMENT DE BIOQUIMICA I BIOLOGIA
MOL·LECULAR

FUNCIÓ DE MEMBRES DE LA FAMÍLIA DE TRANSPORTADORS COPT EN L'HOMEÒSTASI DEL COURE D'ARABIDOPSIS THALINA.

ANTONI GARCIA I MOLINA

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA
Servei de Publicacions
2011

Aquesta Tesi Doctoral va ser presentada a València el dia 10 de febrer de 2011 davant un tribunal format per:

- Dra. Silvia Atrian Ventura
- Dr. Roc Ros Palau
- Dra. Helena Mira Aparicio
- Dra. Charlotte Poschenrieder Weins
- Dr. Fernando Aniento Alemany

Va ser dirigida per:
Dr. Sergi Puig i Todolí
Dra. Lola Peñarrubia Blasco

©Copyright: Servei de Publicacions
Antoni Garcia i Molina

Dipòsit legal: V-4107-2011
I.S.B.N.: 978-84-370-8091-8
Edita: Universitat de València
Servei de Publicacions
C/ Arts Gràfiques, 13 baix
46010 València
Spain
Telèfon:(0034)963864115

FUNCIÓ DE MEMBRES DE LA FAMÍLIA DE TRANSPORTADORS COPT EN L'HOMEÒSTASI DEL COURE D'*Arabidopsis thaliana*

Antoni Garcia i Molina

2010

VNIVERSITAT DE VALÈNCIA
Departament de Bioquímica i Biologia Molecular

Funció de membres de la família de transportadors COPT en l'homeòstasi del coure d'*Arabidopsis thaliana*

Memòria presentada per

N'Antoni Garcia i Molina

per optar a l'obtenció del grau de:

Doctor en Bioquímica

Sota la direcció de:

Dra. Lola Peñarrubia Blasco

Dr. Sergi Puig i Todolí

Burjassot, 21 de Setembre del 2010

LOLA PEÑARRUBIA BLASCO, Doctora en Ciències Biològiques i Professora Titular del Departament de Bioquímica i Biologia Molecular de la Universitat de València (Estudi General)

SERGI PUIG i TODOLÍ, Doctor en Ciències Químiques i Científic Titular de l'Institut d'Agroquímica i Tecnologia d'Aliments (IATA-CSIC):

MANIFESTEN: que el llicenciat en Bioquímica **n'ANTONI GARCIA i MOLINA** ha realitzat, sota llur direcció, al Laboratori de Plantes del Departament de Bioquímica i Biologia Molecular de la Universitat de València, el treball "Funció de membres de la família de transportadors COPT en l'homeòstasi del coure d'*Arabidopsis thaliana*".

Signat: Lola Peñarrubia Blasco Signat: Sergi Puig i Todolí

Més lluny, heu d'anar més lluny
dels arbres caiguts que ara us empresonen,
i quan els haureu guanyat
tingueu ben present no aturar-vos.

Més lluny, sempre aneu més lluny,
més lluny de l'avui que ara us encadena.
I quan sereu deslliurats
torneu a començar els nous passos.

Més lluny, sempre molt més lluny,
més lluny del demà que ara s'acosta.
I quan creieu que arribeu,
sapigueu trobar noves sendes.

Més lluny, sempre molt més lluny,
més lluny del demà que ara ja s'acosta
i, quan sereu deslliurats,
tingueu ben present no aturar-vos

Lluís Llach

Viatge a Ítaca (2na part)

Després de cinc anys llargs de travessia, per fi s'albira un nou port d'aquest meu viatge cap a *Ítaca*. Durant tot aquest temps, no sempre han bufat vents favorables, ni ha sigut planer el camí. És per això que, arribat aquest moment, sent l'obligació de recordar a tots aquells que han contribuït, d'una manera més o menys directa, a assolir el present objectiu. En primer lloc, haig d'agrair a Sergi i Lola l'oportunitat que m'han brindat per tal d'iniciar-me en el món de la recerca, el tracte tan humà que m'han dispensat, i la seua consolidada professionalitat i bonhomia. A la resta dels integrants del grup de Cu i Fe: Nuria, Ana, Sonia, Nerea, Elisa, Alessandra, Sara, Patri, Esther i d'altres col·laboradors faig extensius els meus agraïments per haver-me donat una empenta en temes professionals i per la paciència demostrada en haver-me suportat al vostre costat durant tot aquest camí.

Al laboratori de plantes: a Marisa, Ximo, Carlos, Ana-Cris, Pedro i Álex, tant per ajudar-me a resoldre dubtes de tot tipus, com per l'interés mostrat envers el meu treball. Als, ja doctors, Julia, Quique i Mª Jesús, i a Mª Ángeles, per l'ajuda i companyerisme en els primers anys. A Mayte, per mantindre'm ben a l'aguait des de primera hora i posar-me els punts sobre les i. A Loreto, pel seu exemple i altruïsme, per tots els bons consells i pels ànims. A Hems i Wallid, per portar-nos els flaires d'altres llocs a casa nostra, per ajudar-me amb l'anglés i el francés, i per mostrar-me que una altra manera de fer les coses és possible. A l'extensa colònia d'argentins que, intermitentment, han envaït el laboratori i, en particular, a Fran, per fer-me descobrir els efectes secundaris de la mateïna, Charly Garcia, *asados*, *chimichurris* i *alfajores*. Ah, i per deixar-me ser padrí de bateig del *Lotus charlii*. També vull recordar tots aquells que, transitòriament, han passat pel laboratori: Simone, Lesya, Laura, Carolina, Ximo, Borja... i, en especial, Steffen per ser tan amicable (*du bist sehr toll!*) i a Quel·lo i Víctor, per tot el fart de riure que ens hem fet i per instaurar la tradició dels *kebabs* i dels limfòcits.

Al Dr. F. Marco, per no haver-me enviat a fer la mà després de cinc anys sotmetent-lo a un tercer grau de preguntes relacionades amb el món de la informàtica i de la biologia molecular. Per haver-me introduït en la tradició del *Trànsit d'entrepans*, per tots els bons consells en vectors, extracció d'RNA, qPCR, reactius, *Windows Parallel*; per totes les tertúlies sobre filosofia (teoria del 4) i societat celebrades al despatx de becaris i per fer-me veure que el món és molt senzill. Espere compensar-lo dedicant-li un paràgraf sencer.

Al Departament de Bioquímica per l'ajuda professional i els ànims que m'han mostrat durant la recta final d'aquest procés: a Gemma, per haver compartit taula i tertúlies en els dinars a l'antiga cafeteria; a Andy, pel bon exemple que ha donat i pel dia a dia; a Natalia S. per ser incombustible; a Silvia pels caps de setmana i les hores intempestives durant les que hem coincidit; a Fany, per tots els autoclaus i per obrir el departament, a Toni (GFL) per ser tan *coqueto*; a Elena, Vicent i Lorena, per la seua dedicació i professionalitat; a Nikki, per recordar-me Flandes; a Priyanka per la seua senzillesa; a Manolo i Natàlia G., els meus compatriotes de *La Plana*; a Lorena, Elena i Maria, per la companyia durant les pràctiques; a Gloria i José Manuel per interessar-se pel meu treball; i a la resta del PDI. A Maria i la gent de secretaria per optimitzar i agilitzar els tràmits burocràtics i administratius. A Pedro i Juan Ramón, per les comandes i el manteniment. A Paqui pel seu humor i per anar *a tope* ja de bona hora.

A la gent de fora del departament que ha col·laborat en aquest treball. Al grup de creixement i desenvolupament del Departament de Biologia Vegetal, a Shantanu i, en especial, a Secundino del Valle, per esmenar els meus sofismes, per les nostres absorbents tertúlies sobre múltiples i diversos afers, i per mostrar-me la seua peculiar manera de fer ciència. A la gent del SCSIE, Pedro, Tere, Amparo, Quique, Mari Tere, Cristina i Carlos. Al grup de Nathalie Verbruggen: Pietro,

Jerômme, Hélène, Lucía, Yana, Christian, Magda, *le labo le plus chouette de la ULB! Je vous remercie pour toute l'aide que j'ai reçue de votre part et la decouverte d'une autre culture et façon de travailler là-bas, à Bruxelles, le pays des frittes et de la bonne bièrre.*

En el pla estrictament personal, tinc ben present a la Vilma, per haver estat sempre, fidelment, al meu costat; a la Pepa, al Coco, a la Shila i Lassi. Als meus amics d'Onda, Toni, Salva, Ximo, Manolo, David i Javi, qui, des de la distància, han sabut animar-me i donar-me tot el suport que he necessitat. A la família d'Andrea, per interessar-se i valorar el meu treball. Als iaios paterns, per haver-me fet costat des d'onsevulla que estiguen. Als meus pares, ma germana i resta familiars, per apostar per mi ja des de ben menut i, finalment, a Andrea, amb qui he compartit tot aquest trajecte, per haver sabut dir sempre la paraula justa i per donar-me tot el seu afecte i estima.

El treball “Funció de membres de la família de transportadors COPT en l’homeòstasi del Cu d’*Arabidopsis thaliana*” ha sigut finançat amb l’ajuda predoctoral BES-2006-1271 del programa de Formació del Personal Investigador (FPI) associada al projecte BIO2005-07120 del *Ministerio de Educación y Ciencia*.

Aprofitem per agrair la col·laboració i contribució dels grups i investigadors que han facilitat el desenvolupament del present treball:

- Servei Central de Suport a la Investigació Experimental de la Universitat de València (SCSIE): Unitat de microscopia electrònica, Espectroscopia atòmica i molecular, Hivernacle i Seqüenciació.

- Grup de creixement i desenvolupament (Departament de Biologia Vegetal; Universitat de València) per l’ús del sistema de detecció de la fluorescència de les llavors transgèniques.

- Dr. Secundino del Valle (Departament de Biologia Vegetal; Universitat de València) per la determinació de paràmetres relacionats amb l’eficiència fotosintètica.

- Dr. Shantanu Wankhade i Dra. Mª Jesús Cornejo (Departament de Biologia Vegetal; Universitat de València) per l’ús del sistema de fotografia per a plàntules.

- Dr. Fernando Aniento i Gloria Sancho (Departament de Bioquímica; Universitat de València) per l’ajuda en els fraccionaments subcel·lulars en gradient de sacarosa i per la cessió desinteressada d’anticossos i vectors marcadors de localització.

- Dr. Jesús Selfa (Departament de Zoologia, Universitat de València), per l’ús del sistema per a fotografiar les tincions β-glucuronidasa en plàntules.

- Dra. Nathalie Verbruggen (*Laboratoire de Physiologie et Génétique Moléculaire des Plantes; Université Livre de Bruxelles*) per la contribució en la determinació de paràmetres fisiològics i l’optimització de cultius hidropònics.

ÍNDEX

ÍNDEX **i**

LLISTAT D'ABREVIATURES **ix**

ÍNDEX DE FIGURES I TAULES **xi**

INTRODUCCIÓ **1**

1. El coure en el medi geològic **1**
   1.1. Explotació i conseqüències **1**
   1.2. Consideracions evolutives **3**

2. El coure en els éssers vius **4**
   2.1. Essencialitat del coure **4**
      2.1.1. El coure en plantes **6**
   2.2. Toxicitat del coure **7**
      2.2.1. Resposta a l'excés de Cu en plantes **9**
   2.3. Simptomes de dèficit i excés de coure en plantes **10**

3. Trets fonamentals de les xarxes homeostàtiques del coure **11**
   3.1. La xarxa homeostàtica del coure en *Saccharomyces cerevisiae* **12**
      3.1.1. Adquisició i distribució del coure **12**
      3.1.2. Regulació per coure **15**
   3.2. La xarxa homeostàtica del Cu en *Arabidopsis thaliana* **16**
      3.2.1. Adquisició del Cu i distribució intracel·lular **17**
      3.2.2. Adquisició i transport del coure a nivell de l'arrel **20**
      3.2.3. Distribució del Cu a llarga distància **21**
      3.2.4. Regulació per coure **22**

4. Els transportadors de coure de tipus CTR **28**
4.1. Especificitat dels transportadors tipus CTR pel Cu^+ **29**
4.2. Trets estructurals i funcionals dels transportadors tipus CTR **29**
4.2.1. Topologia dels transportadors tipus CTR **29**
4.2.2. Elements essencials en els transportadors tipus CTR **32**
4.2.3. Altres consideracions estructurals **33**
4.2.4. Estructura tridimensional del transportador hCtr1 **34**
4.3. Model funcional dels transportadors tipus CTR **36**
4.4. Transportadors de coure de tipus CTR en *Arabidopsis thaliana*: la família COPT **37**
4.4.1. El transportador d' *Arabidopsis thaliana* COPT1 **39**

OBJECTIUS **41**

MATERIALS I MÈTODES **45**

1. Material biològic **45**
1.1. Manipulació de bacteris **45**
1.1.1. Condicions de creixement i transformació d'*Escherichia coli* **45**
1.1.2. Condicions de creixement i transformació d'*Agrobacterium tumefaciens* **46**
1.2. Manipulació del llevat *Saccharomyces cerevisiae* **46**
1.2.1. Condicions de creixement i transformació de *Saccharomyces cerevisiae* **46**
1.2.2. Assaig de complementació funcional **47**
1.3. Manipulació d'*Arabidopsis thaliana* **48**
1.3.1. Condicions de creixement d'*Arabidopsis thaliana*: substrat, medi sòlid i cultiu hidropònic **48**
1.3.2. Transformació d'*Arabidopsis thaliana* mitjançant *Agrobacterium tumefaciens* **50**
2. Aïllament i anàlisi d'àcids nucleics **51**

2.1. Aïllament d'àcids nucleics **51**
2.1.1. Aïllament de DNA plasmídic de bacteri **51**
2.1.2. Obtenció de DNA genòmic d'*Arabidopsis thaliana* **52**
2.1.3. Obtenció d'RNA total d'*Arabidopsis thaliana* **53**
2.2. Tècniques per a la manipulació i anàlisi d'àcids nucleics **54**
2.2.1. Amplificació de fragments per PCR **54**
2.2.2. Reaccions enzimàtiques: restricció, desfosforilació i lligació **54**
2.2.3. Electroforesi de DNA i purificació de fragments **55**
2.2.4. Electroforesi d'RNA **55**
2.2.5. PCR semiquantitiva **56**
2.2.6. PCR quantitativa en temps real amb SYBR-Green **57**
2.2.7. Anàlisi de seqüències **59**
2.3. Disseny de construccions **60**
2.3.1. Fusió de promotors al gen alertador *β-glucuronidasa* (*pCOPT::GUS*) **60**
2.3.2. Construcció del cassette de complementació *pCOPT5::COPT5::GFP* **62**
2.3.3. Construcció del cassette de complementació *pCOPT5::COPT5* **62**
2.3.4. Construcció dels cassettes de sobreexpressió *COPT::HA* **62**
2.3.5. Construcció de les proteïnes de fusió a la proteïna verda fluorescent (*CaMV(35S)::COPT::GFP*) **63**

3. Obtenció i anàlisi de proteïnes **64**
3.1. Extracció de proteïnes d'*Arabidopsis thaliana* **64**
3.2. Tècniques per a la manipulació de proteïnes **64**
3.2.1. Electroforesi de proteïnes en gels de poliacrilamida en condicions desnaturalitzants (SDS-PAGE) **64**
3.2.2. Transferència a membrana i detecció mitjançant anticossos **65**
3.2.3. Fraccionament subcel·lular **67**

4. Expressió i localització subcel·lular de les proteïnes de fusió COPT::GFP **68**

4.1. Transformació transitòria de protoplasts d'*Arabidopsis thaliana* **68**
4.2. Localització subcel·lular de les quimeres COPT::GFP **69**

5. Tècniques i paràmetres per a l'anàlisi de mutants d'*Arabidopsis thaliana* per inserció de T-DNA **69**
5.1. Obtenció de mutants d'*Arabidopsis thaliana* per inserció de T-DNA **69**
5.2. Identificació de plantes homozigotes i mapeig de les insercions **70**
5.3. Paràmetres per a la caracterització de mutants i plantes transgèniques **71**
5.3.1. Establiment de taxes i paràmetres fisiològics **72**
5.3.2. Estudi d'activitats enzimàtiques **74**
5.3.3. Seguiment de paràmetres relacionats amb l'eficència fotosintètica **75**
5.3.4. Aïllament de cloroplasts d'*Arabidopsis thaliana* **77**
5.3.5. Mesura del contingut de Cu endogen **78**

RESULTATS I DISCUSSIÓ **83**

CAPÍTOL 1: ESTUDI DE LA RESPOSTA d'*Arabidopsis thaliana* A DIFERENTS ESTATS NUTRICIONALS DE COURE **83**

1. Determinació del coure endogen en plàntules d'*Arabidopsis thaliana* crescudes en medis amb diferent concentració de coure **83**

2. Quantificació del coure en plàntules crescudes en medis amb baix contingut en coure i mesura de l'acumulació de zinc i ferro en funció del contingut en coure **85**

3. Identificació de gens marcadors per determinar l'estat nutricional de dèficit de coure **87**

DISCUSSIÓ **91**

CAPÍTOL 2: EL TRANSPORTADOR DE COURE D'ALTA AFINITAT COPT2 **97**

1. Anàlisi de la seqüència proteica del transportador COPT2 **97**

2. Localització subcel·lular de COPT2 **99**
   2.1. Funcionalitat de la proteïna de fusió COPT2::GFP en llevat **99**
   2.2. Localització subcel·lular de COPT2::GFP en protoplasts d'*Arabidopsis thaliana* **101**

3. Estudi de l'expressió gènica de *COPT2* **103**
   3.1. Estudi *in silico* de la seqüència promotora de *COPT2* **103**
   3.2. Establiment del patró d'expressió tissular del gen *COPT2* **105**
   3.3. Regulació per coure de l'mRNA de *COPT2* **108**

4. Obtenció i caracterització de línies amb insercions de T-DNA que afecten l'expressió del gen *COPT2* **109**
   4.1. Obtenció de línies mutants per a COPT2 **110**
   4.2. Caracterització del mutant *copt2-3* **114**

DISCUSSIÓ **117**

CAPÍTOL 3: EL TRANSPORTADOR DE COURE D'ALTA AFINITAT COPT6 **123**

1. Identificació del transportador de coure d'alta afinitat COPT6 d'*Arabidopsis thaliana* **123**
   1.1. Anàlisi de la seqüència proteica de COPT6 **123**
   1.2. Complementació de la soca de *S. cerevisiae ctr1Δctr3Δ* amb COPT6 **124**

2. Localització subcel·lular de la proteïna COPT6 **128**
2.1. Funcionalitat de la proteïna de fusió COPT6::GFP en llevat **129**
2.2. Localització subcel·lular de COPT6::GFP en protoplasts d'*Arabidopsis thaliana* **130**

3. Estudi de l'expressió gènica de *COPT6* en *Arabidopsis thaliana* **131**
3.1. Anàlisi *in silico* de la seqüència promotora de *COPT6* **131**
3.2. Regulació per coure de l'mRNA de *COPT6* **133**
3.3. Establiment del patró d'expressió tissular del gen *COPT6* **134**
3.3.1. Estudi de l'expressió de l'mRNA de *COPT6* per òrgans **134**
3.3.2. Estudi del patró d'expressió tissular amb línies *pCOPT6::GUS* **135**

4. Estudi de la sobreexpressió del gen *COPT6* en *Arabidopsis thaliana* **139**

5. Obtenció i caracterització de línies amb insercions de T-DNA que afecten el gen *COPT6* **142**
5.1. Obtenció de mutants *COPT6* **142**
5.2. Caracterització dels mutants *copt6-2* **145**

DISCUSSIÓ **149**

CAPÍTOL 4: EL TRANSPORTADOR DE COURE D'ALTA AFINITAT COPT5 **155**

1. Anàlisi de la seqüència codificant del transportador COPT5 **155**

2. Localització subcel·lular de *COPT5* en *Arabidopsis thaliana* **157**
2.1. Localització de COPT5::HA en *Arabidopsis thaliana* per fraccionament subcel·lular **157**
2.2. Funcionalitat de la proteïna de fusió COPT5::GFP en llevat **160**
2.3. Localització subcel·lular de COPT5::GFP en *Arabidopsis thaliana* **162**

3. Estudi de l'expressió gènica de *COPT5* en *Arabidopsis thaliana* **164**
3.1. Anàlisi *in silico* de la seqüència promotora de *COPT5* **164**
3.2. Establiment del patró d'expressió tissular del gen *COPT5* **166**
3.3. Regulació per coure de l'mRNA de *COPT5* **169**

4. Obtenció i caracterització de línies amb insercions de T-DNA que afecten el gen *COPT5* **173**
4.1. Obtenció de mutants per a *COPT5* **173**
4.2. Caracterització dels mutants de pèrdua de funció *copt5* **176**
4.2.1. Anàlisi fenotípica en medis deficients en coure **176**
4.2.2. Determinació del contingut en coure endogen dels mutants **184**
4.2.3. Mesura del contingut en clorofil·les **186**
4.2.4. Estudi del transport d'electrons en la cadena fotosintètica **187**
4.2.5. Avaluació de processos dependents de coure **193**

DISCUSSIÓ **195**

ATLAS **203**

CONCLUSIONS **209**

BIBLIOGRAFIA **215**

LLISTAT D'ABREVIATURES

AOX	Ascorbat oxidasa
APX	Ascorbat peroxidasa
BCS	Àcid 2, 9-dimetil-4,7-difenil-1, 10-fenantrolina-disulfònic
BSA	Seroalbúmina bovina
BPS	Àcid 4,7-difenil-1,10-fenantrolina-disulfònic
CaMV(35S)	Promotor de l'RNA ribosòmic CaMV(35S) del virus del mosaic de la col-i-flor
CAT	Catalasa
cDNA	DNA complementari
Col 0	Ecotipus *Columbia 0*
COPT	Transportador de coure d'*Arabidopsis thaliana*
COX	Citocrom c oxidasa
CSD	Superòxid dismutasa de Cu/Zn
Ct	Cicle llindar
CTAB	Bromur de cetiltrimetilamoni
CTR	Transportador de coure
DMA	Àcid 2-deomugineic
dNTP	Desoxirribonucleòtids trifosfat
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Àcid tetraacètic d'etilendiamina
EGTA	Àcid tetraacètil d'etilenglicol
Fm	Rendiment màxim de fluorescència en adaptació a la foscor
Fo	Fluorescència mínima dels centres PSII adaptats a la foscor
Fv/ Fm	Rendiment quàntic màxim del PSII
Ft	Fluorescència mínima dels centres PSII en estat estacionari
FSD	Superòxid dismutasa de ferro
gDNA	DNA genòmic
GFP	Proteïna verda fluorescent
GUS	β-glucuronidasa
HA	Epítop de l'hemaglutinina humana del virus *Influenza*
HB	Tampó d'homogeneïtzació
HMA	ATPasa de metalls pesats
ICP-MS	Espectroscopia de masses amb plasma d'acoblament inductiu
IPTG	Isopropil-β-D-tiogalactopiranòsid
LB	Medi de cultiu Luria-Bertani
MDA	Malondialdehid
MES	Àcid 4-morfolino-etano-sulfònic
miRNA	microRNA
MOPS	Àcid 3-morfolino-propano-sulfònic
mRNA	RNA missatger
MS	Medi de cultiu Murashige-Skoog
MT	Metal·lotioneïna
NA	Nicotianamina

NAS	Nicotianamina sintasa
NOS	Terminador del gen de la nopalina sintetasa
p/v	Pes/volum
PAR	Radiació fotosintèticament activa
pb	Parells de bases
PC	Plastocianina
PCR	Reacció en cadena de la polimerasa
qPCR	PCR quantitativa en temps real
sqPCR	PCR semiquantitativa
PEG	Polietilenglicol
PMSF	Fluòrid de fenilmetanosulfat
PSII	Fotosistema II
PVC	Compartiment prevacuolar
PVP	Polivinilpirrolidona
PVPP	Polivinilpolipirrolidona
Q_A	Quinona A associada al PSII
qP	Estat oxidatiu de la Q_A
ROS	Espècies reactives d'oxigen
RT-PCR	Transcripció reversa-reacció en cadena de la polimerasa
SAP	Fosfatasa alcalina de gamba
SBP	De l'anglés *SQUAMOSA promoter-Binding Protein*
SDS	Dodecil sulfat sòdic
SPL	De l'anglés *Squamosa Protein Like*
sRNA	RNA menuts
T-DNA	DNA de transferència d'*Agrobacterium tumefaciens*
TAE	Tris-acètic-EDTA
TEMED	N, N, N', N'-tetrametiletilendiamina
TMD	Segments transmembrana
Tris	Tris-hidroximetil-aminometà
UV	Llum ultraviolada
v/v	Volum/volum
WT	Silvestre, de l'anglés *wild type*
X-gluc	5-Bromo-4-chloro-3-indolil-β-D-glucurònid ciclohexilamoni
YPD	Medi llevat-peptona-dextrosa
Y_{PSII}	Rendiment quàntic del PSII

ÍNDEX DE FIGURES i TAULES

Figura I1 Producció mundial de Cu
Figura I2 Efecte tòxic del Cu en les cèl·lules
Figura I3 Esquema general de l'homeòstasi del Cu en *Saccharomyces cerevisiae*
Figura I4 Esquema de la xarxa homeostàtica del Cu en *Arabidopsis thaliana*
Figura I5 Disposició dels dominis i mecanisme d'acció de CRR1 de *Chlamydomonas reinhardtii*
Figura I6 Regulació de l'activitat SOD en el cloroplast
Figura I7 Sistema de regulació per deficiència de Cu
Figura I8 Esquema de l'aliniament de diferents transportadors de coure d'alta afinitat.
Figura I9 Topologia del transportador ScCtr1
Figura I10 Secció longitudinal del transportador hCtr1
Figura I11 Classificació dels membres de la família COPT d'*Arabidopsis thaliana*

Figura M1 Obtenció del *pFP101::GUS::NOS*
Figura M2 Estratègia per a l'obtenció del vector *pFP101::pCOPT5::COPT5::GFP*
Figura M3 Esquema de l'estratègia utilitzada per discriminar línies homozigotes i heterozigotes per a les insercions de T-DNA del SALK

Figura R1.1 Contingut en Cu endogen i estat nutricional en funció de la concentració de Cu en el medi en plàntules d'*Arabidopsis thaliana*
Figura R1.2 Mesura del contingut endogen de Fe i Zn de les plàntules crescudes en diferents concentracions de Cu
Figura R1.3 Anàlisi per qPCR de *FSD1*, *CSD1* i *CCS* en plàntules crescudes en medis amb diferents concentracions de Cu
Figura R1.4 Anàlisi per qPCR de *COPT2* i *CCH* en plàntules crescudes en medis amb diferents concentracions de Cu

Figura R2.1 Comparació de la seqüència de COPT1 i COPT2 i topologia de COPT2
Figura R2.2 Complementació de la soca mutant de llevat *ctr1Δctr3Δ* amb COPT2::GFP
Figura R2.3 Localització subcel·lular de la quimera COPT2::GFP
Figura R2.4 Anàlisi *in silico* de la seqüència promotora de COPT2
Figura R2.5 Patró d'expressió tissular de *COPT2*
Figura R2.6 Regulació per Cu de l'expressió de la *β-glucuronidasa* via *pCOPT2*
Figura R2.7 Esquema del lloc d'inserció de T-DNA en les línies mutants per a *COPT2*
Figura R2.8 Genotipat per PCR de plantes de les línies COPT2 seleccionades
Figura R2.9 Anàlisi de l'expressió de *COPT2* per sqPCR en els mutants *copt2-3*
Figura R2.10 Anàlisi de l'expressió de *COPT2* per qPCR en els mutants *copt2-3*
Figura R2.11 Model de l'adquisició de Cu al llarg de l'arrel

Figura R3.1 Aliniament entre els membres de la família COPT
Figura R3.2 Perfil d'hidrofobicitat i topologia del transportador COPT6
Figura R3.3 Complementació del mutant *ctr1Δctr3Δ* amb el transportador COPT6
Figura R3.4 Complementació de la soca mutant de *Saccharomyces cerevisiae*

ctr1Δctr3Δ amb COPT6::GFP
Figura R3.5 Localització de COPT6::GFP en protoplasts d'*Arabidopsis thaliana*
Figura R3.6 Anàlisi *in silico* de la seqüència de p*COPT6*
Figura R3.7 Anàlisi de l'expressió de l'mRNA de *COPT6* per qPCR
Figura R3.8 Estudi de l'expressió de COPT6 en teixits per sqPCR
Figura R3.9 Patró d'expressió tissular de *COPT6*
Figura R3.10 Expressió de *β-glucuronidasa* en *pCOPT6::GUS::NOS* en funció del Cu disponible al medi
Figura R3.11 Detecció de la sobreexpressió de COPT6::HA
Figura R3.12 Fenotips de les plantes COPT6::HA
Figura R3.13 Esquema de les insercions de T-DNA en el gen COPT6
Figura R3.14 Genotipat per PCR de la línia mutant COPT6-2
Figura R3.15 Estudi per sqPCR de l'expressió gènica en *copt6-2*
Figura R3.16 Estudi per qPCR de l'expressió gènica en *copt6-2*
Figura R3.17 Hipòtesi per a la distribució del Cu a les cèl·lules de la part aèria

Figura R4.1 Topologia del transportador COPT5
Figura R4.2 Sobreexpressió del gen *COPT5* en *Arabidopsis thaliana*
Figura R4.3 Fraccionament subcel·lular de COPT5::HA en gradient de sacarosa
Figura R4.4 Complementació i localització de COPT5::GFP en la soca mutant de *Saccharomyces cerevisiae ctr1Δctr3Δ*
Figura R4.5 Localització subcel·lular de la proteïna quimèrica COPT5::GFP
Figura R4.6 Seqüència de nucleòtids del promotor de *COPT5*
Figura R4.7 Patró d'expressió tissular de COPT5
Figura R4.8 Anàlisi per qPCR de l'expressió de *COPT5* en medis amb diferent concentració de Cu
Figura R4.9 Anàlisi dels mutants amb insercions de T-DNA *copt5-2* i *copt5-3*
Figura R4.10 Inhibició del creixement de l'arrel principal en els mutants *copt5*
Figura R4.11 Caracterització del fenotip de *copt5* crescudes en placa durant llargs períodes
Figura R4.12 Demostració de l'especificitat del Cu^+ en el fenotip dels mutants *copt5*
Figura R4.13 Experiment de sensibilitat al dèficit de Cu dels mutants *copt5*
Figura R4.14 Estudi de la vialitat de les cèl·lules de l'arrel dels mutants *copt5-2*
Figura R4.15 Mesura de la longitud dels hipocòtils en el mutants *copt5*
Figura R4.16 Contingut de Cu endogen dels mutants *copt5*
Figura R4.17 Mesura del contingut en clorofil·la
Figura R4.18 Determinació del paràmetre de Fv/Fm
Figura R4.19 Representació dels valors qP i ETR
Figura R4.20 Contingut de Cu endogen en cloroplasts
Figura R4.21 Patró de lignificació de la línia silvestre i *copt5*
Figura R4.22 Model per a la distribució del Cu en funció de l'estat nutricional de Cu

Taula I1 Quadre resum de les principals cuproproteïnes.
Taula M1 Encebadors ulitzats per a la sqPCR semiquantitativa
Taula M2 Encebadors ulitzats per a la qPCR
Taula M3 Encebadors ulitzats per a les clonacions

Taula M4 Anticossos i dilucions utilitzats en els experiments de *Western blot*
Taula M5 Encebadors ulitzats per discriminar els al·lels amb insercions de T-DNA

Taula R1.1 Concentracions aproximades de Cu exogen per a què s'obté el 50% del màxim de l'expressió dels gens proposats
Taula R1.2 Resum de la resposta d'*Arabidopsis thaliana* al Cu exogen

Taula R2.1 Encebadors emprats per a genotipar les línies mutants COPT2
Taula R2.2 Contingut en Cu endogen dels mutants *copt2-3*
Taula R3.1 Número de llavors per síliqua en *copt6-2*
Taula R3.2 Contingut en Cu en de la línia *copt6-2*

Taula R4.1 Combinació d'encebadors per discriminar els al·lels silvestres i inserits en els mutants *copt5*

INTRODUCCIÓ

INTRODUCCIÓ

El coure (Cu) és un element essencial per tal de dur a terme les reaccions de transferència d'electrons en els organismes de metabolisme aerobi. Tanmateix, la citotoxicitat associada a l'excés de Cu, deguda a la producció d'espècies reactives d'oxigen (ROS), implica l'existència de mecanismes homeostàtics regulats de forma precisa. La xarxa homeostàtica del Cu està conservada en els organismes eucariotes. Els transportadors de Cu d'alta afinitat hi participen durant l'adquisició del metall sota condicions de deficiència. L'estudi dels transportadors de Cu d'alta afinitat en la planta model *Arabidopsis thaliana* contribuïrà a millorar la comprensió de la xarxa homeostàtica del Cu i bastirà el desenvolupament d'estratègies biotecnològiques per a millorar l'adquisició d'aquest element.

1. El coure en el medi geològic

1.1. Explotació i conseqüències

El Cu (del llatí *cuprum*) és un element químic de nombre atòmic 29 que, juntament amb el ferro (Fe), el níquel (Ni), el manganés (Mn), la plata (Ag), l'or (Au) i d'altres, pertany a l'anomenat grup dels metalls de transició. El Cu és present sobre l'escorça terrestre en unes proporcions de 55 ppm i es troba en forma de mineral com a sulfat (calcopirita, $CuFeS_2$; bornita, Cu_5FeS_4; cobalita, CuS; i calcocita, Cu_2S), carbonats (atzurita, $Cu_3(CO_3)_2(OH)_2$; i mal·laquita, $Cu_2CO_3(OH)_2$) o òxids (cuprita, Cu_2O). La maleabilitat i ductilitat del Cu han fet que ja d'antuvi

l'home es dedicara a la seua explotació i ús. El Cu i el bronze (aliatge del Cu amb l'estany, Sn) van adquirir tanta importància que els historiadors han anomenat a dos períodes de la Prehistòria com l'Edat del Cu (també conegut com l'Eneolític o Calcolític) i l'Edat del bronze (www.copper.org).

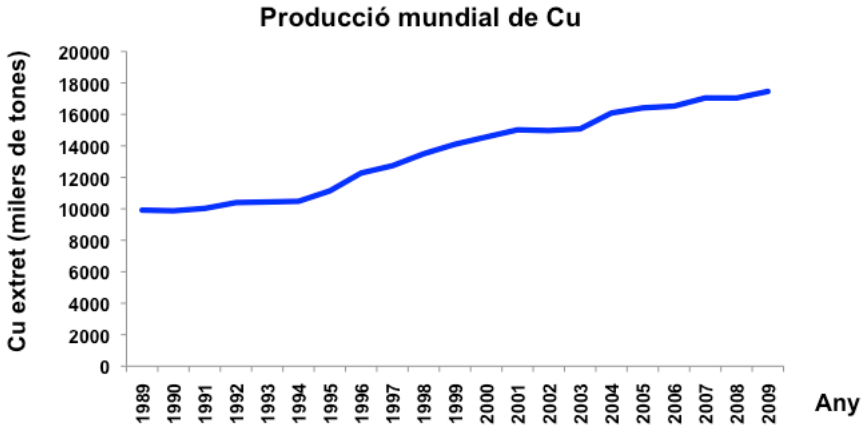


Figura I1: Producció mundial de Cu. Es representa l'extracció total anual de Cu en els darrers 20 anys. Font: *Copper Development Association*.

Com que el Cu presenta la segona conductivitat més alta entre els metalls ($59.6 \cdot 10^6$ S/m), avui dia se n'ha generalitzat l'ús per a fabricar filaments de cables elèctrics. El Cu també s'utilitza com a agent anticorrossiu en les canonades submergides en la mar, com a pigment per a ceràmica, en el revestiment de cobertura d'edificis, en la fabricació de monedes i en bijuteria. La indústria cosmètica es val de les propietats del Cu com a antimicrobià i preventiu de la formació de la placa dentària per als preparats d'ús higiènic tipus dentifricis o productes per glopejar. En les piscifactories, el Cu és emprat per evitar la presència de patògens bacterians, sense que aquesta addició no es traduesca en problemes nocius per als

consumidors. A més, aquest tret antibacterià està sent considerat a l'hora de desenvolupar productes i materials asèptics en hospitals i clíniques. El sector agrícola, per la seua banda, s'ha valgut del Cu des de fa molt de temps com a fungicida (mescla Bordeaux) i, en ramaderia, el Cu té un ús particular com a factor de creixement (www.copper.org).

Tanmateix, l'ús i abús continuat del Cu incideix en el medi ambient en la contaminació dels sòls i repercuteix en les xarxes tròfiques. Les dues principals causes de contaminació per Cu són les activitats industrials i l'ús de fungicides (Märschner, 2002). L'explotació del Cu en la indústria minera ha augmentat progressivament en els darrers 20 anys fins assolir una producció total de 17.5 milions de tones (Figura I1). Xile lidera l'activitat minera de Cu, amb vora 6 milions de tones de Cu l'any 2009. Pel que fa a la resta de països, destaquem per continents el milió de tones extret a Zambia, Austràlia, Xina i Indoxina, i el mig milió de Polònia (www.copper.org).

1.2. Consideracions evolutives

En els albors de la vida a la Terra, l'atmosfera primitiva era anòxica. Pressumiblement, el Fe fóra l'element utilitzat com a cofactor per a les proteïnes implicades en transferències d'electrons degut a l'abundància de la llavors forma soluble, Fe^{2+}. Ara bé, a mesura que augmentaven els nivells d'oxigen a l'atmosfera, degut a l'acció dels primers organismes fotosintètics, els components de la biosfera s'oxidaven i el Fe esdevenia insoluble (Fe^{3+}) alhora que el Cu es presentava en la forma soluble (Cu^{2+}). Un fet que reflecteix aquest canvi ens el mostren els briòfits: *Marchantia*

paleacea var *diptera*, una de les molses més primitives, depèn d'hemoproteïnes, mentre que *Barbula unguiculata*, una molsa més pròxima a les plantes vasculars, fa un ús preferent de les cuproproteïnes (Tanaka et al. 1996; Yamahara et al. 1999).

2. El coure en els éssers vius

2.1. Essencialitat del coure

El Cu és un element que esdevé essencial per als éssers vius aerobis atès que el seu potencial redox s'escau al rang emprat per les cèl·lules en les reaccions de transferència d'electrons en presència d'oxigen. Concretament, el Cu es requereix per al correcte funcionament de proteïnes encarregades d'esmenar ROS i d'enzims involucrats en processos generadors d'energia. A més, en mamífers, el Cu participa en la distribució del Fe, el metabolisme de pigments, la biosíntesi de neurotransmisors, l'engalzament de les fibres de teixit connectiu i la coagulació de la sang (Taula I1).

Heus a continuació una breu ennumeració d'algunes cuproproteïnes. La citocrom *c* oxidasa (COX) és un complex enzimàtic mitocondrial essencial per a la respiració aerobia ja que duu a terme el darrer pas d'oxidació en la cadena de transport electrònic. Les superòxid dismutases (SOD) constitueixen, junt amb determinades oxidases i d'altres components no enzimàtics, la barrera d'antioxidants de les cèl·lules ja que s'encarreguen d'eliminar les ROS fruit del metabolisme aeròbic mitjançant la dismutació de l'anió superòxid. En funció del cofactor que requereixen, hom estableix 3

variants: la superòxid dismutasa de Fe (FeSOD), la de Mn (MnSOD) i la de Cu i zinc (Cu/ZnSOD). El cofactor de molibdé (MoCo) forma part d'enzims que participen en el cicle del nitrogen, carboni i sofre. Des del punt de vista estructural, durant la biosíntesi del MoCo, la proteïna Cnx1G, que s'encarrega d'incorporar el Mo a l'intermediari molibdopterina, és capaç d'unir Cu amb la finalitat d'estabilitzar l'intermediari o de regular l'entrada del Mo (Kuper et al. 2004).

Taula I1: Quadre resum de les principals cuproproteïnes

Enzim	Funció
Amino oxidases	Inactivació d'hormones, defensa envers ferides i patògens
Ascorbat oxidasa	Detoxificació ROS en apoplast i metabolisme de la paret cel·lular
Ceruloplasmina	Mobilització de Fe i distribució de Cu
Citocrom c oxidasa	Respiració aeròbia
Cofactor de molibdé	Assimilació de nitrogen, biosíntesi de fitohormones i catabolisme de purines
Diamino oxidasa	Inactivació d'histamina i lignificació
Dopamina β-monoxigenasa	Sintesi de catecolamina
Factors de coagulació V i VIII	Coagulació de la sang
Fenol oxidasa	Defensa antioxidant
Galacto oxidasa	Oxidació de sucres
Hemocianina	Transport d'oxigen
Lacasa	Lignificació
Lisil oxidasa	Entrecreuament de col·lagen i elastina
Nitrit reductasa	Respiració anaeròbica
Peptidilglicina monoxigenasa	Activació d'hormones peptídiques
Plantacianina	Desenvolupament de l'antera i polinització
Plastocianina	Transport d'electrons
Polifenol oxidases	Síntesi de pigments, defensa antioxidant, lignificació
Precursor β-amiloide	?
Proteïna priònica PrP^c	Defensa antioxidant, transport de Cu
Receptor de l'etilè	Senyalització hormonal
Cu/Zn superòxid dismutasa	Defensa antioxidant
Tirosinasa (catecol oxidasa)	Síntesi de melanina

2.1.1. El coure en plantes

Tradicionalment, les plantes superiors esdevenen l'objectiu d'estudis atesa la seua importància agronòmica, el seu pes en les xarxes tròfiques i el potencial biotecnològic. Com es veurà al llarg de la introducció, durant els darrers anys són molts els treballs publicats i les revisions relacionades amb l'homeòstasi del Cu en plantes.

En plantes, l'essencialitat del Cu es deu a les diverses funcions que realitzen cuproproteïnes, com per exemple les oxidases blaves: l'ascorbat oxidasa (AOX) i les lacases, que participen en la defensa contra agents oxidants a l'apoplast i en el procés de lignificació de les parets cel·lulars, respectivament. Les fenol oxidases formen part d'una via del metabolisme secundari generadora de compostos per a la defensa de la planta i les polifenol oxidases intervenen en el metabolisme secundari per a la síntesi de pigments (Märschner 2002). En *Arabidopsis thaliana*, pel que fa a la Cu/ZnSOD, hom distingeix 3 isoformes: la CSD1, de localització citosòlica, la CSD2 ubicada a l'estroma dels cloroplasts i la CSD3, present als lisosomes.

A més d'aquest ampli ventall de processos, l'interés per l'estudi de l'homeòstasi de Cu en plantes ha augmentat com a conseqüència de la seua funció essencial en la percepció de l'etilè, la maduració del pol·len i la transferència d'electrons entre els fotosistemes (PS). El receptor de l'etilè (ETR1) es localitza al reticle endoplasmàtic i disposa d'una butxaca hidrofòbica amb una alta densitat electrònica on resideix una cisteïna

essencial. Aquesta cisteïna s'encarrega de coordinar el Cu^{+} i permet que l'etilè s'hi unesca amb una alta estabilitat (Taula I1; revisat per Chang i Shockey, 1999; Rodríguez et al. 1999). La plantacianina pertany a la família de les fitocianines i participa en el desenvolupament de l'antera i en el procés de pol·linització (Taula I1; Dong et al. 2005). Per altra banda, la plastocianina (PC) és un intermediari de la cadena de transport d'electrons de la fotosíntesi encarregat de transferir els electrons entre el citocrom *b6f* i el fotosistema I (PSI). Hom considera que la PC conté més del 50% del Cu present al cloroplast (Marschner, 2002). Tot i que la PC és codificada per un gen nuclear, la forma preapoproteica se sintetitza al citosol i és transportada post-traduccionalment a través de la membrana del cloroplast fins al tilacoide, on adquireix el Cu i esdevé hol·loproteïna (Taula I1; Li et al. 1990).

2.2. Toxicitat del coure

Tot i tractar-se d'un element essencial, un excés de Cu lliure resulta perjudicial per a la cèl·lula. Dintre de la sèrie d'Irving-Williams, el Cu^{2+} és considerat com un dels metalls amb major facilitat per generar complexos estables, de manera que, junt amb el Cu^{+}, pot desplaçar els metalls presents als centres actius de proteïnes o bé reaccionar amb les cadenes laterals de cisteïnes, metionines o histidines, amb la conseqüent alteració funcional i estructural de les proteïnes (Ochiai, 1995). Igualment, la inestabilitat dels dos estats redox de Cu (Cu^{+} i Cu^{2+}) també comporta citotoxicitat a causa de la seua capacitat de generar ROS mitjançant les reaccions de Fenton (Eq 1) i Haber-Weiss (Eq 2).

(Eq 1) $Cu^{+} + H_2O_2 \rightarrow {}^{\cdot}OH + Cu^{2+} + OH^{-}$

$Cu^{2+} + O_2^{\cdot -} \rightarrow Cu^{+} + O_2$

(Eq 2) $O_2^{\cdot -} + H_2O_2 \rightarrow {}^{\cdot}OH + O_2 + OH^{-}$

Les ROS difonen per tota la cèl·lula i són capaces de malmenar lípids, proteïnes i àcids nucleics. Les ROS desestabilitzen les membranes cel·lulars degut al fenomen de peroxidació lipídica, procés que es monitoritza a través de l'acumulació de malondialdehid (MDA). Per altra banda, l'alta reactivitat de les ROS pot modificar l'estructura terciària de les proteïnes i desnaturalitzar-les i, en cas d'assolir el nucli, modificar les bases nitrogenades dels àcids nucleics (Figura I2; revisat per Halliwell i Gutteridge, 1984). La citotoxicitat del Cu comporta que la concentració de Cu lliure en les cèl·lules siga indetectable (Rae et al. 1999).

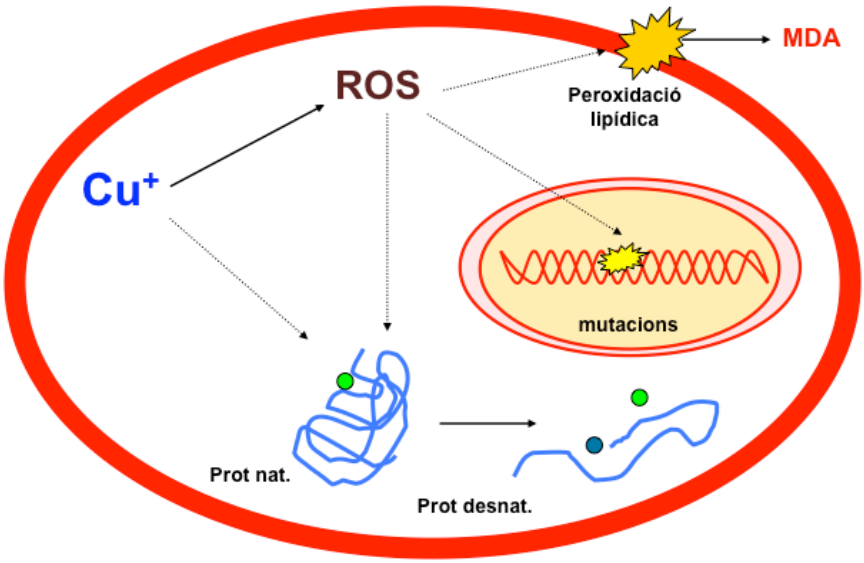


Figura I2: Efecte tòxic del Cu en les cèl·lules. El Cu en forma lliure desplaça els metalls dels centres actius de les proteïnes i genera ROS, les quals malmenen el components de membranes, a causa de la peroxidació lipídica, causen mutacions en el DNA i desnaturalitzen proteïnes.

2.2.1. Respostes a l'excés de Cu en plantes

Per fer front a la citotoxicitat del Cu, les plantes han desenvolupat una sèrie de mecanismes encaminats a la protecció envers l'estrés oxidatiu, la quelació i el segrest del metall. La bateria d'antioxidants de la cèl·lula comprén els carotenoides, l'ascorbat, el glutatió, les activitats SOD, l'ascorbat peroxidasa (APX), catalases, polifenol oxidases, la glutatió peroxidasa i el cicle ascorbat-glutatió. Destaquem les SOD ja que són presents en tots els compartiments cel·lulars on es produeixen ROS. En el grup dels quelants esmentarem les metal·lotioneïnes (MT), proteïnes solubles de menys de 100 aminoàcids riques en cisteïnes capaces de coordinar el Zn, el Cu o el Cd, a través de grups tiol (Cobine et al. 2004), i les fitoquelatines, polipèptids amb un nombre variable de glutations capaços de quelar Cu^+ (Pal i Rai, 2010). Per altra banda, el fet que les plantes d'arròs acumulen depòsits de Cu al vacuol en condicions d'excés del metall fa explícita l'existència d'una estratègia de segrest del Cu en aquest compartiment (Lidon i Henriques, 1999).

Aquestes estratègies de resposta a l'excés de Cu s'estan estudiant en les plantes tolerants, les quals poden crèixer i desenvolupar-se sobre els sòls altament contaminats per metalls pesats. En aquest sentit, *Noccaea caerulescens* (abans *Thlaspi caerulescens*) i *A. halleri* esdevenen els organismes model per excel·lència a l'hora de dur a terme estudis d'hiperacumulació ja que són capaces d'acumular grans quantitats de Ni, Zn i Cd (Krämer, 2010). Pel que concerneix al Cu, la majoria de les espècies acumuladores de Cu són de tipus tolerant, com per exemple *Elsholtzia*

splendens, *Commelina communis* o *Rumex acetosa*, les quals han colonitzat antigues mines a la Xina (Tang et al. 1999). Els avanços en aquest camp permetran entendre millor la ruta homeostàtica dels metalls i dissenyar aplicacions biotecnològiques encaminades a la fitorremediació i tolerància a metalls pesats.

2.3. Simptomes de dèficit i excés de coure en plantes

El Cu està present en forma de Cu^{2+} lliure o acomplexat amb matèria orgànica del sòl. Des del punt de vista de l'agricultura, el fenomen de deficiència de Cu és força estrany, tot i que disposem d'exemples en cultius de cereals en determinades regions d'Europa i Austràlia (Alloway, 2008). El dèficit de Cu es fa palés en plantes crescudes en sòls calcaris, arenosòls, ferrosòls o amb un alt contingut en matèria orgànica i, tant en sòls sobreexplotats com en aquells enriquits en altres metalls. En funció de l'espècie i de l'estat de desenvolupament o òrgan a considerar, hom entén per dèficit de Cu els nivells inferiors a 5 µg/g pes sec (Marschner, 2002). Aquest estat nutricional comporta que les plantes manifesten una simptomatologia caracteritzada pel raquitisme generalitzat, alteracions per clorosi i enroscament en les fulles joves, necrosi del meristema apical, emblanquiment fol·liar, potenciació de les arrels secundàries, manques de lignificació a nivell del cos de la planta i del xilema, marciment de les fulles i alteracions en l'arquitectura de les cèl·lules. A més, la manca de Cu pot causar que les fulles joves es marcesquen, possiblement com a conseqüència d'una disfunció del transport d'aigua degut a la mala lignificació de les parets dels vasos dels xilema. Nogensmenys, comsevulla que el Cu és necessari en teixits reproductius, la manca de Cu té conseqüències negatives

en la formació, desenvolupament i viabilitat del gra de pol·len, en la formació dels fruits, en la viabilitat de les llavors i en el desenvolupament de l'embrió. Aquest últim punt és el més important econòmic ja que afecta la productivitat dels cultius. Tanmateix, l'aplicació de Cu a nivell fol·liar és capaç de revertir els fenotips adès descrits (Marschner, 2002).

Per altra banda, hom associa l'excés de Cu als valors superiors als 20-30 µg/g pes sec. Generalment, les plantes que sofreixen aquestes condicions poblen sòls contaminats o antigues mines de Cu. En aquestes circumstàncies, la simptomatologia que exhibeixen les plantes comprén la inhibició general del creixement de la planta i de la longitud de l'arrel principal en particular, pèrdua de biomassa, problemes de germinació, disminució del nombre de fulles i clorosi per dèficit en Fe (Märschner, 2002). El Cu afecta també l'estabilitat del fotosistema II (PSII) i la de les clorofil·les a causa de la producció de ROS (Bernal et al. 2004). L'excés de Cu també es tradueix en la disminució de la productivitat dels cultius (Märschner, 2002)

3. Trets fonamentals de les xarxes homeostàtiques del coure

La naturalesa dual del Cu ha motivat que els organismes hagen desenvolupat al llarg de l'evolució xarxes homeostàtiques amb una regulació molt acurada per tal de mantindre el metall dins uns rangs òptims. Cal fer palés que els principals elements d'aqueixes xarxes es troben conservats en tots els organismes eucariotes, des de llevats fins a mamífers o plantes superiors (Puig et al. 2002; Puig et al. 2007a).

3.1. La xarxa homeostàtica del coure en *Saccharomyces cerevisiae*

A partir d'aproximacions genètiques i bioquímiques s'ha pogut establir els components principals de la xarxa homeostàtica del Cu en el llevat *Saccharomyces cerevisiae*. En aquest sentit, s'ha estudiat els mecanismes de transport i distribució del Cu a les seues destinacions finals, com es duu a terme l'intercanvi de Cu entre proteïnes i quins són els mecanismes de regulació de l'expressió gènica per Cu.

3.1.1. Adquisició i distribució del coure

En *S. cerevisiae* s'ha descrit un mecanisme d'adquisició de Cu de baixa afinitat a través de les permeases Fet4 i Smf1/2 (Figura I3), les quals presenten un ampli rang de substrats i una K_M, en el cas de Fet4, de l'ordre de 30 μM per al Cu (Hassett et al. 2000; Cohen et al. 2000). També existeix un mecanisme de transport de Cu d'alta afinitat mitjançant els transportadors Ctr1 i Ctr3, les propietats dels quals seran comentades en detall en l'apartat 4. Nogensmenys, el transposó *Ty2* impedeix l'expressió de Ctr3 en diverses soques de llevat. La selectivitat de Ctr1 i Ctr3 pel Cu^+ requereix la reducció del Cu^{2+} extracel·lular per part de les reductases de membrana plasmàtica Fre1 i Fre2 (Figura I3; Dancis et al. 1992; Hassett i Kosman 1995).

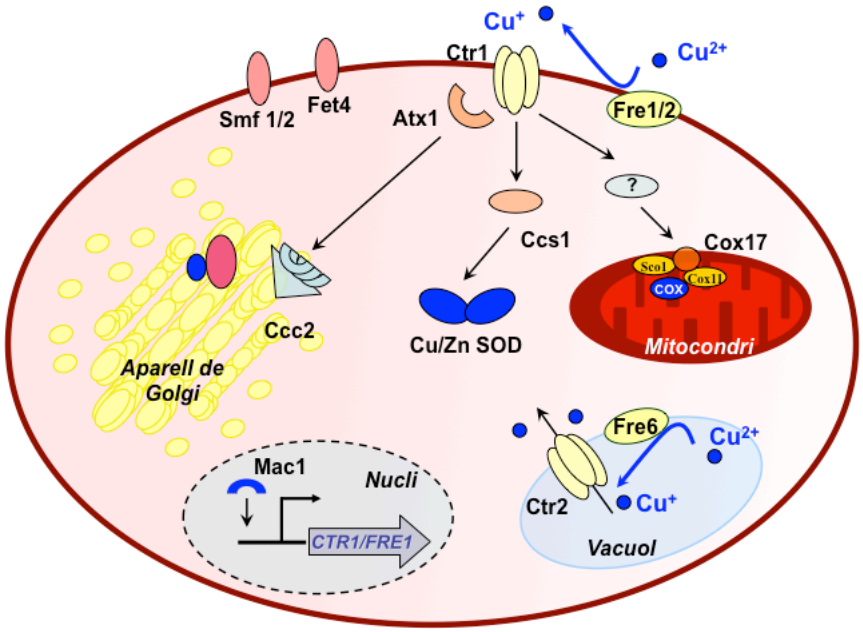


Figura I3: **Esquema de l'homeòstasi del Cu en *Saccharomyces cerevisiae*.** En condicions de dèficit de Cu el factor transcripcional Mac1 indueix l'expressió del transportador d'alta afinitat de Cu Ctr1 i la reductasa Fre1. El Cu^+ arreplegat per les metal·locarabines arriba als acceptors finals a través de 3 rutes de distribució: Atx1 (mitjançant la interacció amb Ccc2, a la ruta de secreció), Ccs1 (Cu/ZnSOD al citosòl) i Cox17 (COX, al mitocondri). A més, a la membrana vacuolar es troba la reductasa Fre6 i el transportador Ctr2, encarregat de mobilitzar-ne les reserves de Cu. També s'hi mostra les permeases de Cu de baixa afinitat Smf1/2 i Fet4.

Atès que el Cu en forma lliure comporta citotoxicitat, un cop a l'interior cel·lular és recollit per un grup de proteïnes solubles de baix pes molecular anomenades metal·locarabines, les quals presenten afinitat pel Cu^+ i s'encarreguen de distribuir-lo a les seues dianes via interaccions proteïna-proteïna. Així, el Cu arreplegat per les metal·locarabines és distribuït a través de tres vies independents en funció de l'acceptor final (Figura I3). (i) La metal·locarabina Atx1 interacciona físicament amb l'ATPasa tipus P_{1B} de l'aparell de Golgi Ccc2, la qual bomba el Cu al lumen per donar-lo a les

proteïnes de la ruta de secreció, com ara la ferroxidasa Fet3. (ii) Ccs1 s'encarrega d'abastir de Cu a la Cu/ZnSOD (Rosenzweig et al. 1999; Bance et al. 2006; Robinson i Winge, 2010), i (iii) la metal·locarabina de l'espai intermembrana Cox17 estaria, possiblement, implicada en la donació del Cu a la COX (Figura I3; revisat per Culotta et al. 1999; Cobine et al. 2006; Puig et al. 2007a; Leary et al. 2009). A més, atesa la vasta quantitat emmagatzemada a la matriu mitocondrial i la capacitat de modular el Cu disponible, el mitocondri es podria considerar com un reservori dinàmic per a la cèl·lula (Leary et al. 2009; Robinson i Winge, 2010).

El metabolisme del Cu i del Fe estan interconnectats a nivell de Fet3, una proteïna homòloga a la ceruloplasmina d'humans, que constitueix, junt amb Ftr1, el transportador de Fe d'alta afinitat a la membrana plasmàtica de llevat. En aqueix punt, el Cu és essencial per dur a terme l'oxidació del Fe abans de ser incorporat a l'interior cel·lular. En conseqüència, la soca mutant de *S. cerevisiae ctr1Δctr3Δ* no pot crèixer en medis deficients en Fe. De la mateixa manera, el creixement de la soca de *S. cerevisiae ctr1Δctr3Δ* en medis amb fonts de carboni no fermentables (etanol i/o glicerol) depén del funcionament de la via de distribució del Cu al mitocondri car l'única via per a la síntesi d'ATP i la regeneració del poder reductor és la cadena de transport d'electrons.

Per altra banda, el vacuol esdevé un compartiment que participa en la regulació del pH i en l'emmagatzematge de diferents metalls, metabòlits i aminoàcids. Junt amb el mitocondri, el vacuol es considera un magatzem de Cu. Tot i que es desconeix les vies d'entrada del Cu al vacuol, en la

literatura s'ha descrit tot un seguit de mutants en la biogènesi vacuolar que mostren una alta sensibilitat en medis amb excés de Cu (Eide et al. 1993; Szczypka et al. 1997) així com diversos membres de la família CTR ubicats a la membrana del vacuol en *Schizosaccharomyces pombe*, *S. cerevisiae* i *Colletotrichum gloeosporoides* (Bellemare et al. 2002; Rees et al. 2004; Barhoom et al. 2008). En *S. cerevisiae*, Ctr2 participa en la mobilització del Cu vacuolar sota condicions de mancança i és capaç de subministrar-lo a les metal·locarabines per garantir el funcionament dels processos dependents de Cu (Portnoy et al. 2001). Probablement, el Cu contingut al vacuol es troba en forma oxidada ja que per a la correcta mobilització és necessària la reductasa Fro6 (Figura I3; Rees et al. 2004; Rees i Thiele, 2007).

3.1.2. Regulació per coure

El llevat *S. cerevisiae* expressa dos factors transcripcionals que regulen l'expressió gènica en funció de les concentracions de Cu a la cèl·lula: Mac1 i Ace1. Ace1 és activat en condicions d'excés de Cu per tal d'induir les metal·lotioneïnes *CUP1* i *CRS5*, i l'enzim *SOD1* (Rutherford i Bird, 2004). Per contra, en dèficit de Cu, s'activa per fosforilació Mac1, el qual indueix tota la maquinària encarregada d'obtindre l'element: els transportadors d'alta afinitat Ctr1 i Ctr3 junt amb les reductases de membrana Fre1 i Fre7 (Figura I3). Mac1 s'uneix al DNA, a nivell dels elements de resposta a Cu (CuRE; seqüència 5'-TTTGC(T/G)C(A/G)-3') presents en múltiples repeticions en tàndem o en repeticions invertides als promotors dels gens diana (Rutherford i Bird, 2004).

3.2. La xarxa homeostàtica del Cu en *Arabidopsis thaliana*

Si bé els trets fonamentals de transport i distribució de Cu descrits per a llevat es troben conservats en plantes superiors, la xarxa homeostàtica de plantes mostra particularitats degudes fonamentalment al fet de tractar-se d'organismes pluricel·lulars i a la presència d'orgànuls específics dependents de Cu, com ara el cloroplast.

3.2.1. Adquisició del Cu i distribució intracel·lular

En condicions de dèficit de Cu, *A. thaliana* es val dels transportadors de Cu d'alta afinitat COPT (de l'anglés, *Copper transporter*) per adquirir aquest metall (Figura I4). De la mateixa manera que hem descrit per a llevat, els transportadors COPT reconeixen únicament l'espècie Cu^+, per tant podria ser necessària l'acció de reductases de membrana plasmàtica, com ara FRO2 o FRO3 (Welch et al. 1993; Chen et al. 2004; Murkherjee et al. 2006). Igualment, un cop a l'interior cel·lular, el Cu és distribuït als acceptors finals a través de metal·locarabines (Figura I4).

En *A. thaliana*, s'ha identificat dos homòlegs a Atx1 de llevat: CCH i AtATX1 (Figura I4). Mentre que ATX1 i l'extrem aminoterminal de CCH són força semblants a ScAtx1, ja que adopten la conformació $\beta\alpha\beta\beta\alpha\beta$ i presenten el domini MxCxxC d'unió a Cu^+, a nivell de l'extrem carboxiterminal de CCH sorprén un domini exclusiu de plantes que confereix a la proteïna una mobilitat electroforètica alterada i la possibilitat

de formar fibril·les com les de les plaques amiloides (Himelblau et al. 1998; Mira et al. 2001a; Mira et al. 2001b; Mira et al. 2004; Puig et al. 2007b).

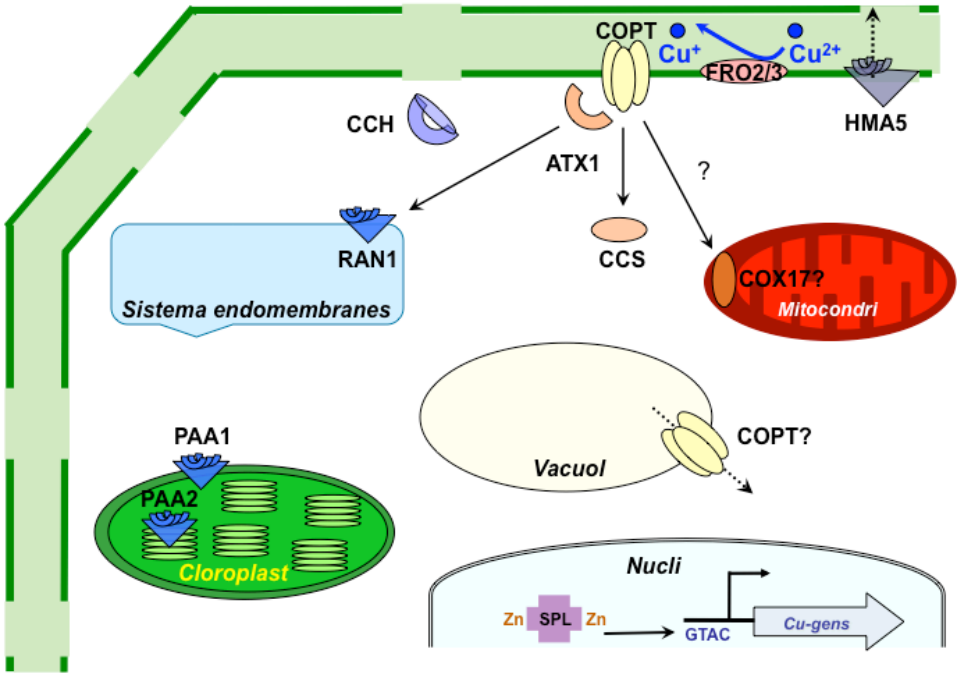


Figura I4: Esquema de la xarxa homeostàtica del Cu en *Arabidopsis thaliana*. En condicions de dèficit de Cu, el factor trancripcional SPL7 esdevé funcional i activa els gens de resposta, entre ells el de la reductasa *FRO3* i els dels transportadors d'alta afinitat *COPT1* i *COPT2*. El Cu^+ entra a la cèl·lula i és recollit per un conjunt de metal·locarabines solubles (ATX1, CCS, COX17, CCH) encarregades de distribuir-lo. En condicions d'excés de Cu, l'ATPasa HMA5 encarregada de bombar el metall a l'exterior. Durant la fase de senescència, CCH podria mobilitzar el Cu envers òrgans emergents. El cloroplast és un orgànul que incorpora el Cu a través de les ATPases PAA1 i PAA2 ubicades a la membrana interna i tilacoïdal, respectivament.

En referència a les ATPases de tipus P_{1B}, mentre que en llevat tan sols se n'ha descrit una, Ccc2, en *A. thaliana* coneixem 4 membres d'aquesta subfamília: RAN1/HMA7, RAN2/HMA5, PAA1/HMA6 i PAA2/HMA8. RAN1/HMA7 s'associa al sistema d'endomembranes i s'encarrega d'abastir

de Cu a ETR1, ubicat al reticle endoplasmàtic (Hirayama et al. 1999). Per altra banda, el patró d'expressió tissular de RAN2/HMA5 es limita a les arrels i a les flors i s'indueix específicament per excés de Cu. De fet els mutants *hma5* acumulen més Cu que les línies silvestres i aturen el creixement de l'arrel, de manera que es postula que HMA5 siga una proteïna que intervé en vies de detoxificació i exportació, sota condicions d'excés de Cu (Andrés-Colás et al. 2006). Els experiments de doble híbrid en llevat amb AtATX1 i amb la variant de CCH sense el domini carboxiterminal mostren que ambdues metal·locarabines són capaces d'interaccionar amb RAN1 i HMA5, cosa que fa pensar que tant AtATX1 com CCH participen en la ruta de secreció i que s'encarreguen de facilitar el Cu als sistemes de detoxificació en condicions d'excés (Andrés-Colás et al. 2006; Puig et al. 2007b).

El cloroplast requereix majoritàriament Cu per a la PC i la CSD2. La PC s'ubica al lumen tilacoidal i és essencial per a la cadena de transport d'electrons fotosintètica (Molina-Heredia et al. 2003; Weigel et al. 2003). PAA1 i PAA2 són ATPases amb homologia estructural i funcional amb els transportadors de Cu dels cianobacteris CtaA i PacS. Així, mentre que PAA1 es localitza a la membrana interna del cloroplast, PAA2 se situa a la membrana tilacoidal (Figura I4; Shikanai et al. 2003; Abdel-Ghany et al. 2005b). La caracterització individual dels mutants *paa1* i *paa2,* i la letalitat del doble mutant *paa1paa2* ha demostrat la importància d'ambdós transportadors per a la distribució de Cu a la PC (Shikanai et al. 2003; Abdel-Ghany et al. 2005b). El fet que la inhibició de la donació del Cu al tilacoide i de l'activitat CSD2 només es produesca en *paa1* suggereix un

model en què PAA1 s'encarregaria d'aportar el Cu necessari a l'estroma per a la CSD2 i la resta seria recollit per PAA2, per transportar-lo al lumen del tilacoide, des d'on seria incorporat a la PC (Shikanai et al. 2003; Abdel-Ghany et al. 2005b). Tot i que a la membrana interna dels cloroplasts s'ubica el transportador HMA1, el paper d'aquesta ATPasa resulta controvertit ja que pertany al grup de transportadors de metalls divalents. Així i tot, el mutants *hma1* manifesten una reducció en el contingut de Cu dels cloroplasts, una disminució en l'activitat SOD general, però cap defecte en la PC (Seigneurin-Berny et al. 2006). En els cianobacteris, Atx1 interactua amb PacS per assegurar la donació de Cu als tilacoides. En canvi, queda per dilucidar si PAA1 i PAA2 interaccionen amb alguna metal·locarabina (Burkhead et al. 2009).

En *A. thaliana* s'ha descrit un únic homòleg de metal·locarabina per a Cu/ZnSOD, CCS. El mutant *ccs* afecta la funcionalitat de les tres isoformes de la Cu/ZnSOD: la citosòlica (CSD1), la cloroplàstica (CSD2) i la del peroxisoma (CSD3) (Abdel-Ghany et al. 2005a; Chu et al. 2005). Malgrat la localització de CCS::GFP al cloroplast, l'existència d'un inici de transcripció alternatiu en CCS explica la distribució del Cu a CSD1 (Chu et al. 2005). D'altra banda, el peroxisoma és capaç d'importar proteïnes plegades amb el cofactor unit (Chu et al. 2005). Malgrat no disposar de dades que impliquen cap mecanisme d'activació de la Cu/ZnSOD independentment de la metal·locarabina escaient, cal destacar que el mutant *ccs* manté uns mínims d'activitat Cu/ZnSOD (Chu et al. 2005).

Pel que fa a la ruta de distribució del Cu a la COX, tot i la identificació de proteïnes homòlogues a ScCox17 en *A. thaliana*, com ara Cox17 (Balandin i Castresana, 2002), hi ha una gran desconeixença sobre el funcionament d'aquesta via de distribució del Cu.

L'aportació de diversos treballs en soja i arròs sobre el paper de magatzem de Cu del vacuol (Lidon i Henriques, 1999; Bernal et al. 2006), junt amb el fet que en els llevats de fissió i gemmació s'hagen descrit membres de la família Ctr a nivell de la membrana del vacuol (Bellemare et al. 2002; Rees et al. 2004) suggereix que el vacuol participe destacadament en l'emmagatzematge i distribució del Cu en plantes.

3.2.2. Adquisició i transport de Cu a nivell de l'arrel

El Cu entra a l'arrel junt amb la resta d'elements disponibles en el substrat a nivell de la zona d'absorció de l'arrel (Fernández i Maldonado, 2000). La taxa d'incorporació d'un metall no és constant al llarg de tota l'arrel ja que minva a mesura que ens allunyen de la zona apical de l'arrel primària (Märschner, 2002). En assolir l'interior de l'arrel, el Cu és distribueix en direcció als feixos vasculars a través de dues rutes: la via simplàstica i l'apoplàstica. En la via apoplàstica s'utilitza l'espai extracel·lular continu entre cèl·lules, de manera que a mesura que els ions avancen poden ser incorporats a l'interior de les cel·lules. En arribar a l'endodermis, els ions topen amb la banda de Caspari, la naturalesa de la qual impedeix l'avanç i força que s'internalitzen. La permeabilitat, selectivitat i composició proteica de la membrana plasmàtica determina els

ions que circulen a través d'aquesta via. En segon lloc, la via simplàstica es val de la continuïtat existent entre els citoplasmes a través dels plasmodesmes. És tracta d'un transport cèl·lula a cèl·lula que permet una distribució des de les capes més externes de l'arrel fins al feix xilemàtic.

3.2.3. Distribució a llarga distància

La distribució del Cu a llarga distància fa referència, majoritàriament, al procés de translocació des de l'arrel cap a la part aèria i a la mobilització durant la senescència i fase reproductiva. El Cu adquirit per l'arrel es distribueix a la part aèria a través del xilema aprofitant el potencial hídric i el fenomen de la transpiració. El fet que les plantes acumulen preferencialment el Cu a les arrels respecte de la part aèria posa de manifest la limitació del procés de translocació. Igualment, la redistribució del Cu a través del floema des dels òrgans magatzem als teixits naixents en condicions de senescència i durant desenvolupament reproductiu s'ha descrit com un procés poc eficient (Mäschner et al. 2002).

Avui dia desconeixem amb exactitud com es duu a terme el transport de Cu a llarga distància i quins són els elements involucrats. Així i tot, disposem d'evidències que ens permeten albirar com podria efectuar-se el procés. En primer lloc, CCH podria recòrrer la via simplàstica a través dels plasmodesmes (Mira et al. 2001a). En base al fenotip d'acumulació de Cu a les arrels dels mutants *hma5* es postula que l'ATPasa HMA5 estiga encarregada de translocar el Cu de les arrels cap als feixos conductors (Andrés-Colás et al. 2006).

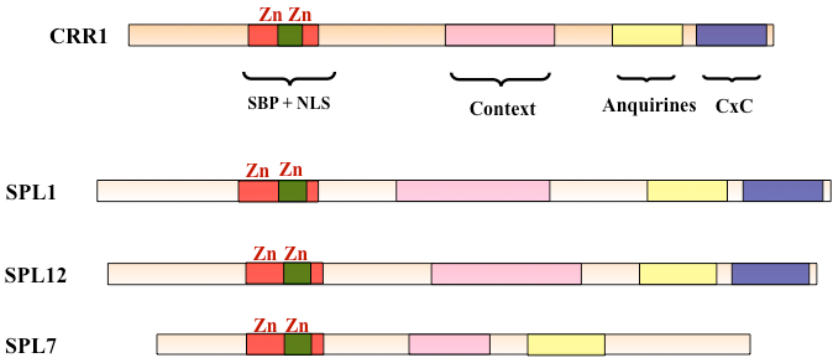
Un altre procés a resoldre és la forma en què el Cu viatja en la saba i quins són els acompanyants. Tant CCH com HMA5 transporten Cu^{+}, ara bé, la participació de molecules capaces de generar complexos, com el sistema de MT, fitoquelatines o glutatió, implicaria la possibilitat de transportar Cu^{2+}. Aquest és el cas de la molècula de nicotianamina (NA), la qual esdevé un candidat ideal per al transport de Cu^{2+} a llarga distància via xilema i floema ja que el complex NA-Cu^{2+} és estable a pH lleugerament àcid, cosa que el situa com a potencial quelant apoplàstic i simplàstic (Curie et al. 2009). A més, els fenotips dels mutants de tomata per a la NA sintasa i la funció dels transportadors YSL (de l'anglés *Yellow Stripe-like*) apunten a què la NA jugue un paper clau en la distribució i transport del Cu a llarga distància (Pich et al. 2001; Yen et al. 2001; DiDonato et al. 2004; Cassin et. 2009; Curie et al. 2009).

3.2.4. Regulació per coure

Durant els darrers anys s'ha produït un avenç considerable en el camp de la regulació de l'expressió gènica per dèficit de Cu, fruit de les publicacions en aqueixa àrea (Kropat et al. 2005; Yamasaki et al. 2008; Yamasaki et al. 2009). En condicions de mancança de Cu, l'estratègia seguida per l'alga *Chlamydomonas reinhardtii* consisteix a fer un ús preferent del Fe, de manera que les hemoproteïnes substitueixen funcionalment les cuproproteïnes. El factor transcripcional CRR1 de *C. Reinhardtii* activa l'expressió de *CPX1,* involucrat en la biosíntesi del grup hemo i *CYC6* per a la COX c_6, per tal de substituir la PC (Quinn i Merchant, 1995; Quinn et al. 1999). Les dianes de CRR1 presenten a nivell dels promotors motius de

seqüènica GTAC, anomenats elements de resposta a Cu (CuRE, de *Cu Response Element*; Quinn et al. 2000).

A



B

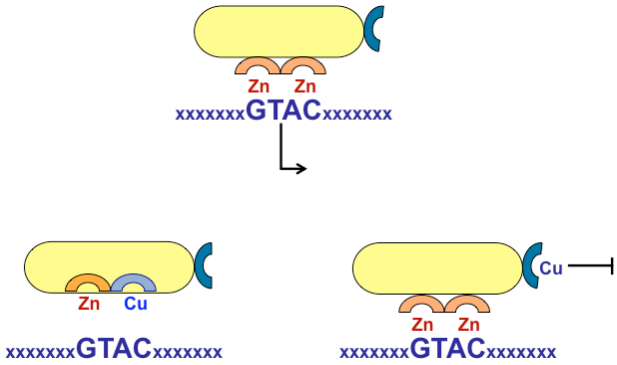


Figura I5: Disposició dels dominis i mecanisme d'acció de CRR1 de *Chlamydomonas reinhardtii*. A) Esquema de Crr1 amb els dominis SBP (roig), el senyal NLS (verd), la seqüència context (rosa), les repeticions d'anquirines (groc) i els dominis de cisteïnes (blau). Es compara la seqüència de Crr1 amb la de SPL1, SPL12 i SPL7 d'*A. thaliana*. **B)** Hipotètic model de funcionament de Crr1. La vinyeta superior mostra com en dèficit de Cu els dominis d'unió a DNA (taronja) són ocupats per Zn, de manera que es dóna un canvi conformacional que permet reconèixer els CuRE i reclutar la maquinària de transcripció. A les vinyetes inferiors s'explica que en presència de Cu, o bé aquest ocupa un dels llocs d'unió de Zn i impedeix el reconeixement de les CuRE o bé s'uneix al domini de cisteïnes (blau) per impedir que interaccione la maquinària de transcripció. Modificat de Kropat et al. 2005.

Estructuralment, CRR1 disposa d'un domini d'unió de tipus SBP (*SQUAMOSA promoter-Binding Protein*) que conté motius d'unió al DNA dependents de Zn i un senyal de localització nuclear (NLS) solapant. A més, destaca un conjunt de repeticions de tres motius d'anquirines, una seqüència context i un motiu de cisteïnes a nivell de l'extrem carboxiterminal (Figura I5A; Kropat et al. 2005). Es postula que en condicions de dèficit de Cu la proteïna migra vers el nucli i pot interaccionar amb les CuRE dels promotors perquè s'expressen els gens escaients, mentre que en excés de Cu, el metall s'uniria a CRR1 i impediria o bé el reconeixement dels CuRE o bé el reclutament de la maquinària transcripcional per induir la resposta gènica (Figura I5B; Birkenbihl et al. 2005).

En *A. thaliana*, la família SPL (*SQUAMOSA Promoter-binding Like*) integra 16 proteïnes amb un domini SBP similar al de CRR1 de *C. Reinhardtii*, d'entre les quals, SPL1 i SPL12 són els membres amb major grau d'identitat i SPL7 la que presenta una major similitud a nivell del domini SBP (Figura I5A). En *A. thaliana* les seqüències *cis* reconegudes per les SPL contenen motius GTAC i són presents en els promotors de gens que s'expressen en deficiència de Cu, com ara *COPT1* o *COPT2*, els microRNA398 i la *FSD1* (Nagae et al. 2008; Yamasaki et al. 2009). Recentment, s'ha publicat que en condicions de dèficit de Cu, el mutant *spl7* no expressa els microRNA398 i, a més, tampoc indueix els gens dels transportadors *COPT1*, *COPT2*, *ZIP2* i *YSL2*, el de la reductasa *FRO3*, els de les metal·locarabines *CCH* i *CCS* i el de la *FSD1* (Yamasaki et al. 2009). Aquest fet indica que SPL7 pot considerar-se la peça central en la regulació

dels gens de resposta a dèficit de Cu via la interacció directa amb els elements GTAC dels promotors (Figura I7).

Els cloroplasts economitzen el Cu mitjançant el balanç entre l'expressió de CSD2 i FSD1. En condicions de dèficit de Cu, a nivell de l'estroma del cloroplast, l'activitat superòxid dismutasa es deu a FeSOD, mentre que l'expressió de la *CSD2* és inhibida. D'aquesta manera, els mínims disponibles de Cu van a parar a la PC per assegurar-ne el funcionament. Tanmateix, en condicions de suficiència i excés de Cu, tant l'activitat de Cu/ZnSOD com l'expressió de la carabina associada, CCS, es veuen incrementades en detriment de FeSOD (Abdel-Ghany et al. 2005a; Birkenbihl et al. 2005). En aquestes circumstàncies, tant la Cu/ZnSOD com la PC esdevenen funcionals i, a més, permeten estalviar el Fe per a altres processos (Figura I6; Abdel-Ghany et al. 2005b).

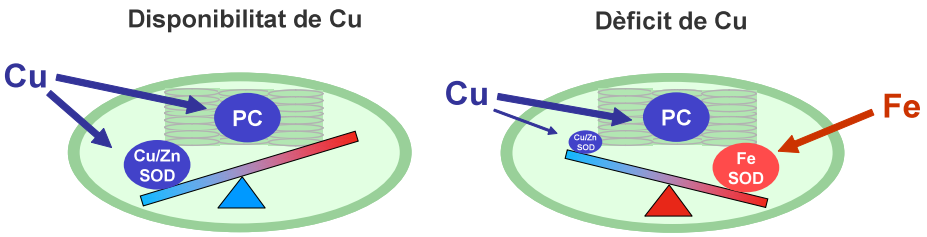


Figura I6: Regulació de l'activitat SOD en el cloroplast. En condicions de disponibilitat de Cu la PC i la Cu/ZnSOD s'abasteixen del metall. Per contra, en dèficit de Cu la distribució del metall es dóna preferencialment cap a la PC en detriment de l'activitat Cu/ZnSOD. L'activitat SOD és suplida per la isoforma de Fe (FeSOD). Adaptat de Puig et al. 2007

Com hem esmentat adés, l'expressió de l'mRNA de *FSD1* en condicions de dèficit de Cu depén del factor transcripcional SPL7 via el reconeixement

dels motius GTAC del seu promotor. En canvi, la inhibició de l'expressió de la *CSD1* i *CSD2* implica la participació de microRNA. Els microRNA són un conjunt d'RNA de seqüència curta que actuen en *trans* per tal de regular post-transcripcionalment l'expressió gènica de les seues dianes, ja sia a través de la degradació directa de l'RNA missatger mitjançant el sistema Dicer-RISC, a través de la inhibició de la traducció o de modificacions en el DNA (Bonnet et al. 2004; Jones-Rhoades i Bartel, 2004; Tang i Zamore 2004). Concretament, els membres de la família de miR398 (miR398a-c), els quals posseeixen motius GTAC a nivell dels promotors i estan regulats a través de SPL7, s'encarreguen de degradar els mRNA de *CSD1*, *CSD2* i *CCS* en dèficit de Cu (Figura I7; Yamasaki et al. 2007; Dugas i Bartel, 2008; Beauclair et al. 2010).

D'altra banda, existeix un altre grup de microRNA que contenen a nivell dels seus promotors motius GTAC, de manera que la seua expressió està supeditada al factor transcripcional SPL7. Aquest grup està format pel miR397, miR408 i miR857, i participa en la regulació de les cuproproteïnes plantacianina i lacases. El fet que tots tres microRNA, junt amb miR398, reconeguen els mRNA de cuproproteïnes com a dianes i que s'acumulen en condicions de dèficit de Cu i desapareguen en presència de nivells suficients de Cu fa que se'ls anomene Cu-microRNA (Burkhead et al. 2009).

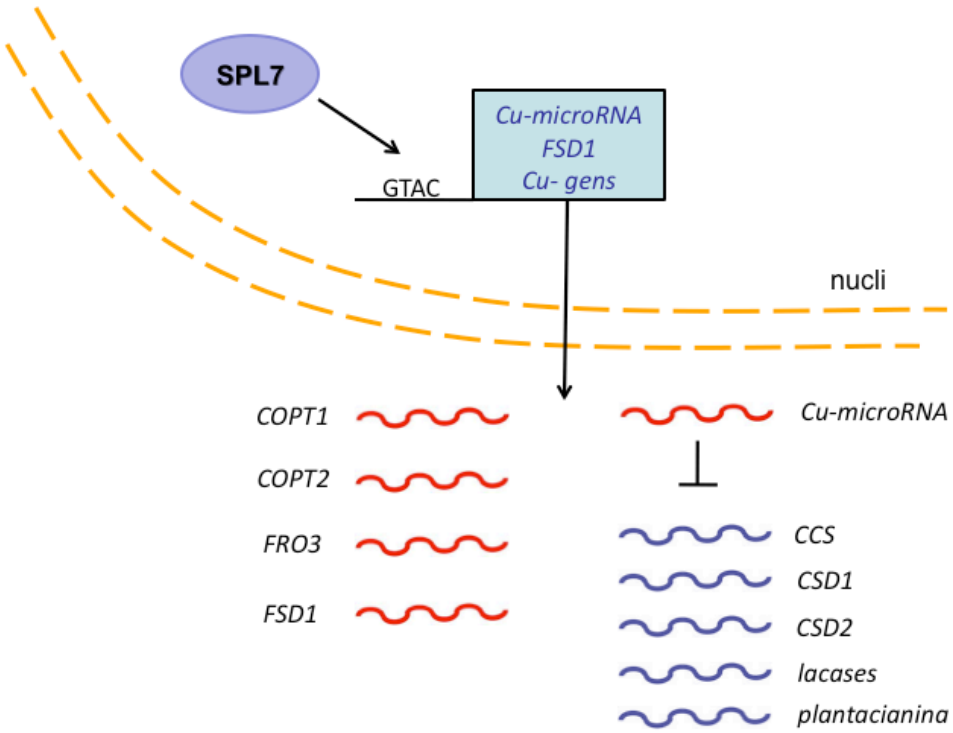


Figura I7: Sistema de regulació per dèficit de Cu. En condicions de dèficit de Cu el factor transcripcional SPL7 esdevé funcional i s'ubica al nucli, des d'on reconeix els motius GTAC dels promotors dels gens dels Cu-miRNA, els quals reconeixen regions en *cis* dels mRNA de la metal·locarabina *CCS*, de les Cu/ZnSOD, lacases i plantacianina. Per altra banda, SPL7 indueix el gen de la *FSD1*, dels transportadors *COPT1* i *COPT2*, la reductasa *FRO3* ja que també presenten motius GTAC als seus promotors.

En general, podem afirmar doncs, que la regulació dels gens involucrats en la xarxa homeostàtica del Cu en plantes es dóna a dos nivells. El primer nivell el constitueix la família de factors transcripcionals SPL, els quals indueixen els gens de resposta a condicions de dèficit de Cu. Entre els gens regulats s'inclou els Cu-microRNA, els quals representen un segon nivell de regulació, ja que degraden els mRNA dels gens que s'inhibeixen per dèficit del metall. Fem palés que, a diferència del que ocorre amb la regulació de l'homeòstasi d'altres metalls, els Cu-miRNA no afecten exclusivament les

proteïnes involucrades en l'adquisició de metall sinó que també reprimeixen un grup ampli de cuproproteïnes. Tenint en compte l'alta reactivitat i afinitat del Cu per les seues dianes, aquesta estratègia permetria optimitzar la disponibilitat del Cu (Burkhead et al. 2009).

4. Els transportadors de coure de tipus CTR

Abans d'encetar aquest apartat volem matisar la terminologia que hem emprat en el present treball per a anomenar les proteïnes de la família CTR. Els sistemes de transport es classifiquen, des del punt de vista bioenergètic, en canals i transportadors. Malgrat la falta de consens, la definició de proteïnes tipus canal inclou totes aquelles que realitzen un transport a favor de gradient de potencial electroquímic, considerablement ràpid, a través d'un únic porus d'entrada, generalment selectiu. Per altra banda, les proteïnes tipus transportador impliquen canvis conformacionals i el consum d'energia per efectuar el transport, moltes vegades en contra de gradient de potencial electroquímic, amb taxes més lentes que en els canals (Gadsby, 2004). Tot i que les sigles Ctr/COPT signifiquen "transportador de Cu", tal i com descriurem més endavant, l'alta afinitat i especificitat pel Cu^+ i la independència de mecanismes actius suggereix que es tracta de "canals" o "permeases" (Aller i Unger, 2006; Robinson i Winge, 2010). En el present treball però, ens referirem a les proteïnes de la família CTR com a "transportadors" seguint la traducció literària de l'anglés.

4.1. Especificitat dels transportadors tipus CTR pel Cu^+

Els estudis d'incorporació de ^{64}Cu en cultius de cèl·lules de mamífers i llevat han permés concloure que els membres de la família CTR són transportadors d'alta afinitat per al Cu^+ amb una K_M de l'ordre d'1-5 μM (Dancis et al. 1994; Lee et al. 2002). El fet que tan sols la Ag^+, metall isoelèctric al Cu^+, puga competir amb el ^{64}Cu a l'hora de mesurar la incorporació de Cu en llevats i la necessitat de reductases indica que els transportadors que estudiem presenten una alta especificitat i selectivitat per la forma Cu^+ (Hassett i Kosman 1995; Lee et al. 2002). A més, l'efecte inductor de l'ascorbat en el transport de Cu quan les reductases no estan actives, la disminució del transport de Cu en presència del quelant de Cu^+ extracel·lular BCS (àcid 2,9-dimetil-4,7-difenil-1,10-fenantrolina disulfònic) i el fet que no s'haja detectat afinitat pel Cu^{2+} en el motiu MxxM, constitueixen unes altres evidències de la selectivitat dels transportadors CTR pel Cu^+ (Hassett i Kosman 1995; Dancis et al. 1994; Jiang et al. 2005).

4.2. Trets estructurals i funcionals dels transportadors tipus CTR

4.2.1. Topologia dels transportadors tipus CTR

Els transportadors de Cu tipus CTR són proteïnes integrals de membrana conservades en tots els eucariotes. Els perfils d'hidrofobicitat dels transportadors de Cu de la família CTR indiquen l'existència de 3 dominis transmembrana anomenats TMD1, TMD2 i TMD3 on rau la màxima similitud de seqüència entre els transportadors ScCtr1, ScCtr3, hCtr1, mCtr1

i AtCOPT1. En comparar-los, s'hi evidencia una organització bàsica que inclou, a més dels 3 segments transmembrana, un seguit de motius rics en metionines a la zona aminoterminal, una metionina prop del TMD1, un motiu MxxxM (on x és qualsevol aminoàcid) al TMD2, un motiu GxxxG en el TMD3 i motius rics en cisteïnes a l'extrem carboxiterminal (Figura I8; Puig et al. 2002; Nose et al. 2006).

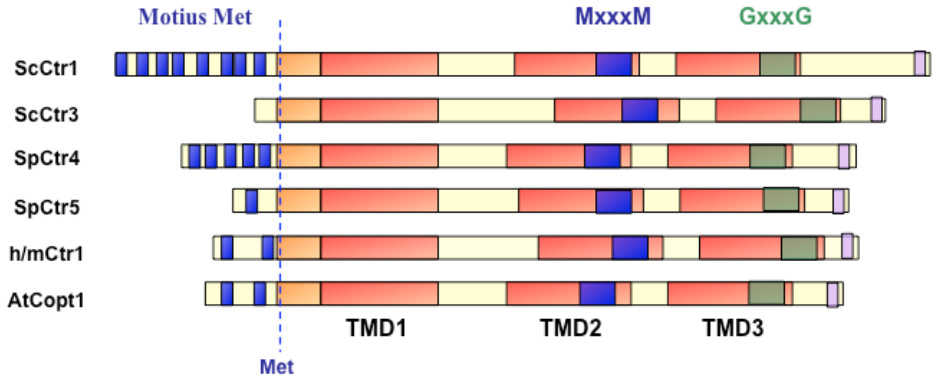


Figura I8: **Esquema de l'aliniament de diferents transportadors de coure d'alta afinitat tipus CTR**. Les proteïnes esquematitzades són les de llevat de gemmació (ScCtr1 i ScCtr3), de llevat de fissió (SpCtr4 i SpCtr5), de mamífers (h/mCtr1) i d' *A. thaliana* (AtCOPT1). S'hi representen els segments transmembrana (roig), un tram de 20 aminoàcids on no mai s'hi observa cap metionina (taronja), una metionina essencial i motius de metionines de la zona aminoterminal (Met i requadres blaus), el motiu MxxxM del TMD2 (requadre blau), el motiu GxxxG (verd) i els CxC (lila). Modificat de Puig i Thiele 2002.

La digestió amb proteases extracel·lulars de transportadors etiquetats amb epítops va permetre establir la topologia de la proteïna Ctr1 de llevat en la membrana plasmàtica: l'extrem carboxiterminal roman a l'interior de la cèl·lula mentre que l'aminoterminal s'exposa al medi extracel·lular (Figura I9A; Puig et al. 2002). Tanmateix, s'ha descrit transportadors d'aquesta família a la membrana del vacuol en *S. cerevisiae*, *S. pombe* i *C. Gloeosperoides* que s'encarreguen de mobilitzar les reserves de Cu

emmagatzemades en condicions de dèficit del metall (Bellemare et al. 2002; Rees et al. 2004; Barhoom et al. 2008).

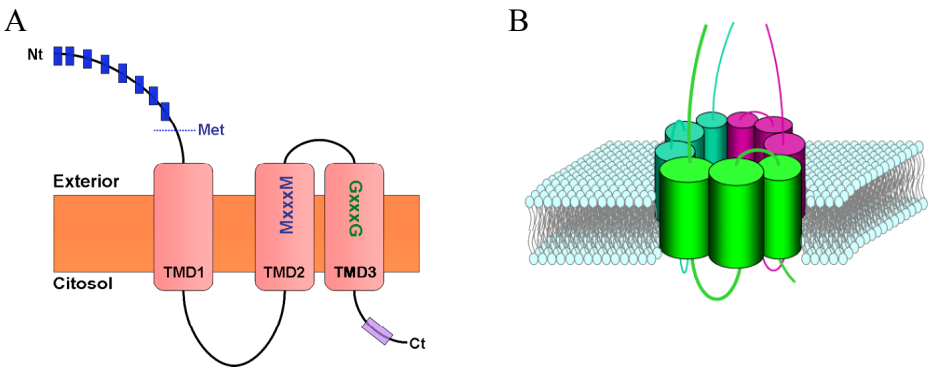


Figura I9: **Topologia del transportador ScCtr1**. **A)** Monòmer Ctr1 amb els 3 TMD i els motius rics en metionines (requadres blaus), la metionina conservada a l'aminoterminal (Met) i els motius MxxxM, GxxxG i CxC (requadre lila). **B)** Disposició d'un trímer de ScCtr1 en la membrana plasmàtica.

Comsevulla que els transportadors de Cu de la família CTR no presenten un tamany suficientment gran com per constituir *per se* un vertader por a través de què introduir el Cu, els monòmers han de trimeritzar, tal i com es desprén dels experiments d'entrecreuament de proteïnes (*crosslinking*) i de coimmunoprecipitació (Pena et al. 2000; Dancis et al. 1994; Lee et al. 2002). De fet, la coexpressió de diferents variants del gen Sc*CTR1* amb diferents mutacions en la soca *ctr1Δctr3Δ* complementa els problemes de creixement del mutant, fet que demostra que els monòmers col·laboren a l'hora d'establir el transportador (Figura I9B; Puig et al. 2002).

4.2.2. Elements essencials en els transportadors tipus CTR

Les metionines, tot i ser aminoàcids poc freqüents en la coordinació del Cu^+, mantenen la capacitat coordinadora dintre d'un rang de pH entre 3.5 i 7, són més resistents a l'oxidació que les histidines i cisteïnes i, per tant, constitueixen els motius més selectius per a Cu^+ en el medi extracel·lular. (Jiang et al. 2005; Rubino et al. 2010). De fet, d'entre tots els elements conservats en família de transportadors CTR, els dos únics elements essencials són una metionina concreta del domini aminoterminal i el motiu MxxxM del TMD2.

En tots els transportadors tipus CTR destaca la presència d'una metionina a aproximadament 20 aminoàcids del TMD1 que esdevé única en aqueix tram. En el cas de Ctr1 de llevat, la mutagènesi dirigida d'aquest aminoàcid a alanina, leucina o serina impedeix el creixement correcte de la soca *ctr1Δctr3Δ* en un medi amb font de carboni no fermentable i, a més, les taxes d'incorporació de ^{64}Cu disminueixen dràsticament (Puig et al. 2002). En canvi, la mutació d'aqueixa metionina per una cisteïna o histidina no afecta ni el creixement ni la incorporació de ^{64}Cu en el mutant. Atès a les capacitats coordinadores de Cu de la metionina i a la localització extracel·lular, es postula que aquesta metionina jugue un paper clau a l'hora de captar el Cu extracel·lular (Figura I8; 9A; Puig et al. 2002; Jiang et al. 2005).

Pel que fa a l'altre motiu essencial, l'expressió en *ctr1Δctr3Δ* de mutacions dirigides en el MxxxM del TMD2 en què una de les metionines

(M260) de ScCtr1 és bescanviada per alanina o serina, comporta la disfuncionalitat del transportador mentre que el reemplaçament a cisteïna recupera parcialment la funcionalitat de la proteïna (Puig et al. 2002; Puig i Thiele 2002). Aquest domini es disposa en el TMD2 envers la cara extracel·lular, la qual cosa fa pensar que estiga encarregat de coordinar el Cu que reba de l'extrem aminoterminal (Figura I8; I9A; Nose et al. 2006).

4.2.3. Altres consideracions estructurals

Pel que concerneix a la resta de residus conservats, a nivell de la zona aminoterminal és habitual trobar motius rics en metionines (i/o histidines i cisteïnes) tipus MxxM o MxM, disposats envers la vessant extracel·lular (Figura I8; I9A). El fet que en *S. cerevisiae* l'expressió de transportadors Ctr1 sense els motius de metionines exhibesquen problemes de creixement, i en medis amb fonts de carboni no fermentables i suplementats amb BCS, manifesten una reducció d'una tercera part en les taxes d'incorporació de ^{64}Cu suggereix aquests motius en metionies optimitzen la captació del Cu extracel·lular (Puig et al. 2002).

El motiu GxxxG del TMD3 sembla estar implicat en el manteniment estructural ja que la seua deleció causa la deslocalització de la proteïna i n'impossibilita la multimerització. A més, diferents estudis apunten que aquest motiu podria participar en la modulació del por o fer de senyal de localització (Aller et al. 2004; Aller i Unger 2006; Nose et al. 2006).

A nivell de l'extrem carboxiterminal, envers la vessant citosòlica, és habitual un motiu en cisteïnes tipus CxC que podria participar en la coordinació del Cu entrant. L'expressió en la soca de llevat *ctr1Δ* d'una variant de ScCtr1 amb la deleció dels últims 106 aminoàcids de l'extrem carboxiterminal causa hipersensibilitat al Cu, fet que suggereix que l'extrem carboxiterminal puguera jugar un paper de sensor a través del Cu unit a CxC i, així, desencadenar un canvi estructural per impedir la incorporació de més Cu (Wu et al. 2009). Nogensmenys, en hCtr1 s'assumeix que CxC s'encarregaria de l'estabilització mitjançant ponts disulfur de les subunitats dels transportadors (Eisses i Kaplan 2005).

4.2.4. Estructura tridimensional del transportador hCtr1

Gran part del creixent interés per l'estudi dels transportadors de Cu d'alta afinitat d'humans es deu a què hCtr1 és el responsable de la interioritzaciò del principal fàrmac dissenyat per combatre el càncer d'ovari, la cisplatina (Ishida et al. 2002; Holzer et al. 2004; Larson et al. 2010).

Recentment s'ha publicat tot un seguit d'estudis centrats en l'estructura del transportador d'humans hCtr1, d'entre els quals destaquem la resolució de 7 Å en el plànol de la membrana i 15 Å en el vertical (De Feo et al. 2009). Els trímers de transportadors hCtr1 s'empaqueten en disposició cua-cua (*tail-to-tail*) i estableixen una mida del transportador de 85 x 45 x 45 Å amb una regió corresponent a les alfa-hèlixs transmembrana de 30 Å. L'empaquetament de les hèlixs permet que el transportador adopte una disposició cònica definida per TMD2, de manera que a la vessant

extracel·lular el diàmetre del por fa 8 Å, però s'eixampla fins a 22 Å a la cara citosòlica (Figura I10). A nivell dels TMD2, els 3 dominis MxxxM es mostren encarats i la histidina H139 manté la interacció entre monòmers. (De Feo et al. 2009).

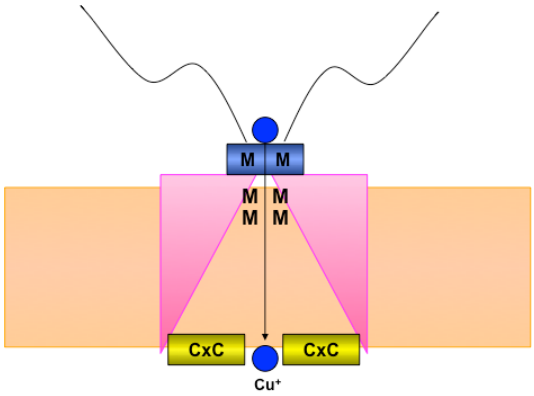


Figura I10: Secció longitudinal del transportador hCtr1. S'esquematitza la disposició cònica del por de hCtr1 i el posicionament dels diferents residus de metionines (M) i els CxC, junt amb el flux d'entrada del Cu. Modificat de De Feo i col·laboradors (2009).

Degut a la baixa resolució que s'obté en el treball anterior en algunes regions del transportador, els mateixos autors opten per bescanviar tota una col·lecció de residus per triptòfans (*Trp-scanning*) en hCtr1 i ScCTR3 per determinar la importància de nous residus des del punt de vista estructural. En ambdues proteïnes les substitucions afecten posicions similars, fet que palesa la conservació estructural entre dues proteïnes distants que pertanyen a la mateixa família. A més d'identificar-se residus involucrats en l'empaquetament de les hèlixs o en l'obertura del por, algunes de les posicions sensibles al bescanvi afecten residus ubicats a la vessant extracel·lular. Segons els autors, aquest fet implicaria la possible interacció

entre diferents trímers hCtr1 o entre transportadors hCtr1 i altres proteïnes de membrana relacionades amb la regulació o l'homeòstasi del Cu (De Feo et al. 2010).

4.3. Model funcional dels transportadors tipus CTR

En base a tot el que hem descrit fins al moment, la direccionalitat del transport que efectuen els transportadors tipus CTR és des del medi extracel·lular cap al citosol. Tot i que no s'ha descrit que estiguen acoblats a cap mecanisme de consum d'ATP cal destacar que s'ha suggerit la possibilitat de què requeresquen un gradient de K^+ per estimular el transport (Lee et al. 2002).

Segons De Feo i col·laboradors (2009; 2010), els motius extracel·lulars tenen un pes estructural, de manera que regulen l'entrada del metall ja que contribueixen a la selectivitat pel Cu^+ i eviten la competència amb altres metalls. Un cop captat, el Cu^+ es mou a través del por mitjançant un joc de coordinacions amb les metionines de MxxxM del TMD2. Les histidines o les cisteïnes del domini de CxC de l'extrem carboxiterminal s'encarregarien de generar un flux termodinàmicament favorable per a l'entrada del Cu a la cèl·lula (Figura I10; De Feo et al. 2009; De Feo et al. 2010). L'estructura que es descriu per al transportador d'humans esdevé força original, ja que són pocs els transportadors d'influx que constitueixen un por mitjançant tres subunitats monomèriques. S'associa aquesta estructura a què les taxes de transport de hCtr1 no mai poden ser ràpides a causa de l'alta citotoxicitat del Cu. L'enlentiment en el transport possiblement permeta assegurar la

distribució del Cu a les metal·locarabines involucrades o agents quelants implicats i així evitar-ne l'acumulació (Aller i Unger 2006; Nose et al. 2006).

Així doncs, el transportador sembla ideal per a un mecanisme en què es mimetitza els estats de transició del metall que es donen en les reaccions d'intercanvi entre el Cu intracel·lular i les metal·locarabines i els seus acceptors. El moviment, cinèticament controlat del Cu a través del transportador, explicaria la independència de la hidròlisi d'ATP.

4.4. Transportadors de coure de tipus CTR en *Arabidopsis thaliana*: la família COPT

El gen *COPT1* d'*A. thaliana*, que pertany a la família CTR, és capaç de complementar el defecte de creixement en medis no fermentables de la soca de *S. cerevisiae ctr1Δctr3Δ* (Kampfenkel et al. 1995). L'aliniament de seqüència amb COPT1 i els estudis de complementació de la soca *ctr1Δctr3Δ* ha permés identificar uns altres 4 membres (COPT2-5) que s'agrupen en tres subfamíles: (1) COPT1 i COPT2, (2) COPT3 i COPT5 i (3) COPT4 (Figura I11; Sancenón et al. 2003). Els motius per què s'estableix aquesta classificació són: (i) en base a la complementació en medis no fermentables de la soca *ctr1Δctr3Δ* de *S. cerevisiae* hi distingim un grup de transportadors que complementen completament (COPT1 i COPT2) i un segon grup de complementació en menor grau (COPT3 i COPT5). COPT4 ha sigut descartat com a transportador de Cu per no presentar les metionines essencials (Sancenón et al. 2003). A més, cal fer palés que

COPT4 comporta toxicitat i impedeix l'obtenció de transformants de llevat viables (Sancenón et al. 2003). (ii) COPT1 i COPT2 contenen dos motius rics en metionines i histidines a l'extrem aminoterminal, mentre que el grup de COPT3 i COPT5 només en presenta un. (iii) *COPT1* i *COPT2* són gens regulats per Cu, mentre que *COPT3* i *COPT5* escapen a aquesta regulació (Sancenón et al. 2003). (iv) La incorporació de ^{64}Cu en els mutants complementats indica que els transportadors que n'incorporen una major quantitat són COPT1 i COPT2, mentre que COPT3 i COPT5 redueixen la seua taxa un 30% i 70%, respectivament (Sancenón et al. 2003).

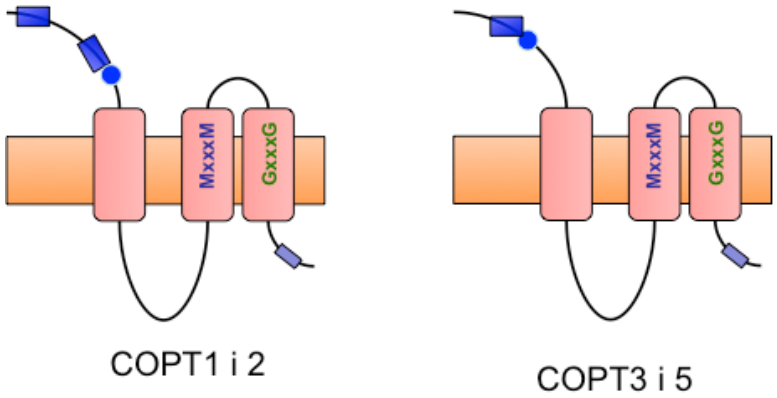


Figura I11: Classificació dels membres de la família COPT d'*Arabidopsis thaliana*. Es representa la metionina essencial (cercle blau), els dominis rics en metionines (requadre blau), el motiu MxxM (blaus), el motiu GxxxG (verd) i el motiu CxC (lila) en els grups de transportadors COPT. En el grup de COPT3 i COPT5 es representa COPT5.

La suma de totes aquestes dades fa pensar que els transportadors del primer grup (COPT1 i COPT2) es podrien localitzar a nivell de la membrana plasmàtica, mentre que el segon grup (COPT3 i COPT5) quedarien relegats a compartiments intracel·lulars (Sancenón et al. 2003).

4.4.1. El transportador d' *Arabidopsis thaliana* COPT1

El primer transportador de Cu a caracteritzar-se en la planta model *A. thaliana* fou COPT1 (Kampfenkel et al. 1995; Sancenón et al. 2004). La complementació total de la soca *ctr1Δctr3Δ* i la incorporació de ^{64}Cu en altes taxes en expressar-hi *COPT1* junt amb la localització de COPT1::GFP a la membrana plasmàtica de protoplasts d'*A. thaliana* indica que COPT1 és un transportador de membrana plasmàtica (Sancenón et al. 2003; Andrés-Colás et al. 2010).

La fusió del promotor de *COPT1* a la proteïna marcadora β-glucuronidasa (GUS) mostra un patró d'expressió que comprén l'embrió i el gra de pol·len (Sancenón et al. 2004). En plàntules de 7 dies, *COPT1* s'expressa a la part apical de l'arrel a nivell del còrtex i l'epidermis, de manera que COPT1 participaria en la incorporació del Cu del medi exterior (Sancenón et al. 2004).

La caracterització dels mutants *copt1* antisentit i dels sobreexpressors de *COPT1* ha permés esbrinar les aportacions del transportador i valorar el pes que té en la xarxa homeostàtica del Cu. Tot i que fenotípicament els mutants *copt1* antisentit no manifesten diferències aparents respecte de les variants silvestres, en fer-los crèixer en medis deficients en Cu amb sacarosa, les plàntules experimenten una reducció del pes fresc d'entre el 30 i el 40%. Per altra banda, en medis sense sacarosa, les arrels s'allarguen entre 3 i 6 vegades més que en les plantes silvestres probablement amb l'objectiu de poder explorar nous substrats (Sancenón et al. 2004). En planta adulta, a

nivell de fulles, es produeix un descens d'entre el 40 i el 60%, tant en el contingut de Cu endogen, com en el transport de ^{64}Cu respecte de les variants silvestres, i el 10-13% dels grans de pol·len del mutant *copt1* antisentit presenten alteracions morfològiques (Sancenón et al. 2004). Com que els fenotips descrits tan sols són revertibles amb Cu, es demostra que són fruït del dèficit de Cu que experimenta el mutant (Sancenón et al. 2004).

Recentment, s'ha publicat que les plantes sobreexpressores de *COPT1* manifesten una simptomatologia associada a l'excés de Cu: reducció del tamany general, fulles enroscades, clorosi i disminució de la producció de llavors. A més, en plàntules crescudes en medis *in vitro* suplementats amb Cu es palesa una reducció significativa de l'arrel principal així com la pèrdua de biomassa. L'alta sensibilitat pel Cu que es desprén d'aquests fenotips corrobora la participació de COPT1 en l'adquisició i incorporació del Cu en la planta i la importància de mantindre regulada la xarxa homeostàtica del Cu (Andrés-Colás et al. 2010).

Tot plegat, la suma de totes les dades aportades fa pensar que COPT1 siga una de les principals vies d'entrada del Cu al corpus de la planta i que tinga un paper clau en la distribució i repartiment del Cu al llarg de tota la vida de la planta, des dels primers estadis del desenvolupament embrionari fins a la formació de les cèl·lules espermàtiques.

OBJECTIUS

El primer objectiu de la present tesi és la caracterització de marcadors moleculars associats amb l'estat nutricional de dèficit de Cu per a plàntules d'*A. thaliana* crescudes en medis de laboratori amb diferent disponibilitat del metall.

En organismes eucariotes, els transportadors de Cu d'alta afinitat CTR participen en el procés d'incorporació del metall sota condicions de dèficit de Cu. En *A. thaliana*, a més dels 5 transportadors de Cu d'alta afinitat identificats en Sancenón et al. (2003), durant la reanotació del genoma es va identificar el gen *COPT6* com un possible nou membre de la família COPT. El segon objectiu escomet la caracterització de COPT2, COPT6 i COPT5 pel que fa a:

- Estudiar la funcionalitat del transportador COPT6 en *S. cerevisiae*.

- Localitzar subcel·lularment les proteïnes de fusió COPT2::GFP, COPT6::GFP i COPT5::GFP en protoplasts d'*A. thaliana*.

- Establir el patró d'expressió tissular en plantes transgèniques mitjançant la fusió dels promotor *COPT* al gen de la *β-glucuronidasa.*

- Obtindre mutants de pèrdua de funció per a *COPT2*, *COPT6* i *COPT5*.

- Caracteritzar fenotípica i molecularment els mutants de pèrdua de funció en medis de laboratori amb diferents concentracions de Cu.

MATERIALS i MÈTODES

MATERIALS i MÈTODES

1. Material biològic

1.1. Manipulació de bacteris

1.1.1. Condicions de creixement i transformació d'*Escherichia coli*

Les soques d'*Escherichia coli* es creixen a 37 ºC en medi general per a bacteris Luria-Bertani (LB) líquid [triptona (*Pronadisa*) 1% (p/v); extracte de llevat Pronadisa 0.5% (p/v), NaCl 1% (p/v)] o sòlid [amb agar bacteriològic (*Pronadisa*) 1.5% (p/v)]. En els medis de selecció s'afegeix espectinomicina (1 μg/ml; LBE) o ampicil·lina (50 μg/mL; LBA).

A l'hora de fer les transformacions hem utilitzat cèl·lules competents comercials (*One Shot Top 10 Competent Cells*, *Invitrogen*). Es recuperen les cèl·lules de -80 ºC en gel i afegir de 3 a 5 μL lligació (apartat 2.2.2). A continuació, es provoca un xoc tèrmic de 30 s a 42 ºC. Tot seguit es resuspenen les cèl·lules amb 1 mL de medi LB atemperat i s'incuben durant 1 h a 37 ºC amb agitació 190 rpm per tal que expressen el gen de selecció. A continuació se sembren en plaques de medi selectiu i es deixen crèixer a 37 ºC fins a l'aparició de transformants.

1.1.2. Condicions de creixement i transformació d'*Agrobacterium tumefaciens*

Per tal d'obtindre cèl·lules competents d'*Agrobacterium tumefaciens*, sembrem la soca C58 (resistent a rifampcina i gentamicina) en medi LB líquid amb rifampicina (0.25 µg/mL) i gentamicina (15 µg/mL) fins que la densitat òptica a 600 nm (DO_{600}) assolesca un valor entre 0.5 i 1. Les cèl·lules es renten amb NaCl 150 mM i H_2O, es resuspenen en $CaCl_2$ 20 mM i es fan alíquotes de 100 µL que es congelen a -80 ºC. En el moment de la transformació, recuperem un vial i, en descongelar-se, hi afegim 1 µg de vector i efectuem un xoc tèrmic a 37 ºC durant 4 min. A continuació es desen els vials en nitrogen líquid. Seguidament es descongelen els vials i se'ls hi afegeix 1 mL de medi LB. Finalment es fan crèixer durant 3 h a 28 ºC i se sembren en medi selectiu. El temps de creixement és de 2-3 dies a 28 ºC. Com que l'antibiòtic emprat és de tipus bacteriostàtic, les colònies obteses es tornen a sembrar en plaques de medi fresc per tal de millorar-ne la selecció.

1.2. Manipulació del llevat *Saccharomyces cerevisiae*

1.2.1. Condicions de creixement i transformació de *Saccharomyces cerevisiae*

La soca de *S. cerevisiae* MPY17 (*MATα, ctr1::ura3::kan^R, ctr3::TRP1, lys2-801, his3*; cedida pel Dr. Dennis J. Thiele, Duke University) *ctr1Δctr3Δ*, la qual és incapaç d'expressar els transportadors d'alta afinitat

de Cu de llevat, se sembra en una placa amb medi complet YPD [peptona bacteriològica 2% (p/v), extracte de llevat 1% (p/v) i glucosa 2% (p/v)] i es fa crèixer a 30 ºC durant 2-3 dies. A partir d'una colònia s'inocula un pre-cultiu en medi complet YPD fins que l'OD_{600} siga 0.5-1.2. A continuació centrifuguem 2 min a 3000 rpm i llavem les cèl·lules amb 50 mL d'aigua milliQ estèril. Es torna a centrifugar 2 min a 3000 rpm i hi afegim 1 mL d'acetat de liti (CH_3COOLi) 0.1 M. Centrifuguem 1 min a 10000 rpm. Tot seguit hi afegim 50 µL d'acetat de liti 0.1 M per transformació a fer i incubem les cèl·lules a 30 ºC durant 15 min. Per cada 50 µL de cèl·lules afegim 1 µg de DNA plasmídic, 1 mg de DNA de cadena simple (DNA d'esperma de salmó bollit durant 5-10 min a 100 ºC) i 300 µL de PEG-4000 40%: acetat de liti 0.1 M. Incubem a 30 ºC durant 20-30 min sense agitació i efectuem un xoc tèrmic durant 20 min a 42 ºC. Finalment, centrifuguem 1 min a 10000 rpm i resuspenem amb 150 µL d'aigua milliQ per sembrar els llevats en medi selectiu SC–ura [YNB *Yeast Nitrogen Base* sense aminoàcids i sulfat amònic (*Difco*), 0.17% (p/v), glucosa 2% (p/v), requeriments nutricionals sense uracil (*Formedium*) 0.19% (p/v), sulfat amònic 0.5% (p/v), i agar 1.5 % (p/v)] i els deixem crèixer a 30 ºC durant 2-3 dies.

1.2.2. Assaig de complementació funcional

Per avaluar si les diferents quimeres fusionades a la proteïna verda fluorescent (GFP) són funcionals, es va subclonar cadascuna de les fusions en el vector d'expressió multicòpia *p426GPD*, el qual dirigeix l'expressió del transgèn sota el control del promotor d'expressió constitutiva del gen de la gliceraldehid-3-fosfat deshidrogenasa (GPD). La soca *ctr1ctr3Δ* es va

transformar amb les diferents construccions, i els transformants es van crèixer en medi líquid SC–ura fins que assoliren una OD_{600} de 1.0. Es va fer dilucions seriades 1:10 dels cultius que es van sembrar en gotes mitjançant l'estri escaient (*spotter*) en medis SC–ura, YPG [peptona bacteriològica 2% (p/v), extracte de llevat 1% (p/v) i glicerol 3% (v/v)] (font de carboni no fermentable) i YPEG (etanol i glicerol) suplementat amb $CuSO_4$ 100 µM (control). Les plaques es van desar a 30 ºC durant 2-3 dies i es van fotografiar.

1.3. Manipulació de plantes

1.3.1. Condicions de creixement d'*Arabidopsis thaliana*: substrat, medi sòlid i cultiu hidropònic

Les llavors d'*Arabidopsis thaliana* ecotipus *Columbia 0 (Col 0)* se sembren o bé en tests, en placa o bé en cultiu hidropònic. En el cas dels tests, el substrat consisteix en una mescla de torba, arena i vermiculita (2:1:1). La safata amb els tests es cobreix amb cel·lofana per mantenir la humitat i es conserva a 4 ºC durant 2 dies per estratificar les llavors. A continuació els tests es desen a l'hivernacle del Servei Central de Suport a la Investigació Experimental (SCSIE; Universitat de València) o en cambres de cultiu i per controlar els cicles de llum/foscor que s'hi escaiguen:

- Fotoperíode de dia llarg: 16 h de llum blanca fluorescent (65 µmol/m^2) a 23 ºC i 8 h de foscor a 16 ºC.

- Fotoperíode de dia curt: 8 h de llum blanca fluorescent a (65 μmol/m^2) i a 23 ºC 16 h de foscor a 16 ºC.
- Fotoperíode de dia intermedi: 12 h de llum blanca fluorescent (65 μmol/m^2) a 23 ºC i 12 h de foscor a 16 ºC.

Per al creixement en placa es va utilitzar el medi de cultius MS (Murashige i Skoog; Murashige i Skoog, 1962) a la meitat (½ MS) [macronutrients (NH_4NO_3 10 mM, KNO_3 9.4 mM, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.37 mM, KH_2PO_4 0.62 mM i $CaCl_2$ 1.13 mM), micronutrients (H_3BO_3 50 μM, $MnSO_4 \cdot H_2O$ 36.6 μM, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 15 μM, $NaMoO_4 \cdot 2H_2O$ 0.57 μM i $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ 0.05 μM), Fe-EDTA 50 μM, KI 0.25 mM, $CuSO_4$ 0.05μM si escau, MES 0.05%, sacarosa 1% (si escau) i fitoagar 0.8% (*Duchefa*); pH a 5.7 amb KOH]. En alguns casos hem emprat el preparat comercial de *Sigma*. Els medis altament deficients en Cu s'ha aconseguit amb el quelant de Cu extracel·lular BCS. Les plaques se segellen amb cinta *Leukopor*.

Per esterilitzar les llavors, es duu a terme un primer llavat de 5 min amb 1 mL d'etanol al 70% i un llavat posterior amb 1 mL de lleixiu comercial de 5 min. A continuació, es fan de dos rentats d'1 min amb 1 mL d'aigua destil·lada estèril i s'embeuen en 1 mL de fitoagar al 0.1%. Tot seguit s'estratifiquen durant 2 dies a 4 ºC.

Els cultius hidropònics s'obtenen a partir de la transferència de plantes crescudes durant 3-4 setmanes en substrat, tal i com hem esmentat anteriorment, a caixes negres, prèviament esterilitzades amb lleixiu, que contenen una variant del medi de reg Hoagland a partir de les dissolucions

originals [K_2SO_4 0.44 mM, KH_2PO_4 0.125 mM, NaCl 10 μM, $Ca(NO_3) \cdot 4H_2O$ 1 mM, $Mg(SO_4) \cdot 7H_2O$ 1 mM, $Na_2SO_4 \cdot 10\ H_2O$ 1 mM, Fe·EDTA 20 μM, H_3BO_3 10 μM, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 1 μM, $MnSO_4 \cdot H_2O$ 1 μM, MoO_3 0.1 μM, $CuSO_4 \cdot 7\ H_2O$ 0.1 μM], tampó MES 0.05% (p/v) i pH 5.7-5.8 amb KOH (Arnon i Hoagland, 1939). El medi es canvia cada setmana per evitar variacions brusques de pH i possibles contaminacions. Els medis deficients en Cu consisteixen en variants del Hoagland sense afegir $CuSO_4$.

1.3.2. Transformació d'*Arabidopsis thaliana* mitjançant *Agrobacterium tumefaciens*

Amb la finalitat de transformar els teixits germinatius d'*A. thaliana* amb els vector de clonació construïts, fem crèixer, en tests recoberts per una malla de musselina, llavors de l'ecotip *Col0*. Un cop les plantes desenvolupen els botons florals inoculem un pre-cultiu en 3 mL de medi de selecció LB-ERG (apartat 1.1.2) a partir d'una colònia de clons positius d'*A. tumefaciens* i el creixem a 28 ºC amb 190 rpm d'agitació durant 12 h. Recuperem el vial i inoculem 0.2 mL en 30 mL de medi selectiu LBE i, en assolir la fase exponencial, recollim les cèl·lules per centrifugació a 3000 rpm durant 5 min i les resuspenem en una dissolució de sacarosa al 5% (p/v) i Silwet L-77 (*Lehle Seeds*) 0.05% (v/v). Els botons florals són submergits en la solució de transformació durant 10-20 s amb agitació manual. Les plantes, sense eixugar els remanent de solució, es desen de gaidó en una safata que es cobreix amb cel·lofana i es guarden en una cambra sense il·luminació durant una nit (Clough i Bent, 1998). Arribats a aquest punt

tornem a posar la planta en posició vertical en la cambra de creixement fins el moment d'arreplegar les llavors.

Les plantes que han sigut transformades amb el vector d'expressió binària *pFP101* (www.isv.cnrs-gif.fr/jg/alligator/vectors.html) se seleccionen a partir de la fluorescència emesa per les llavors transformades mitjançant una lupa acoblada a un generador de llum ultraviolada. L'esmentat vector conté el promotor d'un gen de la coberta de la llavor (*At2S3*) fusionat al de la GFP. La selecció per fluorescència també ens serveix per destriar els homozigots dels hemizigots en la segona generació (T2), ja que és un marcador dominant (en la T2, les síliqües de les plantes homozigotes presentaran un 100% de llavors fluorescents, mentre que en les hemizigotes la relació és de 3:1 favorable a les fluorescents).

2. Aïllament i anàlisi d'àcids nucleics

2.1. Aïllament d'àcids nucleics

2.1.1. Aïllament de DNA plasmídic de bacteri

Els transformants d'*Escherichia coli* es fan crèixer en 3 mL de medi de selecció per fer una extracció del vector amb el *Perfectminiprep kit* (*Eppendorf*), basat en el mètode de la lisi alcalina. Les minipreps obteses es comproven per restabliment de les dianes de digestió i el DNA s'envia al Servei de Seqüenciació de DNA (SCSIE; Universitat de València) per fer les verificacions de seqüència. Els vectors seleccionats i les colònies

comprovades són inoculades en 50-75 mL de medi de selecció per fer una extracció a mitjana escala del vector amb el *Perfectmidiprep kit* (*Eppendorf*).

Pel que fa als clons d'*Agrobacterium tumefaciens*, aquests es fan crèixer en 3 mL de medi selectiu. Es pren en un vial 1 mL del cultiu i es bull a 95 ºC durant 5-10 min. Seguidament, es dóna un colp de centrífuga i del sobrenadant resultant agafem entre 5-10 µL com a motlle per a la PCR adient.

2.1.2. Obtenció de DNA genòmic d'*Arabidopsis thaliana*

Es pesen vora 30 mg de fulles de planta i es congelen amb nitrogen líquid. Mitjançant un èmbol, triturem els teixits i hi afegim 0.3 mL de bromur de cetiltrimetilamoni (CTAB) 2X [CTAB 2% (p/v); Tris HCl 100 mM pH 8; EDTA 20 mM pH 8; NaCl 1.4 M i PVP 1% (p/v)], incubem a 65 ºC durant 5 min en agitació i ho passem a gel. Seguidament, hi afegim 0.3 mL de cloroform i centrifuguem a màxima velocitat durant 5 min. El sobrenadant es transfereix a un nou vial amb 40 µL de CTAB 10X [CTAB 10% (p/v) i NaCl 0.7 M] i 0.4 mL de cloroform. Repetim la centrifugació. El nou sobrenadant es transfereix a tubs amb 0.3 mL de tampó de precipitació CTAB [CTAB 1% (p/v); Tris HCl 50 mM pH 8; EDTA 10 mM pH 8]. Agitem i centrifuguem a màxima velocitat durant 10 min. N'eliminem el sobrenadant i deixem que s'eixugue el sediment. Hi afegim 0.3 mL de tampó TE amb alta concentració de sals [Tris HCl 10 mM pH 8; EDTA 1 mM pH 8 i NaCl 1M) i 0.6 mL d'etanol al 90%. Desem les mostres a -20 ºC durant 20-30 min i centrifuguem a 4 ºC durant 15 min a màxima

velocitat. Finalment, llavem el sediment amb etanol al 70%, tornem a centrifugar i resuspenem amb 100 µL d'aigua destil·lada.

2.1.3. Obtenció d'RNA total d'*Arabidopsis thaliana*

Previament a les extraccions, s'autoclava el material a 134 ºC durant 60 min a 2 atm. Les extraccions d'RNA total s'han dut a terme amb el reactiu *Trizol Reagent* (*Invitrogen*) seguint les indicacions del fabricant. Breument, 100 mg de teixit congelat es disgreguen i es resuspenen amb 1 mL de reactiu Trizol i 20 µL de PVP 2% (p/v). Després de centrifugar a 4 ºC durant 10 min a màxima velocitat es mescla el sobrenadant amb 200 µL de cloroform i es torna a centrifugar. La fase aquosa es mescla amb un volum d'isopropanol durant 20 min a -20 ºC per precipitar l'RNA. El precipitat es recull després de centrifugar a màxima velocitat durant 10 min a 4 ºC i es llava amb etanol 70%. A continuació, es resuspén el sediment amb 60 µL d'aigua a 65 ºC durant 10 min. Les mostres es congelen i es tornen a escalfar durant 10 min més. Per acabar, centrifuguem les motres durant 5 min a 8000 rpm a 4 ºC i recuperem el sobrenadant. Tot seguit, és quantifica una dilució 1:100 o 1:200 de la mostra original per absorbància (1 unitat A_{260} equival a 40 µg/mL). L'estat de l'RNA és comprovat mitjançant un gel d'electroforesi per a RNA (apartat 2.2.4), en funció de la integritat de les bandes corresponents a les subunitats ribosomals.

2.2. Tècniques per a la manipulació i anàlisi d'àcids nucleics

2.2.1. Amplificació de fragments per PCR

L'amplificació del DNA a clonar es fa mitjançant la DNA polimerasa termoestable amb comprovació de lectura *High Expand Fidelity PCR* (*Roche*), un parell d'encebadors, el tampó adjunt i 100-200 ng de motlle escaient. Les condicions generals del programa de PCR són: un cicle de desnaturalització inicial del motlle i diversos cicles de desnaturalització, engalzament i amplificació. Es carrega un volum d'amplicons en un gel d'agarosa per validar mitjançant electroforesi els tamanys i la resta del producte de PCR es purifica amb el quit *Illustra DNA and Gel Band Purification Kit* (*GE Healthcare*), per eliminar les restes de nucleòtids.

2.2.2. Reaccions enzimàtiques: restricció, desfosforilació i lligació

Els productes de PCR purificats i els vectors són digerits amb les nucleases de restricció adients (*Roche* i/o *Fermentas*) en tampons compatibles. Les reaccions de digestió es desen a 37 ºC durant 2 h. A continuació, desfosforilem el vector digerit amb la fosfatasa alcalina de gamba (SAP; *Roche*) durant 15 min a 37 ºC i inactivem l'enzim a 65 ºC durant 25 min. Tot seguit, les digestions són precipitades a -20 ºC durant 30 min amb una 1/10 part del volum final d'acetat de sodi 3 M (CH_3COONa) i 2 volums d'etanol 96%, se centrifutga a 13000 rpm durant 15 min i es llaven amb etanol del 70% abans de ser resuspeses amb tampó de càrrega 2X (apartat 2.2.3). Per recuperar el vector i l'insert digerits, migrem les mostres

en un gel d'agarosa, purifiquem les bandes amb el quit *Illustra DNA and Gel Band Purification Kit* (*GE Healthcare*) i les quantifiquem en gel d'electroforesi. La reacció de lligació es prepara amb el *DNA rapid ligation kit* (*Roche*) a partir de 3 vegades més quantitat d'insert que de vector.

2.2.3. Electroforesi de DNA i purificació de fragments

Tots els gels d'electroforesi per a DNA realitzats en aquest treball es preparen a partir d'agarosa entre el 0.8 i l'1.5% (p/v) en tampó Tris-acètic-EDTA (TAE) 1X [EDTA 20 mM, Tris 40 mM i àcid acètic glacial 1.14 mL/L] i bromur d'etidi 8 µg/mL. Les mostres de DNA es solubilitzen amb tampó de càrrega 2X per a electroforesi [glicerol 50% (v/v), blau de bromofenol 0.05% (p/v) i EDTA 100 mM]. La migració de les mostres s'ha realitzat en sistemes d'electroforesi (*Biorad*) a 80-100 V i s'han visualitzat mitjançat un transil·luminador de llum ultraviolada. En el cas de voler recuperar les bandes, ens hem valgut d'un feix de llum ultraviolada de baixa energia i les hem seccionat amb una fulleta (apartat 2.2.3).

2.2.4. Electroforesi d'RNA

Els gels d'electroforesi d'RNA es preparen a partir d'agarosa a l'1% (p/v) en tampó MOPS [MOPS 40 mM, acetat sòdic 10 mM, EDTA 1 mM pH 8.0] i formaldehid 2.2 M. Les mostres se solubilitzen amb el tampó de carrega adient [formamida desionitzada 65% (v/v) en MOPS 1X, formaldehid 7% (v/v) i bromur d'etidi 20 µg/mL], es desnaturalitzen a 65 ºC durant 5 min i, en carregar-se, se separen electroforèticament a 70-100 V en

sistemes d'electroforesi (*Biorad*). Finalment, el gel és visualitzat mitjançat un transil·luminador de llum ultraviolada.

2.2.5. PCR semiquantitiva

Per tal de passar l'RNA extret a DNA còpia (cDNA), afegim a 1.5 µg d'RNA 1 µL d'encebador oligo polidT 50 µg/µL (*Invitrogen*) i 1 µL d'oligo 18S revers 12.5 µM i ajustem fins a 20 µL amb aigua. Engalzem els encebador a l'RNA a 70 ºC durant 10 min. Estabilitzem els vials amb gel i hi fem una centrifugació ràpida. Tot seguit, hi incorporem per a cadascuna de les reaccions: 1 µL d'inhibidor d'RNAasa (*Invitrogen*), 4 µL de tampó 5X RT (*Invitrogen*), 2 µL de ditiotreitol (DTT) 0.1 M (*Invitrogen*) i 1 µL de dNTPs 10 mM (*Promega*) i ho atemperem a 42 ºC durant 2 min. Seguidament, hi introduim 1 µL de la retrotranscriptasa *SSII* (*Invitrogen*) i ho desem a 42 ºC durant 1 h. Per acabar, inactivem l'enzim tot passant els vials a 70 ºC durant 15 min. Els cDNA obtesos esdevenen els motlles a partir de què s'abordaran les PCR per quantificar i relativitzar les taxes d'expressió gènica.

Les PCR semiquantitatives (sqPCR) són una variant de la descrita en l'apartat 2.2.1 en què utilitzem 1 µL del motlle, 0.5 µL de dNTPs 10 mM, 0.75 µL de $MgCl_2$ (*Bioline*), 2.5 µL de tampó 10X Biotaq, els parells d'encebadors a 0.5 µM (Taula M1), 0.2 µL de *Biotaq* polimerasa (*Bioline*) i aigua destil·lada fins a 25 µL. Previament a les quantificacions, hem amplificat cadascun dels gens escollits amb dilucions seriades de cDNA per tal d'evitar la saturació per motlle. Els productes de PCR resultants es

corren en un gel d'electroforesi per a DNA i es compara la intensitat de les bandes en base a la intensitat dels gens constitutius de l'actina (*ACT1*) o del rRNA *18S*.

Taula M1: Encebadors ulitzats per a la PCR semiquantitativa. Nom, seqüència en sentit 5'➔3' i condicions no saturants amb les temperatures d'aliniament i els cicles per a cada parell d'encebadors de la sqPCR.

Nom	Seqüència 5' ➔ 3'	Condicions
ACTINARA1A	GGCGATGAAGCTCAATCCAAACG	61 ºC 25 cicles
ACTINARA1B	GGTCACGACCAGCAAGATCAAGACG	
COPT2 RT-F	AAGTTGGTATGTCATGCCAA	60 ºC 30 cicles
COPT2 RT-R	ATATCAATGTCAAATGACTCAA	
COPT5-SalI-F	TTGCAATTTTCCTCTCCTCCCAA	60 ºC 30 cicles
COPT5-NcoI-R	ATGATGGTCGAGGCATT	
COPT6-RT-F2	GTGAGTACAACCACAAACA	60 ºC 30 cicles
COPT6-NcoI-R	TCTCCATGGTTAGTTGTTCGAAGGGTTTCTC	
CSD1 RT F1	CCTTTCGTATTTGGTGATGCT	60 ºC 30 cicles
CSD1 RT R1	AAACACCTGCGTTAAAGGAC	
FSD1 RT F1	TTGCAGCTATGTCTTTCAA	60 ºC 30 cicles
FSD1 RT R1	CGGCGGTTAATCCGACGACA	

2.2.6. PCR quantitativa en temps real amb SYBR-Green

Per a les PCR quantitatives en temps real (qPCR), els encebadors es dissenyen considerant la presència d'introns i el contingut en G/C (Taula M2). En primer lloc optimitzem la concentració d'encebadors adient per a cada gen. Per a una mateixa concentració de gDNA s'afegeixen totes les possibles combinacions de concentracions d'encebadors a 50 nM, 300 nM i 900 nM per a l'encebador directe i per al revers (50-50; 50-300; 50-900; 300-50; 300-300; 300-900; 900-50; 900-300 i 900-900) en una placa moltipouet. Per a tots els encebadors utilitzem una concentració 300-300 i per a *UBQ10* 300-900. A cada pouet afegim 12.5 µL de la mescla general de

reacció *Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG with ROX* (Invitrogen) i aigua fins a un volum de 25 µL. El programa d'amplificació consisteix en un cicle inicial de 2 min a 50 ºC per evitar la contaminació amb amplicons (*carry-over*), un cicle de desnaturalització incial a 95 ºC durant 2 min i 40 cicles d'hibridació a 95 ºC i engalzament i amplificació a 60 ºC, ambdós durant 30 s. Finalment, es programa una corba de desnaturalització i els amplicons són correguts en una electroforesi de DNA. En base al cicle en què la intensitat de fluorescència supera un llindar arbitrari (cicle Ct), seleccionem la menor concentració d'encebadors amb què s'obté un Ct acceptable (Ct entre 20-25). A continuació, es representa la variable Ct envers la variable log(dilució) de motlle i escollim una concentració dins el tram linial on no es produesca saturació per motlle.

Taula M2: Encebadors ulitzats per a la qPCR. Nom dels parells d'encebadors per a les reacció de qPCR junt amb la seqüència 5' ➔3'.

Nom	Seqüència 5'➔3'
AtUBQ10 F1	TAATCCCTGATGAATAAGTGTTCTAC
AtUBQ10 R1	AAAACGAAGCGATGATAAAGAAG
CCH qPCR-F	AAGTTGGTATGTCATGCCAA
CCH qPCR-R	ATATCAATGTCAAATGACTCAA
CCS qPCR-F	TCTCCACGTCTCTTGGGACTTT
CCS qPCR-R	AGCTGAGGCATGGCTCGAT
COPT1 qPCR-F	TTGCAATTTTCCTCTCCTCCCAA
COPT1 qPCR-R	ATGATGGTCGAGGCATT
COPT2 qPCR-F	CCTTTCGTATTTGGTGATGCT
COPT2 qPCR-R	AAACACCTGCGTTAAAGGAC
COPT6 qPCR-F	GCAGTCTACACACTCAAGACA
COPT6 qPCR-R	AAAGGACATAACGGCGAGCA
COPT5 qPCR-F	TTGCAGCTATGTCTTTCAA
COPT5 qPCR-R	CGGCGGTTAATCCGACGACA
CSD1 qPCR-F	CATCATTGGTCTCCAGGGCT
CSD1 qPCR-R	GACCTCCTTATTACATCAAT
FSD1 qPCR-F	ACCGAAGACCAGATTACATA
FSD1 qPCR-R	TGGCACTTACAGCTTCCCAA

La quantificació relativa de l'expressió gènica s'aborda a partir de la relació del Ct de cada gen diana respecte el Ct del gen referència de l'ubiqüitina *UBQ10* (Ct gen diana – Ct gen referència; ΔCt) i la relació d'aquest valor en funció de la condició o tractament de referència (ΔCt condició – ΔCt condició referència; ΔΔCt). L'expressió relativa s'obté de la fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

2.2.7. Anàlisi de seqüències

Tots els fragments de PCR clonats són seqüenciats al Servei de Seqüenciació de DNA i Proteïnes (SCSIE; Universitat de València). Els aliniaments i comparacions de seqüències s'han elaborat amb el programa *DNAMAN* (*Lynnon Biosoft*). Les anàlisis teòriques de les seqüències promotores dels gens d'estudi es van efectuar amb el programa *SignalScan* de la base de dades PLACE (*Plant cis-acting regulatory DNA elements*; http:\www.dna.affr.go.jp/htdocs/PLACE/signalscan.html). Les prediccions *in silico* de l'expressió tissular s'han considerat en funció de les dades disponibles al web Genevestigator (https://www.genevestigator.ethz.ch/at/) i del eFP Browser (http://www.bar.utoronto.ca/efp). La predicció de la localització subcel·lular s'ha fet amb el servidor *PSORT* (psort.ims.u-tokyo.ac.jp) i els índexs d'hidrofobicitat s'han obtés amb el programa *TMHHM* (www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM) respectivament.

2.3. Disseny de construccions

2.3.1. Fusió de promotors al gen alertador *β-glucuronidasa* (*pCOPT::GUS*)

Amb els encebadors GUS-F-XbaI i NOS-R-SalI (Taula M3) amplifiquem per PCR el gen de la β-glucuronidasa (*GUS*) junt amb el terminador del gen nopalina sintetasa (*NOS*) a partir del vector *pBI121*. El producte de PCR purificat i el vector d'expressió binària *pFP101* es va digerir amb els enzims de restricció *Xba*I i *Sal*I (Roche) i es va dur a terme la lligació (Figura M1).

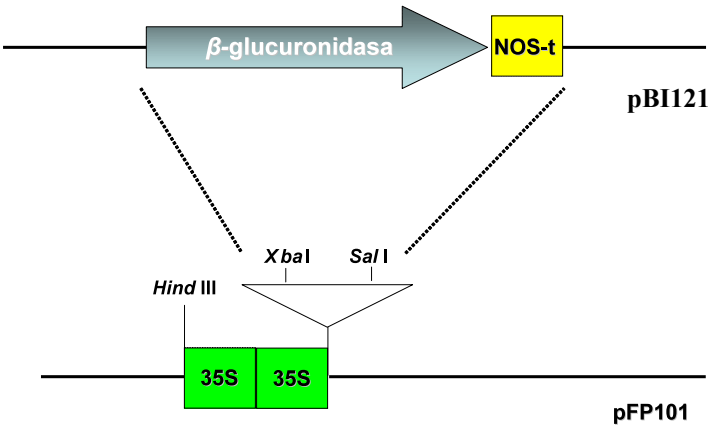


Figura M1: Obtenció del *pFP101::GUS::NOS*. El gen que codifica la β-glucuronidasa que conté el vector *pBI121* és amplificat per PCR i clonat entre els llocs de restricció *Xba*I i *Sal*I del vector *pFP101* per obtindre el vector de partida amb què farem les fusions *pCOPT::CaMV(35S)::GUS::NOS.*

Els productes de PCR obtesos a partir de gDNA amb els parells d'encebadors COPT2-1200F-HindIII/COPT2-ATG-R-XbaI (1245 pb); COPT6-730F-HindIII/COPT6-ATG-R-XbaI (389 pb) i COPT5-120F-HindIII/COPT5-ATG-R-XbaI (356 pb) (Taula M3) es van clonar entre els

llocs *Hind*III i *Xba*I del vector *pFP101* per tal d'obtindre les construccions *pFP101::pCOPT2::GUS::NOS*, *pFP101::pCOPT6::GUS::NOS* i *pFP101::pCOPT5::GUS::NOS*. L'elecció dels trams dels promotors es va fer en funció de les seqüències disponibles en la base de dades TAIR (*The Arabidopsis Information Research*; www.arabidopsis.org).

Taula M3: Encebadors ulitzats per a les clonacions. S'hi inclou el nom dels parells d'encebadors per a les reacció de PCR junt amb la seqüència

Nom	**Seqüència 5' ➔3'**
COPT2-HindII-F	CATAAGCTTATGGATCATGATCACATGCAT
BamHI-COPT5-F	CGGGATCCATGATGCACATGACCTTCTAC
COPT6-ATG-BamHI-F	CATAAGCTTATGGATCATGGTAACATGCCA
GFP-R-SalI	CATGTCGACTTACTTGTACAGCTCGTCCAT
COPT2-SalI-F	CATGTCGACATCATGGATCATGATCACATGCAT
COPT2-NcoI-R	TCTCCATGGTACAAACGCACCCTGAAGACGGCGGAA
COPT6-SalI-F	CATGTCGACATAATGGATCATGGTAACATGCCA
COPT6-NcoI-R	TCTCCATGGTTAGTTGTTCGAAGGGTTTCTC
COPT5-SalI-F	CATGTCGACCACATGATGCACATGACCTT
COPT5-NcoI-R	CATCCATGGTAGCACATGGACATGGATCAT
GUS-F-XbaI	CATTCTAGAATGTTACGTCCTGTAGAAACCCCA
NOS-R-SalI	CATGTCGACCCCGATCTAGTAACATAGATGACA
COPT2-1200F-HindIII	GTGGTGTTAAAGCTTTTGCAACAA
COPT2-ATG-R-XbaI	CATTCTAGAGATACTAATGTTAATAGGGTTTATGAT
COPT6-730F-HindIII	CATAAGCTTGTGACCACATTTCCGACTAACACT
COPT6-ATG-R-XbaI	CATTCTAGATATATGATAAGTAGTTTCTGAAATTTT
COPT5-120F-HindIII	CATAAGCTTACCAGAATCAGGTTAACACTA
COPT5-ATG-R-XbaI	CATTCTAGACTTTGCGAGCTTGATTT
COPT5-SalI-R	CATGTCGACTCAAGCACATGGACATGGATCAT
COPT5-GFP-R	CTCCTCGCCCTTGCTCACCATACCGATCGCTGCGTTGACGCCGAA
COPT5-GFP-F	GGCGTCAACGCAGCGATCGGTATGGTGAGCAAGGGCGAGGAG
COPT5-XbaI-F	CATTCTAGAATGATGCACATGACCTT
COPT6-XbaI-F	CATTCTAGAATGGATCATGGTAACATGCCA
COPT5HA-SalI-R	CATGTCGACTCAAGCATAATCTGGAACATCGTATGGATAAGCACA TGGACATGGATCAT
COPT6HA-SalI-R	CATGTCGACTCAAGCATAATCTGGAACATCGTATGGATATAGTTG TTCGAAGGGTTTCTCGTCAT

2.3.2. Construcció de les proteïnes de fusió a la proteïna verda fluorescent

A partir de gDNA de fulles d'*A. thaliana* i dels parells d'encebadors COPT2-SalI-F/COPT2-NcoI-R (474 pb); COPT6-SalI-F/COPT6-NcoI-R (435 pb); COPT5-SalI-F/COPT5-NcoI-R (439 pb) (Taula M3) es va amplificar per PCR les seqüències codificants dels gens COPT sense el codons d'aturada. Els productes de PCR van ser clonats entre els llocs *Sal*I i *Nco*I del vector *p35ΩsGFP*, conservant la pauta de lectura de la GFP (Miras et al. 2002).

2.3.3. Construcció del cassette de complementació *pCOPT5::COPT5*

La seqüència codificant del gen *COPT5* junt amb els 356 pb de la regió promotora es va amplificar per PCR els amb l'ajud dels encebadors COPT5-120F-HindIII i COPT5-SalI-R (Taula M3). L'esmentada seqüència es va clonar en el plasmidi *pFP101* entre els llocs *Hind*III i *Sal*I.

2.3.4. Construcció del cassette de complementació *pCOPT5::COPT5::GFP*

A partir del vector *pCOPT5::GUS* (apartat 2.3.1) i *pCaMV(35S)::COPT5::sGFP* es va dissenyar dues rondes de PCR amb els encebdors COPT5-120F-HindIII/COPT5-GFP-R (Figura M2; encebadors A i B) i COPT5-GFP-F/GFP-SalI-R (Figura M1; encebadors C i D; Taula M3). Els encebadors B i C ensolapen en els seus extrems, de manera que els

productes de PCR generats a partir d'ambdues reaccions també ensolapen. Basant-nos en aquesta característica, es dissenya una segona reacció de PCR a partir amb els encebadors COPT5-120F-HindIII i GFP-SalI-R utilitzant com a motlle els amplicons de la primera remesa (Taula M3). El nou producte de PCR és purificat i clonat en el vector *pFP101* entre els llocs *Hind*III i *Sal*I.

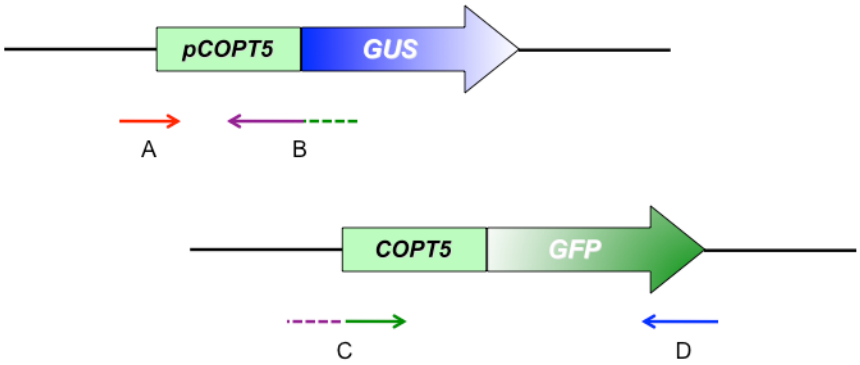


Figura M2: Estratègia per a l'obtenció del vector *pFP101::pCOPT5::COPT5::GFP*. A la figura es mostra el vector *pCOPT5::GUS::NOS* i *pCaMV(35S)::COPT5::sGFP* junt amb els encebdors COPT5-120F-HindIII/COPT5-ATG-R (A i B) i COPT5-ATG-F/GFP-SalI-R (C i D). Les línies discontínues mostren les regions ensolapants dels encebadors B i C.

2.3.5. Construcció dels cassettes de sobreexpressió *COPT::HA*

El vector *pFP101* presenta 2 promotors *CaMV(35S)* entre *Hind*III i *Xba*I. Les seqüències codificants dels transportadors COPT sense el codó d'aturada resultants de les PCR amb els parells d'encebadors COPT2-XbaI-F/COPT2HA-SalI-R; COPT5-XbaI-F/COPT5HA-SalI-R; COPT6-XbaI-F/COPT6HA-SalI-R (Taula M3) són clonats entre els llocs *Xba*I i *Sal*I per tal de ser sobreexpressats. Amb els encebadors indirectes introduim l'epítop de l'hemaglutinina del virus *Influenza* d'humans (HA).

3. Obtenció i anàlisi de proteïnes

3.1. Extracció de proteïnes d'*Arabidopsis thaliana*

L'extracció de proteïnes per a gels SDS-PAGE (apartat 3.2.1) es duu a terme a partir de 100 mg de teixit congelat en N_2 líquid, que és disgregat amb un èmbol. A continuació s'hi afegeix 1 mL de tampó d'extracció [NaCl 100 mM, Tris-HCl 50 mM pH 7.5, Triton X-100 0.5% (v/v), DTT 1 mM i PMSF 1 mM], es completa la disgregació i se centrifuga a màxima velocitat en una centrífuga refrigerada durant 5 min. El sobrenadant esdevé l'extracte cru de proteïnes. El tampó d'extracció es prepara en el mateix moment i es conserva en fred. Els extractes es quantifiquen mitjançant el reactiu Bradford (Bradford, 1976) o el de la BCA (*BCA Protein Assay Kit*, *Thermo*) a partir d'una recta patró amb concentracions conegudes de seroalbúmina bovina (BSA).

3.2. Tècniques per a la manipulació de proteïnes

3.2.1. Electroforesi de proteïnes en gels de poliacrilamida en condicions desnaturalitzants (SDS-PAGE)

Les mostres, conservades en fred, es mesclen en tampó de solubilització 2X [Tris-HCl 250 mM pH 6.8, glicerol 20% (v/v), dodecil sulfat sòdic (SDS) 4% (p/v), β-mercaptoetanol 10% (v/v), blau de bromofenol 0.025% (p/v)] i s'injecten, previament escalfades o no, 20 µg de proteïnes en un gel d'acrilamida-bisacrilamida 15% [per a 10 mL de gel de ressolució: 2.5 mL d' H_2O, 4.9 mL d'acrilamida-bisacrilamida 38:2, 2.5 mL de tampó Tris-HCl

1.5 M pH 8.8, 10 µL de N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina (TEMED) i 50 µL persulfat d'amoni 25%; per a 5 mL de gel de concentració: 2.9 mL d' H_2O, 0.8 mL d'acrilamida-bisacrilamida 38:2, 1.25 mL de tampó Tris-HCl 0.5 M pH 6.8, 10 µL TEMED i 10 µL persulfat d'amoni 25%]. L'electroforesi es desenvolupa a 80-100 V en el tampó adient 1X [a partir Tris base 0.3% (p/v), glicina 1.44% (p/v), SDS 0.1% (p/v)].

3.2.2. Transferència a membrana i detecció mitjançant anticossos

El gel de proteïnes és transferit a una membrana de nitrocel·lulosa (*Protran*) amb un sistema en humit en tampó de transferència [Tris-HCl 25 mM pH 9.3, metanol 20% i glicina 192 mM]. La cubeta on desem el sistema es cobreix en gel o bé es transllada a una cambra refrigerada per fer la transferència a 100 V durant 30 min. El gel transferit es tiny amb blau Comassie [blau de Comassie 0.1% (p/v), metanol 0.45% (v/v) i àcid acètic glacial 0.1% (v/v)] per comparar les bandes corresponents a la subunitat major de la RuBisCO. Per altra banda, la membrana es fixa amb àcid acètic 1% (v/v) i es tiny amb el colorant Ponceau (Ponceau S 0.5%, àcid acètic glacial 1%) amb la mateixa finalitat. La tinció desapareix en llavar la membrana amb TBS 1X [Tris-HCl 20 mM pH 7.5 i NaCl 0.5 M].

Tot seguit, la membrana és bloquejada amb llet en pols [5% (p/v) en tampó TBS] durant 30 min a temperatura ambient o durant 12 h a 4 ºC, en agitació. Seguidament, s'hi fan tres llavats amb TBS i es procedeix a incubar la membrana amb l'anticòs primari a la dilució escaient (Taula M4), durant 1h a temperatura ambient i amb agitació. A continuació, es fan 3

llavats de 5 min amb TBS i s'incuba amb la dilució adient d'anticòs secundari (1/30000) (Taula M4) amb llet en pols 3% (p/v) durant 30 min a temperatura ambient, amb agitació. Per acabar, es fan 3 llavats més de 5 min amb tampó TBS, s'eixuga la membrana i es revela per quimiolluminiscència amb el kit *ECL Advance Western Bloting Detection kit* (*HealthCare*) mitjançant pel·lícules fotogràfiques (*Kodak*) i una màquina reveladora (*Curix60 AGFA*).

Taula M4: Anticossos i dilucions utilitzats en els experiments de *Western blot*. Anticossos primaris i secundaris amb la seua procedència i dilució utilitzada. S'hi indica amb un asterisc (*) si s'ha utilitzat llet 3% (p/v) en la dilució de l'anticòs primari.

Anticòs primari		**Anticòs secundari**
Anti-HA (3F10, Roche)	1/1000	Anti-IgG de rata-peroxidasa (Amersham)
Anti-PC* (de Boer et al. 1988)	1/2000	Anti-IgG de rata-peroxidasa (Amersham)
Anti-H-VPPasa* (cedit pel Dr. F. Aniento; UV)	1/1000	Anti-IgG de conill-peroxidasa (Amersham)
Anti-AHA3* (cedit pel Dr. F. Aniento; UV)	1/500	Anti-IgG de conill-peroxidasa (Amersham)
Anti-Syp21* (cedit pel Dr. F. Aniento; UV)	1/1000	Anti-IgG de conill-peroxidasa (Amersham)
Anti-SEC21* (cedit pel Dr. F. Aniento; UV)	1/1000	Anti-IgG de conill-peroxidasa (Amersham)

Per reutilitzar les membranes, es renten amb la solució de llavat [Tris-HCl 0.5 M 12.5% (v/v) pH 6.8, β-mercaptoetanol 0.9% (v/v), SDS 2% (v/v)], fent-les surar dins una carmanyola, en un bany a 50 ºC durant 30 min, amb agitació.

3.2.3. Fraccionament subcel·lular

Les plantes a utilitzar es desen en foscor durant 12 h per evitar que el midó malmene els cloroplasts. A continuació, s'homogeneïtzen vora 3 g de fulles de plantes adultes crescudes en test amb el tampó d'homgeneïtzació (HB) [sacarosa 8% (p/v); imidazol-HCl 3 mM, pH 7.4] amb DTT 1 mM, còctel inhibidor de proteases (*Sigma*) 0.2% (p/v), EDTA 5 mM] amb l'ajud d'un morter refrigerat. L'extracte cru és recollit en un tub de 15 mL i centrifugat durant 5 min a 2500 rpm a 4 ºC i, el sediment remanent, es resuspén i centrifuga de nou a 4500 rpm durant 2 min a 4 ºC. Els 2 sobrenadants obtesos es junten i se centrifuguen durant 5 min a 2500 rpm a 4 ºC. El sobrenadant resultant obtés (fracció total de membranes, 1.8 mL aproximadament) es desa sobre 400 µL de solució de sacarosa al 42% (p/v) i se centrifuga a 165000 g amb un rotor d'angle vasculant *Beckman Coulter* MLS-50 *Optimax Ultracentrifuge Rotor*, durant 1 h a 4 ºC. Tot seguit, es recupera la interfase generada, se'n mesura el percentatge de sacarosa amb un refractòmetre i es resuspén amb HB per tal d'obtindre-hi una concentració aproximadament del 15%. La fracció de membranes (vora 1 mL) es deposita sobre un gradient (4 mL) continu de sacarosa entre el 20-47% i es centrifuga a 165000 g durant 3 h a 4 ºC, amb el mateix rotor que adès. Finalment, es recullen fraccions de 450 µL amb una bomba succionadora i se'n mesura la quantitat de sacarosa. El *Western blot*, a partir de les mostres recollides, és incubat amb diferents anticossos contra proteïnes marcadores de diferents orgànuls cel·lulars i contra l'epítop amb què hem etiquetat les proteïnes d'estudi (Taula M4).

4. Expressió i localització subcel·lular de les proteïnes de fusió COPT::GFP

4.1. Transformació transitòria de protoplasts d'*Arabidopsis thaliana*

Els protoplasts d'*A. thaliana* es van obtindre a partir de seccions de 2 g de fulles joves embegudes en 30 mL de solució enzimàtica. La solució enzimàtica es prepara el dia anterior a la transformació i consta de cel·lulasa R10 1-1.5% (p/v) i maceroenzim R10 0.2-0.4% (p/v) en manitol 0.4 M, KCl 20 mM i MES 20 mM, pH 5.7. El preparat s'escalfa a 55 ºC durant 10 min i es completa amb $CaCl_2$ 10 mM i BSA 0.1% (p/v). La mescla s'esterilitza amb filtres de 0.45 mm. La solució enzimàtica es infiltrada mitjançant una bomba de buit i a continuació es desa en agitació durant 3 h a temperatura ambient. Finalment els protoplasts es recullen per filtració amb una membrana de niló i posterior centrifugació a 200 g durant 4 min a 4 ºC.

La transformació transitòria dels protoplasts comença amb el llavat i incubació en 10 mL de tampó W5 [NaCl 154 mM, $CaCl_2$ 125 mM, KCl 5 mM i MES 2 mM a pH 5.7] en gel durant 30 min. Novament, els protoplasts se centrifuguen a 200 g durant 4 min a 4 ºC i es resuspenen amb 1 mL del tampó MMg [manitol 0.4 M, $MgCl_2$ 15 mM i MES 4 mM a pH 5.7]. A continuació es fa el recompte de protoplasts i s'ajusta la concentració a $3 \cdot 10^6$ cèl·lules/mL. A 100 µL de resuspensió final s'afegeix entre 10 i 20 µg de DNA i 110 µL de solució de polietilè-glicol [PEG 4000 40% (p/v), manitol 0.4 M, $CaCl_2$ 0.1 M a pH 8.0 amb KOH]. S'agita suaument i es desen en incubació durant 30 min. Finalment, els protoplasts es llaven amb

tampó W5 i s'incuben durant 16 h en llum, i si escau, abans de la visualització s'incuben durant 30 min a 4 ºC amb FM4-64 (*Invitrogen*).

4.2. Localització subcel·lular de les quimeres COPT::GFP

La detecció del senyal fluorescent associat a la GFP es va dur a terme mitjançant el microscopi confocal de fluorescència *LEICA mod. TCS SP vertical (DM-R)* amb làser d'excitació d'argó a 488, 543 o 633 nm segons es tractara del senyal de la GFP, RFP o cloroplasts. Les emissions de fluorescència es detecten a 500-530 (GFP), 560-630 (RFP i FM4-64) o 650-700 nm (clorofil·la).

5. Tècniques i paràmetres per a l'anàlisi de mutants d'*Arabidopsis thaliana* per inserció de T-DNA

5.1. Obtenció de mutants d'*Arabidopsis thaliana* per inserció de T-DNA

A partir de la col·lecció de mutants per inserció de T-DNA disponibles a la base de dades del TAIR, es va sol·licitar llavors provinents del *SALK Institute* (http://signal.salk.edu/tabout.html; Alonso et al. 2003), del *GABI-Kat Project* (http://www.gabi-kat.de/GABI-Kat_news.html; Rosso et al. 2003) i del *SAIL* (*Syngenta Arabidopsis Insertion Library*; Scholl et al. 2000) per a cadascun dels gens d'estudi. Les llavors van ser crescudes en els condicions especificades en l'apartat 1.3.1. Una vegada assolida l'etapa reproductiva, cada planta va rebre un nom dins la seua línia i es van recollir les llavors de cada planta per separat. Paral·lelament, va arreplegar-se

material de fulles de cadascuna de les plantes i es va emmagatzemar a -80 ºC per a posteriors anàlisis.

5.2. Identificació de plantes homozigotes i mapeig de les insercions

Per distingir les plantes homozigotes de les hemizigotes es dissenyen encebadors per amplificar específicament l'al·lel silvestre i per a l'al·lel amb inserció de T-DNA (Taula M4). A partir del DNA genòmic (apartat 2.1.2) i amb aquests encebadors es duen a terme dues rondes de PCR per cadascuna de les plantes: una per amplificar la variant inserida (ins) i una per a la variant silvestre (WT) (Figura M3). Les condicions de PCR optimitzades són, per a tots els casos, 1 min a 94 ºC de desnaturalització incial i 35 cicles cadascun de 30 s a 94 ºC, 30 s a 51 ºC i 1 min a 72 ºC. La presència d'amplificat i el tamany es comprova en un gel d'agarosa. Es van obtenir les generacions de plantes necessàries fins detectar homozigots per a les insercions.

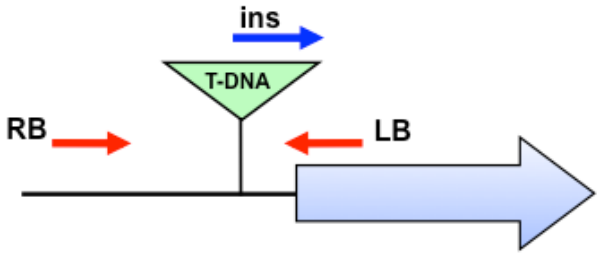


Figura M4: Esquema de l'estratègia utilitzada per discriminar línies homozigotes i heterozigotes per a les insercions de T-DNA del SALK. En les línies provinents del SALK, la PCR efectuada amb el parell d'encebadors LB i RB amplifiquen, en cas que siga possible, l'al·lel silvestre (WT) mentre que la PCR fruit de la combinació ins i LB ens permet amplificar, en cas d'haver-n'hi, la variant amb l'inserció de T-DNA. En el cas del *GABI-kat*, les combinacions per a la variant insertada impliquen els encebadors ins i RB.

El punt exacte d'inserció del T-DNA s'obté en seqüenciar la banda purificada corresponent al producte de PCR per a l'al·lel mutat (ins) i el posterior aliniament amb la seqüència del gen mitjançant el programa DNAMAN.

Taula M5: Encebadors ulitzats per discriminar els al·lels amb insercions de T-DNA

Encebador	Seqüència 5'→3'
SALKLEFT	GATTTCGGAACCACCATCAAACAGGA
GKAT-PCR	CCCATTTGGACGTGAATGTAGACAC
GKAT-SEQ	ATATTGACCATCATACTCATTGC
SAIL-LB-3R	TAGCATCTGAATTTCATAACCAATCTCGATACAC
COPT2-1RB	GATTTTTCATAACATTTCAAACCAC
COPT2-1LB	TCAATTGTTCAACAAACGCAG
COPT6-2RB	CCAAGTTTGACAAGTCAAAACG
COPT6-2LB	CGAAACCAAAAGGGTGAATATC
COPT5-LB	TTAACATCAGCCTGCACTTTC
COPT5-RB	TTATCAAGCACATGGACATGG

5.3. Paràmetres per a la caracterització de mutants i plantes transgèniques

La caracterització, tant de plantes transgèniques com de mutants de pèrdua de funció i plantes sobreexpressores, s'ha dut a terme des del punt de vista bioquímic i fisiològic. Heus aquí l'ennumeració i descripció dels procediments efectuats.

5.3.1. Establiment de taxes i paràmetres fisiològics

Taxes fisiològiques

- Percentatge de germinació: les llavors de les línies a estudiar s'esterilitzen i se sembren plaques amb el medi corresponent. A la primera i segona setmana es fa el recompte de llavors germinades.

- Número de llavors per síliqua: es fa un recompte sota una lupa del nombre de llavors contingudes en una síliqua. La mesura es repeteix per triplicat.

Taxes de creixement

- Quantificació del pes fres (FW): s'aborda en una balança de precisió a partir de cinc plàntules crescudes en les condicions de Cu d'estudi. La mesura es repeteix en, almenys, 3 grups de plàntules de 3 experiments biològicament independents.

- Etiolació i mesura dels hipocòtils: les llavors a estudiar són esterilitzades i sembrades en el medi MS escaient sense sacarosa (apartat 1.3.1) o en aigua amb 0.8% de fitoagar (*Duscheffa*), es cobreixen amb 2 capes de paper d'alumni i s'estratifiquen a 4 ºC durant, almenys, 2 dies. A continuació, es desen en vertical durant 4-8 dies i s'obren per mesurar, amb un regle, la longitud de l'hipocòtil.

- Mesura de la longitud de l'arrel principal: les plàntules són crescudes en vertical en les condicions corresponents i, amb l'ajuda d'un regle, es mesura la longitud assolida per les arrels. La mesura es repeteix, almenys, 3 vegades en 3 experiments biològicament independents.

Assaig de sensibilitat al Cu

La sensibilitat al Cu s'estima en funció de la variació de la longitud de l'arrel principal. Les llavors se sembren en medis ½ MS amb sacarosa (apartat 1.3.1) amb una concentració control de Cu i es desen en vertical durant 5-7 dies. Al cap d'aqueix temps, es transfereixen a medis ½ MS amb els tractaments de Cu. Es marca una línia en el punt fins on ha crescut l'arrel i es tornen a la cambra de cultiu durant 5-7 dies més. Mitjançant un regle es mesura la distància elongada, respecte del punt de referència. Es mesuren les plàntules de 3 experiments biològicament independents.

Estudi de la viabilitat de les cèl·lules de l'arrel

Plàntules de 7 dies es renten i se submergeixen en una solució de iodur de propidi (5 mg/mL) durant 5-10 min i s'aclareixen amb aigua destil·lada. Seguidament, es munten les preparacions i les arrels es visualitzen en el filtre corresponent (540-552 nm) d'un microscopi confocal (Servei de microscopia electrònica, SCSIE, Universitat de València).

Estudi del patró de lignificació

Les mostres a estudiar foren embegudes en una solució saturant de fluoroglucinol amb HCl pur (Rogers et al. 2005) i, en assolir la tinció, van ser rentades amb aigua destil·lada i processades per al seu estudi qualitatiu.

5.3.2. Estudi d'activitats enzimàtiques

Estudi de l'activitat β-glucuronidasa en les plantes *pCOPT::GUS*

Les plàntules totals o òrgans de línies transgèniques es desen en vials i s'embeuen amb la dissolució de reacció [$K_3Fe(CN)_6$ 0.5 mM, $K_4Fe(CN)_6$ 0.5 mM, Tritó X-100 0.1% (v/v), 5-Bromo-4-chloro-3-indolil-β-D-glucurònid ciclohexilamoni (X-gluc; *AppliChem*) 1 mM, $NaPO_4$ 100 mM pH 7.2, EDTA 10 mM pH 7.2] (Jefferson et al. 1987) i s'infiltren intermitentment amb una bomba de buit. Tot seguit els vials s'incuben en foscor a 37 ºC fins que hi aparega la tinció blava. La reacció s'atura amb llavats d'etanol a concentracions creixents (30-70%) i es destinyen les clorofil·les.

Activitat ascorbat peroxidasa i catalasa

A partir d'extractes obtinguts en condicions no desnaturalitzants [polivinilpolipirrolidona (PVPP) 5% (p/v), tampó fosfat 16.6 mM pH 7.2 i EDTA 0.6 mM; en el cas de l'APX s'hi afegeix ascorbat sòdic 3 mM], per a l'activitat catalasa (CAT), 100 µL d'extracte foren incubats amb 800 µL de tampó fosfat 0.05 M pH 7.2 i EDTA 1 mM. La reacció comença en afegir-hi

100 µL d'H_2O_2 10 mM. Se segueix la disminució de l'H_2O_2 a través de l'A_{240} (ε_{240} 39.4 M^{-1} cm^{-1}) durant 30 s.

Per a l'APX, 50-100 µL d'extracte s'incuba en 850 µL de tampó [HEPES-EDTA pH 7]. En aquest cas, s'estudia com minva l'ascorbat en afegir 50 µL d'H_2O_2 en funció de la variació de l'absorbància a 290 nm (ε_{290} 2.8 mM^{-1} cm^{-1}). En ambdós casos, les activitats s'expressen en µM de substrat oxidat per mg de proteïna i min.

5.3.3. Seguiment de paràmetres relacionats amb l'eficència fotosintètica

Quantificació de clorofil·les

Es pesen 30-60 mg del material i es congelen amb N_2 per disgregar-los. Seguidament, afegim 1.5 mL d'acetona 80% (v/v) freda i desem les mostres en agitació durant 12 h en una cambra freda i en foscor. La quantificació s'obté a partir de mesurar en un espectrofotòmetre les absorbàncies del sobrenandant a longituds d'ona de 750 nm, 665 nm, 645 nm i 630 nm segons el mètode tricoloromètric (Parsons i Strickland, 1962):

$$\text{Clorofil·la a} = 11.6\ A_{665} - 0.14A_{630} - 1.31A_{645} - 10.15A_{750}$$
$$\text{Clorofil·la b} = 20.7\ A_{665} - 4.34A_{630} - 4.42A_{645} - 11.94A_{750}$$
$$\text{Clorofil·la c} = 5.5\ A_{665} - 16.3A_{630} - 4.64A_{645} - 34.06A_{750}$$

Els resultats es normalitzen amb el pes fresc i, a més de mostrar les quantitats de les diferents clorofil·les. També s'hi inclou la relació entre la clorofil·la a i b.

Paràmetres relacionats amb l'eficiència fotosintètica

Els paràmetres relacionats amb la fotosíntesi s'avaluen en base a les mesures de la fluorescència de les mostres. Aquestes mesures s'efectuen a temperatura ambient, mitjançant un fluoròmetre portable (*pulse-amplitude modulation PAM-2000, Walz*). En primer lloc, el sistema amb les plàntules a estudiar es cobreix amb paper d'alumini durant 15 min, amb la finalitat d'adaptar les mostres a la foscor. Al cap d'aquest temps, la mostra s'excita amb un pols de llum de 800 ms i 0.1 µmol fotons/m^2·s d'intensitat per obtindre la fluorescència mínima dels centres del PSII, quan tots els centres reactius estan oxidats (adaptats a la foscor) (Fo). Tot seguit, les mostres es conserven durant 2 min en condicions de foscor i, amb un pols saturant de llum actínica de 800 ms i 3900 µmol fotons/m^2·s, s'obté el rendiment màxim de fluorescència en adaptació a la foscor (Fm) i el rendiment quàntic màxim del PSII respecte de la foscor (Fv/Fm). Aquest darrer rendiment estima la fracció d'energia llumínica que el PSII reté i es considera un paràmetre útil per esbrinar si les mostres sofreixen cap tipus d'estrés. A continuació es manté una llum basal amb una radiació fotosintèticament activa (PAR) d'entre 120-130 µmol·m^2·s^{-1} i s'apliquen polsos de llum actínica cada 60 s durant 15 min. Durant aquest temps, s'obtenen els valors mínims (Fo'), màxims (Fm') i estacionaris (Ft) de fluorescència per a cada pols. A partir d'aquests valors s'infereix, entre d'altres, el rendiment del

PSII (Y_{PSII}) i l'estat oxidatiu de la quinona A (Q_A) (qP) (Klughammer i Schreiber, 2008).

El Y_{PSII} s'obté del quocient 1- (Ft/Fm') i indica la fracció de fotons que capta i utilitza el centre actiu del PSII del total de llum incident. En base a Y_{PSII} es pot abordar la taxa de transport d'electrons a través del PSII (ETR, d'*electron transport rate*), la qual es defineix a partir del producte Y_{PSII} · PAR i es relativitza al valor màxim. El valor qP es defineix com a (Fm'-Ft)/(Fm'-Fo') i esdevé un indicador de l'estat d'oxidació de la quinona Q_A associada al PSII. En les plantes silvestres, en condicions de llum poc intensa la quinona acceptora del PSII es presenta majoritàriament en forma reduïda, mentre que s'oxida a mesura que augmenta la intensitat llumínica. El valors de qP pròxims a 1 indiquen que la Q_A està fonamentalment oxidada, mentre que els que tendeixen a 0 indiquen reducció. Per a tots els paràmetres, s'hans realitzat cinètiques en què s'explora les variacions durant 15 min i hem considerat com a dades representatives les mitjanes de 3 mesures independents en el temps de 15 min.

5.3.4. Aïllament de cloroplasts d'*Arabidopsis thaliana*

Les plantes crescudes en fotoperíode de dia curt són protegides de la llum durant 12 h per evitar que el midó malmene els cloroplasts. S'homogeneïtzen 15-20 g de fulles de plantes amb tampó d'extracció fred [sorbitol 330 mM; tricina-KOH 20 mM pH 8.4; EGTA 5 mM; Na_2EDTA 5 mM; $NaHCO_3$ 10 mM; BSA 0.1% (p/v); ascorbat 330 mg/L], mitjançant un morter refrigerat. L'extracte cru és filtrat a través d'una malla i centrifugat a

2000 rpm durant 4 min, a 4 ºC. El sediment obtés es resuspén amb 4 mL de tampó d'extracció amb Percoll al 40% (v/v) i es desa sobre un gradient de 4 mL de Percoll/tampó d'extracció (amb glutatió 132 g/mL) 70% i 8 mL de Percoll/tampó d'extracció 50% i se centrifuga a 5000 rpm durant 10 min, a 4 ºC. Es recupera la banda romanent entre la fracció 50-70% i es dilueix 3 vegades amb tampó d'extracció. La fracció de cloroplasts se centrifuga durant 3 min a 3000 rpm i es resuspenen amb 1 mL de tampó d'extracció. Finalment, se'n quantifica la clorofil·la i els cloroplasts es desen en foscor (Rensink et al. 1998).

5.3.5. Mesura del contingut de Cu endogen

Mesura del contingut endogen de Cu, Fe i Zn per ICP-MS

Les plàntules a estudiar són llavades 1 vegada amb una dissolució d'EDTA 20 µM i 3 vegades amb aigua milliQ (*MILLIPORE*). A continuació, s'eixuguen, es congelen amb N_2 líquid i es liofilitzen. L'anàlisi per espectrometria de masses amb plasma d'acoblament inductiu (ICP-MS) es duu a terme als Serveis Cientificotècnics de la Universitat de Barcelona.

Mesura del contingut de Cu endogen per absorció atòmica en càmera de grafit

Les plàntules crescudes en medis de cultiu són arreplegades i llavades 1 vegada amb una dissolució d'EDTA 20 µM i 3 vegades amb aigua milliQ (*MILLIPORE*). Tot seguit, s'eixuguen amb paper de filtre i es congelen amb

nitrogen líquid i es liofilitzen. En òrgans de planta adulta hem procedit a secar les plantes en una estufa a 65 ºC durant 2 dies. Es pesa el material secat (pes sec o DW) i es digereix entre 10-30 mg amb 0.5 mL d'HNO_3 *Suprapur* 65% (v/v) (*Merck*) durant 10 h a 80 ºC en un bany i se'ls hi afegeix 4 volums d'aigua milliQ. Paral·lelament, es preparen els patrons escaients.

En els cas dels cloroplasts aïllats, es va centrifugar un volum d'extracte a 3000 rpm durant 3 min a 4 ºC en els tubs de digestió. El sediment fou resuspés amb H_2O milliQ i secat en una estufa a 65 ºC durant 2 dies. Aquest material es va digerir amb 0.1 mL d'HNO_3 *Suprapur* 65% (v/v) (*Merck*) durant 10 h a 80 ºC i es va diluir amb 4 volums d'H_2O milliQ.

Les mesures del contingut de Cu en les mostres s'han fet amb un espectrofotòmetre d'absorció atòmica en càmera de grafit (*Zeeman, 4100ZL Perkin Elmer*) al Servei d'Espectroscopia i Absorció Atòmica (SCSIE, Universitat de València).

RESULTATS i DISCUSSIÓ

CAPÍTOL 1: CARACTERITZACIÓ DE LA RESPOSTA D'*Arabidopsis thaliana* A DIFERENTS ESTATS NUTRICIONALS DE COURE

1. Determinació del coure endogen en plàntules d'*Arabidopsis thaliana* crescudes en medis amb diferents concentracions de coure

Amb la finalitat de mesurar el contingut de Cu endogen en *A. thaliana* en funció del Cu present al medi, llavors de l'ecotip *Col0* van ser esterilitzades i crescudes en medis ½ MS amb concentracions entre 0 i 50 µM de $CuSO_4$. Els medis de cultiu foren preparats a partir de reactius concentrats, tal i com es descriu a l'apartat 1.3.1 de Materials i Mètodes. En assolir els 6 dies de creixement, les mostres recollides foren liofilitzades per quantificar el contingut en metalls, mitjançant ICP-MS als Serveis Cientificotècnics de la Universitat de Barcelona.

Els resultats obtesos mostren una tendència general de les plàntules crescudes en placa a acumular Cu a mesura que els nivells en el medi incrementen (Figura R1.1). Estudis previs indiquen que les plantes perceben mancança de Cu en el rang inferior a 5 µg/g de pes sec i excés en el superior a 20-30 µg/g (Märshner, 2002). Segons aquest supòsit, en estudiar els valors de Cu endogen envers la concentració de Cu del medi establim que la deficiència en Cu es produeix en medis ½ MS amb una la concentració per sota de 0.5 µM de $CuSO_4$ (Figura R1.1). Per un altre costat, en base a les nostres dades, l'estat nutricional d'excés de Cu es dóna en medis ½ MS amb una concentració igual o superior a 5 µM de $CuSO_4$ ja que, a partir

d'aquesta condició, les plàntules acumulen més de 20 µg/g de pes sec (Figura R1.1).

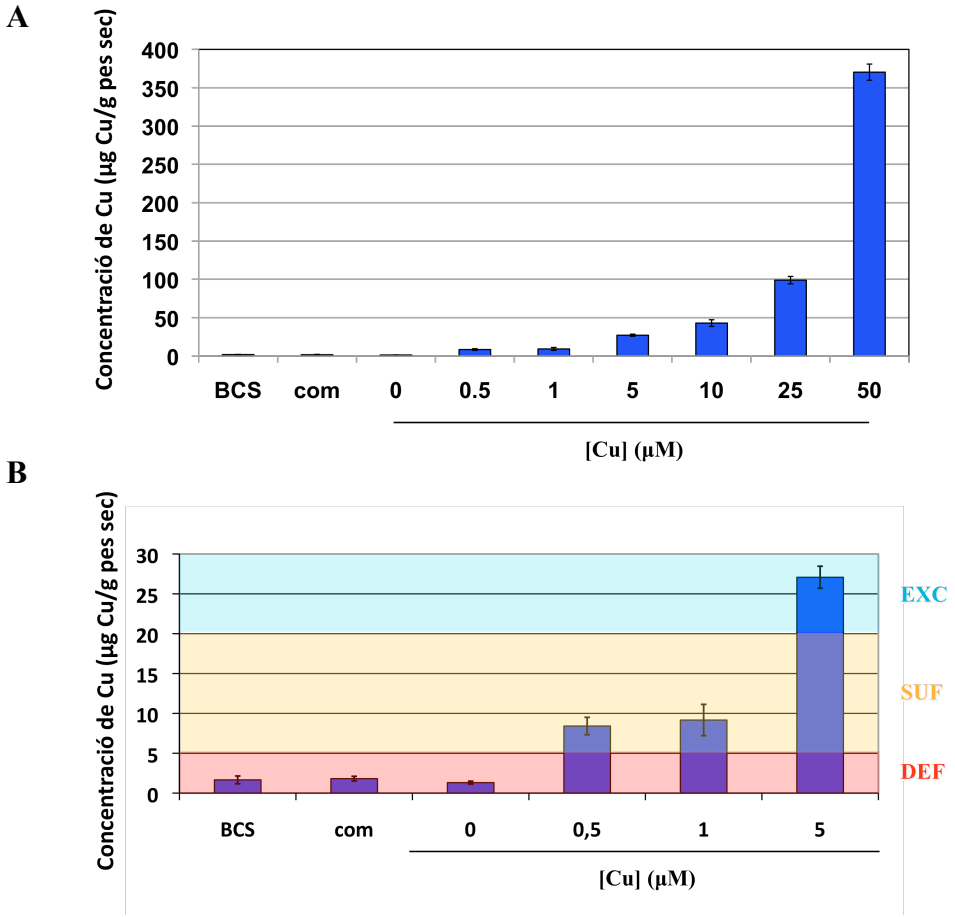


Figura R1.1: **Contingut en Cu endogen i estat nutricional en funció de la concentració de Cu en el medi ½ MS en plàntules d'*Arabidopsis thaliana*. A)** Concentració de Cu endogen determinada per ICP-MS a partir de plàntules de 6 dies crescudes en plaques amb medis de cultiu ½ MS comercial (*Sigma*) o ½ MS suplementats amb $CuSO_4$ (0-50 µM) o BCS 50 µM sota fotoperíode de dia llarg. **B)** Concentració de Cu endogen de les plàntules de la figura R1.1 en el medi ½ MS comercial, ½ MS suplementat amb BCS i dintre del rang 0-5 µM de $CuSO_4$. Hi distingim 3 estats nutricionals de Cu: la zona de dèficit de Cu (franja rosa; DEF), la regió de suficiència (franja groga; SUF) i la d'excés (franja blava; EXC) (Märschner et al. 2002). Les barres d'error representen la desviacio estàndard associada a la mitjana de tres experiments. Les barres d'error es corresponen amb la desviació estàndard del valor de la mitjana de 3 mesures independents.

A més dels medis indicats anteriorment, es va mesurar el contingut en Cu endogen de plàntules crescudes en el medi ½ MS comercial (*Sigma*) i el mateix medi tractat amb el quelant específic de Cu, anomenat BCS. Convé fer palés que, segons l'enraonament anterior, tant el medi ½ MS comercial *Sigma* (2.13 ± 1.07 µg Cu/g de pes sec), considerat l'estàndard per al creixement de plàntules en placa, com el mateix medi suplementat amb el quelant BCS (1.98 ± 0.97 µg Cu/g de pes sec) són medis deficients en Cu, ja que no aportarien la quantitat suficient de Cu que requereix la planta (Figura R1.1). Cal esmentar que, entre el medi comercial i el medi comercial suplementat amb BCS, no hi hem detectat diferències significatives en els valors de Cu endogen, probablement degut a què es tracta d'un micronutrient present en plantes a uns nivells que estan al voltant del límit de detecció del sistema utilitzat.

2. Quantificació del zinc i ferro endogen en plàntules d'*Arabidopsis thaliana* crescudes en medis amb diferent concentració de coure

A més del contingut en Cu endogen, també es va determinar la variació en funció de la concentració de Cu en el medi del contingut endogen en Fe i Zn, a partir de les plàntules utilitzades a la figura R1.1. En tot el rang de concentracions de Cu assajat, el contingut endogen de Fe i Zn roman dins el rang de suficiència, el qual s'estableix entre 150-500 µg/g pes sec per al Fe i entre 20-150 µg/g pes sec per al Zn (Figura R1.2; Märschner, 2002).

Pel que fa al contingut endogen de Zn, aquest es manté constant en els rangs de deficiència i suficiència de Cu en el medi. Tanmateix, en

consideració a la mesura per a la condició de Cu 0 µM, a partir de 25 µM de Cu en el medi de cultiu s'hi evidencia un increment significatiu en els nivells endògens de Zn (Figura R1.2). Per altra banda, les plàntules crescudes en medis suplementats amb quelant BCS no acumulen Zn de forma significativament diferent respecte d'aquelles crescudes en medi estàndard ½ MS comercial (Figura R1.2).

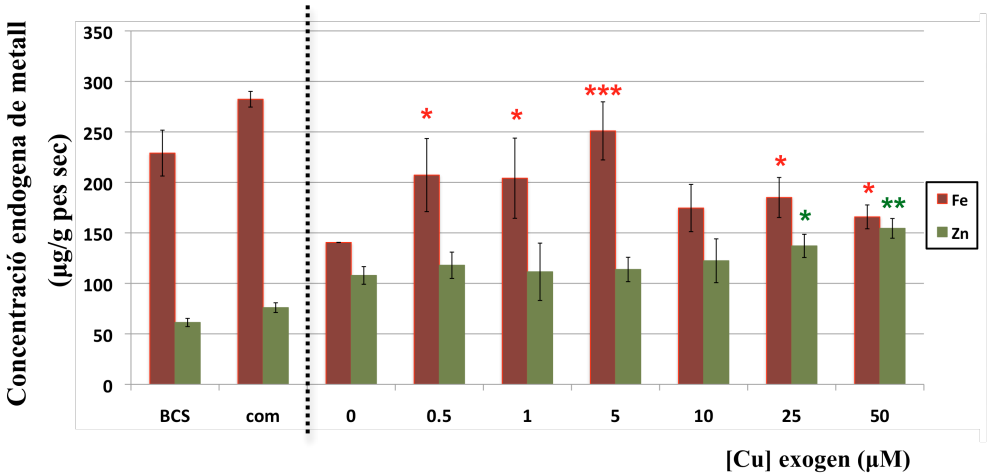


Figura R1.2: **Mesura del contingut endogen de Fe i Zn de les plàntules crescudes en diferents concentracions de Cu**. A partir de les plàntules analitzades a la figura R1.1 es va procedir a mesurar el Fe i Zn endogen per ICP-MS. Les barres d'error representades indiquen la desviació estàndard dels tres experiments independents que constitueixen la mesura i els asteriscs mostren les diferències significatives respecte del punt 0 µM Cu exogen amb un $p< 0.05$ (*), $p< 0.01$ (**) o $p< 0.005$ (***).

Nogensmenys, pel que concerneix el Fe, apreciem un increment significatiu en condicions de dèficit i suficiència de Cu (des de 0 fins a 1 µM de Cu). Per contra, a partir del rang d'excés de Cu (5 µM de Cu) el contingut de Fe minva a mesura que augmenta el Cu en el medi (Figura R1.2). Pel que fa als medis amb baixa disponibilitat de Cu, en presència del quelant BCS, tot i que les diferències no són significatives, la mitjana del

contingut en Fe és un 15% menor que en el medi comercial (*Sigma*; Figura R1.2), fet que suggereix que l'adquisició del Fe podria estar relacionada amb l'homeòstasi del Cu.

3. Identificació de gens marcadors per determinar l'estat nutricional de dèficit de coure

La utilització de gens marcadors resultaria interessant de cara a determinar l'estat nutricional de Cu (dèficit, suficiència i excés) en funció dels nivells de Cu presents al medi i, a més, ens permetrà comparar la resposta molecular de les plàntules amb els rangs teòrics proposats.

Per tal d'esbrinar si la resposta molecular de les plàntules que hem fet crèixer en les diferents condicions de Cu s'adiu a l'estat nutricional que hem postulat, vam dur a terme un experiment per qPCR amb un rang de concentracions de Cu a escala micromolar amb els diferents gens candidats a marcadors. En funció de l'expressió es va definir el paràmetre 50% d'inducció o repressió, segons el cas, el qual fa referència a la concentració de Cu en el medi per a què obtenim el 50% del màxim d'expressió. L'esmentat paràmetre ens serveix per avaluar la sensibilitat al Cu del marcador d'estudi, de forma que com més baix és el valor, major és la sensibilitat a la presència del metall i com més gran, més sensible a la deficiència de Cu.

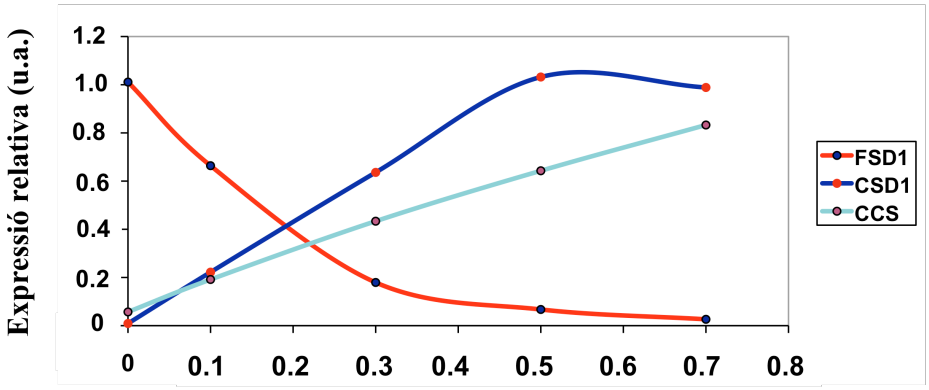


Figura R1.3: **Anàlisi per qPCR dels nivells d'expresió dels gens *FSD1*, *CSD1* i *CCS* en plàntules crescudes en medis amb diferents concentracions de Cu**. L'RNA total de plàntules de 7 dies crescudes en ½ MS suplementat amb sacarosa 1% i les concentracions de $CuSO_4$ indicades (0, 0.1, 0.3, 0.5 i 0.7 µM) fou retrotranscrit a cDNA i analitzat per qPCR mitjançant els encebadors escaients (Materials i Mètodes). El gen de la *UBQ10* s'utilitza per normalitzar els valors. Les dades mostrades corresponen a la mitjana de 2 experiments.

Atés el caràcter antagònic de les superòxid dismutases de Cu/Zn i Fe, es va decidir estudiar-les com a marcadors moleculars en les nostres condicions experimentals (Introducció; apartat 3.2.4). En primer lloc, es va estudiar el comportament dels gens *FSD1* i *CSD1*. Tal i com es mostra a la Figura R1.3, l'mRNA d'*FSD1* presenta nivells màxims quan no afegim Cu al medi (½ MS + Cu 0 µM) i el 50% d'expressió en medis amb Cu 0.2 µM (Taula R1.1). L'expressió del gen és indetectable a partir de concentracions de 0.5 µM de Cu. Destaquem que en presència de BCS 100 µM els valors d'expressió d'*FSD1* no varien significativament dels obtesos per a ½MS + Cu 0 µM en plàntules de 7 dies i 25 dies.

Contràriament, detectem els valors màxims per a *CSD1* a partir de 0.5 µM de Cu i el 50% d'inducció al voltant de 0.2 µM de Cu (Taula R1.1). Tanmateix, el gen de la metal·locarabina *CCS*, que s'encarrega de donar el

Cu a *CSD1,* es detecta en condicions de suficiència i excés de Cu. A la figura R1.3, *CCS* es comporta de la mateixa manera que *CSD1,* tot i que el 50% d'expressió s'assoleix al voltant de 0.3 µM de Cu (Figura R.1.3; Taula R1.1).

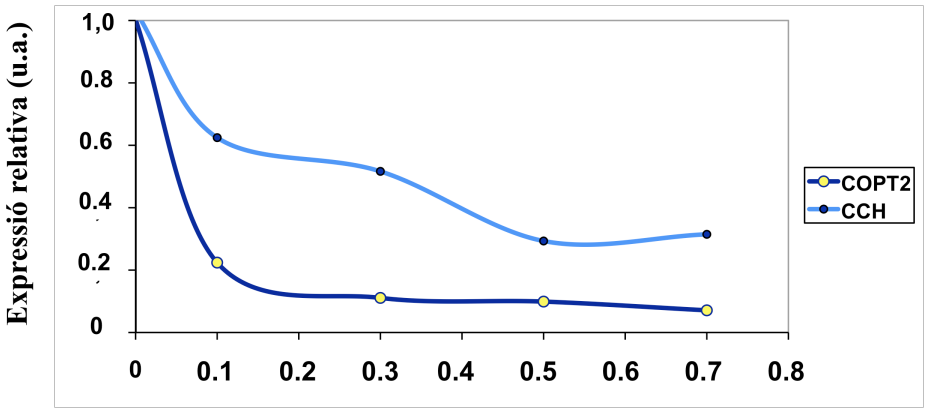


Figura R1.4: **Anàlisi per qPCR dels nivells d'expresió dels gens *COPT2* i *CCH* en plàntules crescudes en medis amb diferents concentracions de Cu**. L'RNA total de plàntules de 7 dies crescudes en ½ MS suplementat amb sacarosa 1% i les concentracions de Cu indicades (0, 0.1, 0.3, 0.5 i 0.7 µM) fou retrotranscrit a cDNA i analitzat per qPCR mitjançant els encebadors escaients (Materials i Mètodes; Taula M2). El gen de la *UBQ10* s'utilitza per normalitzar els valors. Les dades mostrades corresponen a la mitjana de 2 experiments

Paral·lelament, es va seguir la variació d'uns altres dos candidats a marcadors de dèficit de Cu relacionats amb l'homeòstasi del Cu: *COPT2* i *CCH*. El gen *COPT2*, com descriurem més endavant, és un transportador de Cu d'alta afinitat que s'expressa principalment en condicions de dèficit de Cu (Capítol 2; Sancenón et al. 2003; Yamasaki et al. 2009; del Pozo et al. 2010). Mitjançant qPCR es demostra que el màxim d'expressió s'obté quan no suplementem amb Cu el medi ½ MS. La presència en el medi de BCS 100 µM no causa cap increment significatiu en l'expressió de *COPT2* en plàntules de 7 i 25 dies (dades no mostrades). Així i tot, l'expressió de

COPT2 és tan esbiaixada envers el rang de dèficit de Cu que detectem el 50% del màxim d'expressió al voltant de 0.06 µM (Figura R1.4 i Taula R1.2). Per altra banda, *CCH* codifica una metal·locarabina que podria estar involucrada en la mobilització del Cu des dels transportadors de Cu de membrana plasmàtica fins a ATPases tipus P_{1B} de Cu (Mira et al. 2001a; Mira et al. 2004). El gen *CCH* s'indueix en dèficit de Cu (Himelblau et al. 1998; Yamasaki et al. 2009). De fet, el comportament de *CCH* segueix la tendència de *COPT2* però el 50% de la inhibició máxima es produeix a concentracions de Cu en el medi al voltant de 0.2 µM (Figura R1.4 i Taula R1.1)

Taula R1.1: Concentracions aproximades de Cu exogen per a què s'obté el 50% del màxim de l'expressió dels gens proposats. A partir de les dades representades a les figures R1.3 i R1.4 es determina aproximadament la concentració de Cu exogen per a què l'expressió relativa dels gens indicats assoleix la meitat del màxim d'expressió (inducció o repressió, segons el cas).

Gen	50% d'inducció	Gen	50% de repressió
FSD1	≈ 0.2 µM	***CSD1***	≈ 0.2 µM
COPT2	≈ 0.06 µM	***CCS***	≈ 0.3 µM
CCH	≈ 0.2 µM		

Tot plegat, en base als nivells dels mRNA dels gens estudiats suggerim que *COPT2* és el marcador més sensible per detectar concentracions mínimes de Cu.

DISCUSSIÓ

En estudiar l'acumulació de Cu endogen respecte del Cu present al medi, hem establert que, sota les nostres condicions de creixement, els medis en placa ½ MS suplementats amb un rang de Cu entre 0.5 i 1 µM representen el rang de suficiència (5 i 20 µg de Cu per gram de pes sec; Mäschner, 2002) per a plàntules d'*A. thaliana* de 6 dies (Figura R1.1 i Taula R1.2). A més d'identificar les zones de transició entre els diferents estats nutricionals de Cu, hem determinat que el medi ½ MS comercial (*Sigma*) no aporta el Cu suficient per a les plàntules d'*A. thaliana* (2.13 ± 1.07 µg Cu/g pes sec i Figura R1.1). Aquesta observació és corroborada en treballs recents, segons els quals el medi MS conté 0.1 µM de Cu i les plantes crescudes en aquest medi sofreixen un lleuger dèficit de Cu (revisat per Burkhead et al, 2009). De fet, les plàntules crescudes en medi ½ MS comercial experimenten una lleugera pèrdua de pes fresc i una disminució en el rendiment quàntic del PSII respecte dels medis suplementats amb Cu (Taula R1.2; Adbel-Ghany et al. 2005; Yamasaki et al. 2009).

A més de les dades de Cu endogen i de les evidències fisiològiques adès esmentades, disposem de dades moleculars que indiquen que el medi ½ MS comercial és deficient en Cu ja que els gens involucrats en la resposta al dèficit de Cu, com ara *COPT1*, *COPT2, FSD1* o *FRO2* estan induïts (Figura R1.3 i R1.4; Yamasaki et al. 2009). La inducció dels gens de resposta a dèficit de Cu, i concretament els transportadors COPT, permeten que la planta puga subsistir en medis deficients en Cu.

Per altra banda, no hem identificat cap marcador molecular ni hem observat alteracions fisiològiques per al rang entre 5-25 µM de Cu que ens permeten definir l'excés de Cu. Tan sols en medis suplementats amb 50 µM de Cu es produeix una pèrdua en pes fresc i una reducció de la longitud de l'arrel principal de vora el 50% (Taula R1.2; Andrés-Colás et al. 2010).

Pel que concerneix l'acumulació endògena de Fe i Zn en funció del Cu en el medi, hem apreciat que, tot i que sempre es mantenen dins un rang de suficiència, l'increment del contingut en Zn és estadísticament significatiu a partir de concentracions de 25 µM de Cu en el medi. En el cas del Fe, els increments es produeixen durant l'hipotètic rang de suficiència de Cu mentre que en assolir el rang d'excés de Cu es produeix una davallada en els nivells de Fe. No obstant, en comparar l'acumulació entre els medis comercials, ens adonem que, en presència del quelant BCS, el contingut de Fe endogen es redueix en un 15% (Taula R1.1). Per tant, segons aquestes dades l'adquisició de Zn, i sobretot, de Fe està relacionada amb l'homeòstasi del Cu (Taula R1.3).

Suggerim dues explicacions per tal d'explicar les variacions en el contingut de Zn i Fe endogen en funció del Cu present en el medi de cultiu. En primer lloc, basant-nos en el comportament de les superòxid dismutases, l'increment dels nivells de Zn a mesura que el Cu augmenta en el medi es podria explicar, en part, en funció de la necessitat de Zn per part de la Cu/ZnSOD per esmenar la producció de ROS que es generen sota aquestes condicions. Per contra, atès el comportament de la FeSOD, es podria interpretar que, a partir de condicions d'excés de Cu (5 µM de Cu), la

manca de participació de la FeSOD en la detoxificació de radicals faria minvar els requeriments de la planta pel Fe. Tanmateix, hem observat que l'adquisició de Fe està relacionada amb l'homeòstasi del Cu. En la literatura disposem de diversos exemples en què es palesa la dependència de l'adquisició del Fe en funció de la disponibilitat Cu en organismes diferents a les plantes. El transportador de Fe d'alta afinitat de *S. cerevisiae*, constituït pel complex Ftr1-Fet3, necessita de Cu per poder dur a terme la seua funció ja que la ferroxidasa Fet3 utilitza com a cofactor el Cu (revisat per Puig i Thiele, 2002). La ceruloplasmina d'humans també és una cuproproteïna amb activitat oxidasa, homòloga a Fet3 de llevat, implicada en la oxidació del Fe^{2+} a Fe^{3+}, de manera que facilita el transport del Fe en la sang (revisat per Hellman i Gitlin, 2002). En segon lloc, en els transportadors de metalls *A. thaliana* s'ha descrit una manca de selectivitat. El transportador IRT1 pertany a la família ZIP i constitueix un sistema de transport de Fe^{2+} independent del Cu. Ara bé, tot i que el substrat prioritari d'IRT1 és el Fe^{2+}, aquest transportador també és capaç d'adquirir Cu^{2+}, Mn^{2+}, Zn^{2+} i Cd^{2+} (Eide et al. 1996; Korshunova et al. 1999). Dintre de la famíla ZIP, també trobem transportadors de Zn^{2+}, d'entre els quals ZIP4, a més d'incorporar Zn també deu ser capaç de transportar Cu^{2+} ja que complementa els problemes de creixement de la soca mutant de *S. cerevisiae ctr1Δ* en medis no fermentables (Grotz et al. 1998; Wintz et al. 2003). Per altra banda, la família OPT comprén els transportadors YSL, els quals s'encarreguen del transport de conjugats de Fe^{2+}, Cu^{2+}, Zn^{2+}, Mn^{2+}, Co^{2+} i Ni^{2+} amb NA (Curie et al. 2008). En conseqüència, atès l'existència de transportadors capaços d'incorporar diferents metalls, les variacions descrites en el contingut de Fe

i Zn en funció del Cu exogen es podrien explicar, en part, per la competència que exerceix el Cu sobre els altres potencials substrats.

Estat nutricional Cu	dèficit	suficiència		excés			
Cu exogen (µM)	0	0.5	1	5	10	25	50
Cu endogen (µg/g PS)	1.31	8.42	9.17	27.08	42.93	98.95	370.30
Gens expressats	*COPT2* *FSD1* *CCH*	*CCS* *CSD1* *CCH*	*CCS* *CSD1*	*CCS* *CSD1*			
Efectes fisiològics	Pèrdua pes fresc Descens en rendiment quàntic del PSII	No s'hi observen alteracions				Pèrdua pes fresc Reducció 50 % longitud arrel Increment MDA	
Altres metalls	Fe Zn	Fe Zn	Fe Zn	Fe Zn	Fe Zn	Fe Zn	Fe Zn

Taula R1.2: **Resum de la resposta d'*A. thaliana* al Cu exogen**. Dades obteses de plàntules de 7 dies crescudes en medis ½ MS suplementat amb les concentracions de Cu exogen indicades. Es mostra per a cadascuna de les concentracions el contingut en Cu endogen així com els marcadors moleculars, efectes fisiològics i comportament d'altres metalls. S'hi inclou l'estat nutricional deduït a partir de les dades mostrades en el present capítol.

Mitjançant una aproximació molecular de qPCR hem corroborat els rangs nutricionals establerts per al Cu sota les nostres condicions de creixement. El rang de dèficit de Cu es correspon amb el tram d'expressió d'*FSD1* mentre que en el rang de suficiència i excés s'indueix *CSD1*. En aquest cas, *FSD1* assoleix els valors màxims per sota de 0.1 µM de Cu i al voltant de 0.2 µM comparteix el 50% d'expressió amb *CSD1*. Aquest fenomen corrobora la substitució coordinada de les SOD (Abdel-Ghany et

al. 2005a) i que els sensors transcripcionals de l'estat nutricional de Cu actuen en els rangs que hem definit i suggereix que, per a les nostres condicions, la suficiència de Cu comence a partir de 0.2 µM de Cu. En segon lloc, hem utilitzat un gen regulat per Cu: el del transportador *COPT2,* que s'expressa principalment en medis amb concentracions de Cu inferiors a 0.06 µM, que proposem com un marcador sensible per detectar la presència de quantitats mínimes de Cu, ja que l'mRNA de *COPT2* assoleix la meitat del màxim d'inducció a concentracions de Cu exògenes inferiors a 0.1 µM (Figura R1.4; Taula R1.1 i R1.2).

CAPÍTOL 2: EL TRANSPORTADOR DE COURE D'ALTA AFINITAT COPT2

1. Anàlisi de la seqüència proteica del transportador COPT2

El gen *COPT2* (At3g46900) d'*A. thaliana* codifica una proteïna de 158 aminoàcids que presenta un 78% d'identitat amb el transportador COPT1 (Figura R2.1A). Segons el perfil d'hidrofobicitat, es defineixen tres segments transmembrana (TMD) compresos entre els aminoàcids 49-74 (TMD1), 89-111 (TMD2) i 116-145 (TMD3). A més, COPT2 presenta les metionines conservades de la zona aminoterminal (Met^{32}) i del motiu MxxxM, a nivell del TMD2, que en Ctr1 de *S. cerevisiae* esdevenen essencials per a l'adquisició de Cu (Figura R2.1A; Puig et al, 2002). Com és habitual en altres membres de la família CTR, també hi trobem dos motius rics en metionines a la zona aminoterminal, el motiu GxxxG del TMD3 i el motiu CxC a l'extrem carboxiterminal (Figura R2.1B). Per tant, COPT2 posseeix els trets definits de la seqüència canònica dels transportadors de Cu d'alta afinitat de la família CTR (Puig et al, 2002). Segons la topologia dels altres membres de la família CTR, l'extrem aminoterminal de COPT2 deu estar exposat envers l'espai extracel·lular, mentre que l'extrem carboxiterminal es deu establir cap al citosol (Figura R2.1B).

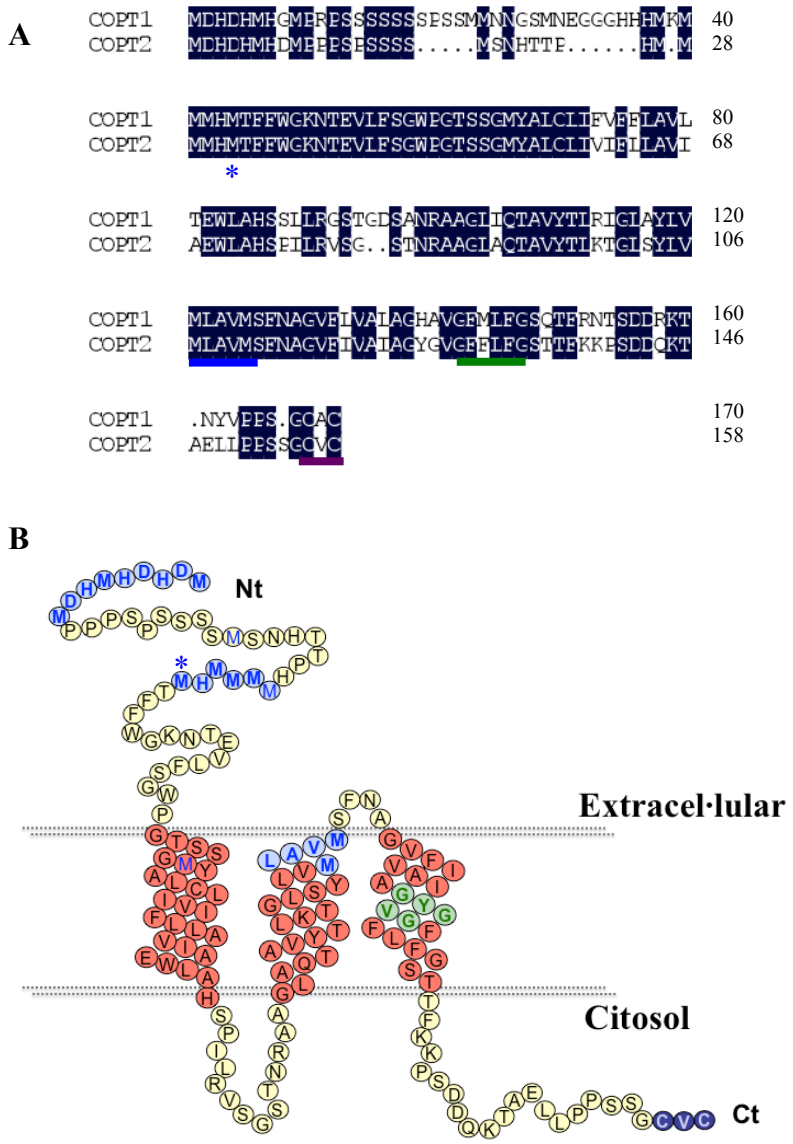


Figura R2.1: **Comparació de la seqüència de COPT1 i COPT2, i topologia de COPT2**. **A**) Aliniament de la seqüència entre les proteïnes COPT1 i COPT2 en base a les condicions preestablertes del programa DNAMAN. Al marge dret s'indica la posició dels aminoàcids. S'hi indica els residus conservats (negre), a més de la metionina conservada del domini aminoterminal (asterisc blau) i el motiu MxxxM del TMD2 (línia roja). **B**) Topologia de la seqüència codificant de COPT2 amb els tres possibles segments transmembrana (roig), els diferents motius rics en metionines i histidines (blau), el motiu GxxxG del TMD3 (verd) i el motiu ric en cisteïnes CxC (lila).

2. Localització subcel·lular de COPT2

Prèviament, al nostre laboratori s'havia descrit que l'expressió de *COPT2* en la soca *ctr1Δctr3Δ* de *S. cerevisiae* complementa la manca de creixement del mutant en medis amb fonts de carboni no fermentables, i permet l'adquisició d'unes altes taxes d'incorporació de ^{64}Cu (Sancenón et al. 2003). En base a aquestes dades, la nostra hipòtesi de partida postula que COPT2 és un transportador de Cu de membrana plasmàtica (Sancenón et al. 2003). Amb la finalitat d'esbrinar la localització subcel·lular de COPT2, es va construir una proteïna de fusió en què es va etiquetar COPT2 amb la GFP a l'extrem carboxiterminal. A partir del plasmidi *p426GPD::COPT2* es va amplificar la seqüència codificant de COPT2 mitjançant els encebadors COPT2-SalI-F i COPT2-NcoI-R i es va clonar en fase amb la GFP del vector *pCaMV(35S)::sGFP* (Materials i Mètodes, apartat 3.3)

2.1. Funcionalitat de la proteïna de fusió COPT2::GFP en llevat

Per tal d'avaluar la funcionalitat de la proteïna de fusió COPT2::GFP en llevat, es va amplificar *COPT2::GFP* a partir del plasmidi *pCaMV(35S)::COPT2::sGFP* amb els encebadors COPT2-ATG-HindII-F i GFP-R-SalI i es va clonar en el vector *p426GPD* (Materials i Mètodes; Taula M3). Tot seguit, es va transformar la soca de *S. cerevisiae ctr1ctr3Δ* amb el vector buit i els plasmidis *p426GPD::COPT1* i *p426GPD::COPT2* (Sancenón et al. 2003).

Com es mostra a la Figura R2.2, els transformants creixen en medis selectius SC-ura amb glucosa com a font de carboni. Ara bé, la suplementació del mateix medi amb el quelant de Fe BPS (àcid 4,7-difenil-1,10-fenantrolina-disulfònic) 100 µM, força que l'adquisició del Fe es duga a terme mitjançant el complex transportador de Fe d'alta afinitat dependent de Cu (Introducció; apartat 3.1.1). Sota aquestes condicions, la soca *ctr1Δctr3Δ* transformada amb el vector no creix ja que no pot distribuir el Cu a través de la ruta de secreció cap a l'oxidasa de Cu, Fet3, associada al transportador de Fe d'alta afinitat (Figura R2.2). Com s'havia descrit en Sancenón et al. (2003), els mutants transformats amb els transportadors COPT1 i COPT2 complementen el fenotip i esmenen els problemes de creixement (Figura R2.2). De la mateixa manera, la quimera COPT2::GFP també és capaç de complementar el mutant *ctr1Δctr3Δ* en la mateixa mesura que els controls amb COPT1 o COPT2 (Figura R2.2).

En medis amb font de carboni no fermentable (glicerol), el creixement del llevat depén de la correcta distribució del Cu al mitocondri per a la COX. En medis amb glicerol suplementats amb Cu 100 µM, els transformants poden crèixer, ja que el Cu es pot adquirir a través de mecanismes de transport de baixa afinitat (Figura R2.2). Nogensmenys, en eliminar el Cu del medi, la seua incorporació s'ha d'efectuar a través dels mecanismes d'alta afinitat, de manera que els mutants transformats amb el vector són incapaços de crèixer, mentre que COPT1, COPT2 i la quimera COPT2::GFP complementen la mutació (Figura R2.2).

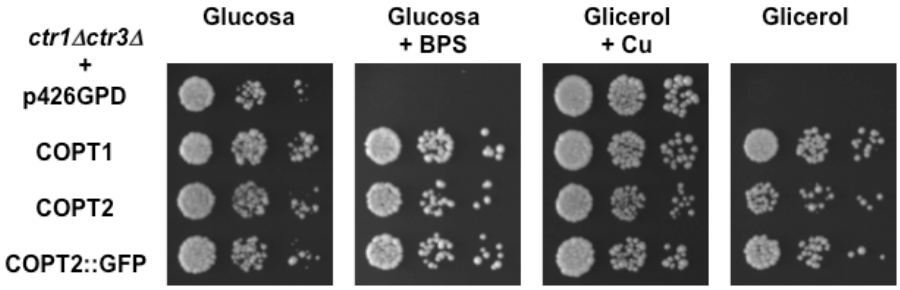


Figura R2.2: Complementació de la soca mutant de llevat *ctr1Δctr3Δ* amb COPT2::GFP. La soca de *S. cerevisiae ctr1Δctr3Δ* fou transformada amb el vector *p426GPD::COPT2::GFP* i crescuda en medi selectiu fins assolir la fase logarítmica. Es va fer dilucions 1/10 respecte de l'anterior i es va sembrar gotes. Els medis de creixement escollits són SC-ura amb glucosa, BPS 100 µM i glicerol suplementat o no amb Cu 100 µM. Les plaques es fotografien després de 3 dies a 30 ºC. Com a control negatiu s'hi inclou el vector buit i com a controls positius, el vector amb *COPT1* i *COPT2*.

El resultat d'aquest experiment indica que la quimera COPT2::GFP complementa el dèficit de creixement del mutant *ctr1Δctr3Δ* de la mateixa manera que ho fa *COPT2* i *COPT1*. Conseqüentment, descartem que l'etiqueta GFP implique alteracions funcionals en l'adquisició de Cu en llevat.

2.2. Localització subcel·lular de COPT2::GFP en protoplasts d'*A. thaliana*

L'estudi de la localització subcel·lular de COPT2 és va dur a terme mitjançant la transformació transitòria de protoplasts aïllats de fulles de roseta d'*A. thaliana* amb el plasmidi *pCaMV(35S)::COPT2::sGFP*, el qual dirigeix l'expressió de COPT2::GFP sota el promotor *CaMV(35S)* (Materials i Mètodes; apartat 3.3).

En primer lloc s'estudia el senyal de la quimera COPT2::GFP, el qual es localitza als voltants dels protoplasts (Figura R2.3). Tot seguit s'obté el senyal fluorescent de la clorofil·la per generar una imatge de solapament que ens permet considerar la fluorescència deguda exclusivament a COPT2::GFP. Com a control, vam comparar el patró obtés amb el de la proteïna de localització citosòlica, GFP (Figura 2.3). Per tant, concloem que COPT2::GFP és una proteïna de membrana plasmàtica.

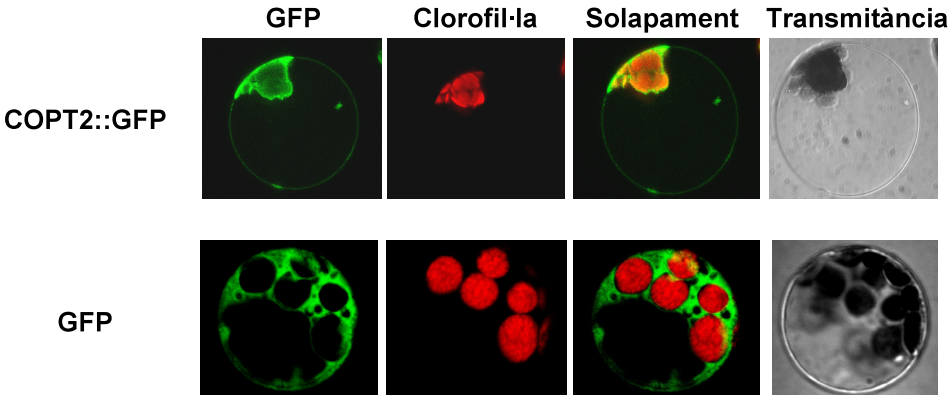


Figura R2.3: Localització subcel·lular de la quimera COPT2::GFP. Protoplasts d'*A. thaliana* foren aïllats a partir de fulles de roseta i transformats transitòriament amb el vector *pCaMV(35S)::COPT2::GFP*. El senyal de la GFP, l'autofluorescència dels cloroplasts, l'ensolapament de fluorescències i la imatge de transmitància. Com a control es va transformar els protoplasts amb la GFP.

3. Estudi de l'expressió gènica de *COPT2*

3.1. Estudi *in silico* de la seqüència promotora de *COPT2*

Amb l'objectiu d'establir els hipotètics elements de regulació i de direccionament a òrgans presents al promotor de *COPT2* (a partir d'ara *pCOPT2*) es va analitzar la seqüència dels 1329 pb adjacents al codó d'inici de la seqüència codificant del gen *COPT2,* mitjançant el servidor PLACE (http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/signalscan.html).

L'anàlisi del *pCOPT2* detecta quatre motius GTAC, possiblement involucrats en la resposta a Cu (Kropat et al. 2005; Yamasaki et al. 2009) a -155 pb, -118 pb, -112 pb i -104 pb; i una caixa E (*E-box*) implicada en la unió de factors transcripcionals tipus *bHLH* (hèlix-volta-hèlix), com el factor de resposta a dèficit de Fe, FIT1 (Colangelo i Guerinot, 2004; Hartmann et al. 2005) (Figura R2.4). També es fa palés l'aparició de múltiples elements de regulació per llum i ritme circadià. Dins aquest grup, volem destacar un element de ritme circadià CAANNNNATC o element *evening* en posició -38 pb, que en tomaca modula les oscil·lacions circadianes tant dels gens *Lhcb* com dels gens regulats per fitocroms (Piechulla et al. 1998) (Figura R2.4). Per altra banda, trobem diversos elements que en plantes estan involucrats en la regulació per llum, com ara diverses caixes GATA posicionades a -338, -744, -830, -1161 i -1205 pb; 8 elements GRWAAW a -34, -251, -830, -874, -875 i -1205 pb; una YTCANTYY a -756 pb; i una caixa T tipus ACTTTG ubicada a -1296 pb

(Zhou 1999; Nakamura et al. 2002; Chan et al. 2001; Rubio-Somoza et al. 2006) (Figura R2.4).

A

```
-1329 TAAAAGTCAG ATTTTTTTTT ACTCTCTGTA ACTTCATTTT TATCTAAAGC
-1279 CATGTAATTG AGACTTTAAG TGGTGTTAAA GCTTTTGCAA CAATTATTAT
-1229 TAGAACATAT CTCTAAAATA TTGGATAATA TTTTCTCATC TTCTATAAAT
-1179 ACTATTTTCA CCAAAATGAT ATTATTATTT TAGGCTTTCT TTATAAAAAA
-1129 CGTAAGTATT GATTGTCAAA AAGTGTACTC TCCCAAAATA TTCCACTACG
-1079 ATTTTGTTAA TACGTAAGTT TTCAAATTTT CCTAATTCAT CTTCTTAATT
-1029 TGTGTGTTCA TATACTATTG TCTTCTTTGT GTTTGAGTGT TTTGGTTTTG
-979  TATATTTTTT TTTTATGATT AAAATTCTAG TGATTATCAA TTTTTTTTCT
-929  TATTACTATC TATACATATA TGCTTAGTTT ATGGGGAATT CCCAAAAGAG
-879  TAAGGAAAAA GGTCAATACA AACTGTGTCG TGAGGTTTTG AGGCTTGTGA
-829  TAATCTATGG TCATTCTTCA CGATGGTTTA TCATTGGTCT TTGTTTATAT
-779  ACAAAGTTAT GATTCACAAT CGCTCACTTT TTATGATATT TTCATGATTT
-729  TGTTTTGTGA ATAAAAGTGT ATAAAATTAT AAACCAATAA TACAATAATT
-679  TAAATCATTA ACAATCATAG ATTCTTTTGT TTTTAGTTGA ATATCACAAA
-629  AAAATTGATG ACTTTATTAA ATTATGAATC CAATAACTTC AGATTTATTA
-579  AGACTTTAGA TTACTTTTTA CAAATCAAAA TTTAATAACA CTAAACTTTA
-529  ATAGAATCTT ATAAAATCTT AATTGAATAA CAAAAGATTT TTCATAACAT
-479  TTCAAACCAC TAAAAATCTA TATAAATAAC AAACCAATAA CACCTCCTTA
-429  ATTTTGGTTT TGAAACCTAA GTTACTAAAT CCTTAATTAC ATTTGTATAA
-379  ATTCTTTTCA AATTATTAGA TTTATTCTAA ATTAAAATTA GATATTCTGT
-329  GTAAATTATT TATTATACCA ACGCAAAGAA GATTAGACGA AGAGGCATGG
-279  AGTTGTAATG TTGTATCATG CAAATAAGGT AAATACTATA TATATATTTA
-229  GGGGATTATA TAGTTGTCTT TCTTTTGAAC ATCTATTTAA GGGGATTTTC
-179  TAAATTCTAA TATAACGAAT GTTTGTACTA CACAAAAAAA TTTAACAAGT
-129  CAAAAGATGA TGTACTTGTA CTACAGTACA ACACATACAT TTAAGAAATC
-79   ACAATAAATA CGAACCGATT CTCTCTTAAA AATTTTGTCT ACAAGAAAAT
-29   CAATCATAAA CCCTATTAAC ATTAGTATCA TG
```

B

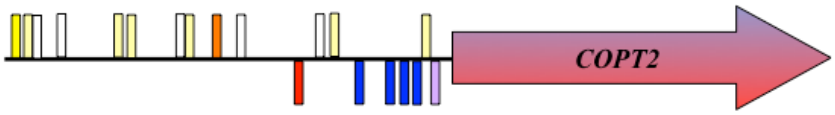


Figura R2.4: Anàlisi *in silico* de la seqüència promotora de *COPT2*. A) Anàlisi dels 1329 pb analitzats amb el servidor PLACE. Al marge esquerre s'indica la posició relativa dels nucleòtids, considerant que la posició +1 correspon al primer nucleòtid de la seqüència codificant de *COPT2* (subratllat i amb negreta). S'hi destaca les caixes d'expressió tissular: CACT (mesòfil·le, verd), GTGA (expressió al pol·len, rosa), AGAAA (pol·len, turquesa), ATATT (arrel, marró), AAAG (endosperm, taronja) i les de possibles regulacions: CANNTG (caixa E, roig) GTAC (elements de resposta a coure o CuRE, subratllats en blau). Les fletxes morades ubiquen els encebadors emprats per clonar el fragment de promotor que es fusiona a *GUS*. **B)** Esquema amb la distribució aproximada dels elements reguladors del promotor: motius GTAC (blau), caixa E (roig), element *evening* (lila) i les caixes implicades en regulació per llum: GATA (blanc), GRWAAW (crema), YTCANTYY (taronja) i ACTTG (groc).

A més de la regulació per Cu, per Fe, llum i per ritme circadià, el *pCOPT2* presenta diverses caixes d'expressió en òrgans. En concret destaquem 3 motius CACT relacionats amb l'expressió al mesòfil·le (Gowik et al. 2004), 4 motius GTGA i 2 de tipus AGAAA de direccionament al pol·len (Rogers et al. 2001; Bate i Twell 1998; Filichkin et al. 2004), 8 caixes ATATT, les quals en tabac són capaces de dirigir el gen *β-glucuronidasa* a l'arrel (*Nicotiana tabacum*; Elmayan i Tepfer 1995), i 11 caixes AAAG d'expressió a l'endosperm (Yanagisawa i Schmidt 1999; Yanagisawa 2000) (Figura R2.4).

3.2. Establiment del patró d'expressió tissular del gen *COPT2*

Amb la finalitat d'establir els teixits on s'expressa *COPT2,* es va fusionar el gen de la β-glucuronidasa sota el control del *pCOPT2*. Per dur a terme

aquest propòsit, a partir de gDNA de fulles de planta adulta d'*A. thaliana*, es va amplificar per PCR els 1246 pb del *pCOPT2* més pròxims al primer nucleòtid de la seqüència codificant del gen *COPT2* amb els encebadors COPT2-1200F-HindIII i COPT2-ATG-R-XbaI i es va clonar entre els llocs *Hind*III/*Xba*I del vector *pFP101:GUS::NOS* (Materials i Mètodes, apartat 2.3.1). Tot seguit, es va utilitzar la construcció generada per transformar *A. thaliana* mitjançant *A. tumefaciens* i es va seleccionar les llavors transgèniques en base a la fluorescència (Materials i Mètodes, apartat 1.3.2). A partir de 8 línies independents es va obtenir la segona generació per a destriar els individus homozigots dels hemizigots i es va escollir la línia homozigota *pCOPT2::GUS::NOS* D.

Les llavors de la línia *pCOPT2::GUS::NOS* D es van crèixer durant 8 dies en plaques de medi ½ MS comercial (*Sigma*) i es van sotmetre a la reacció de la β-glucuronidasa (Materials i Mètodes; apartat 4.3.2). Sota aquestes condicions, les plàntules de 8 dies presenten tinció en la major part de l'arrel principal, a excepció de l'àpex (Figura R2.5A i B). Aquest patró es reprodueix en les arrels laterals i els talls transversals de l'arrel principal indiquen que la distribució de la tinció correspon a les zones pròximes a l'exodermis i al còrtex (Figura R2.5D i E). Addicionalment, també s'hi aprecia tinció a les pil·lositats radiculars (Figura R2.5C). A nivell de la part aèria de la plàntula, els cotiledons mostren una tinció general, però de forma més notòria a les nervadures (Figura R2.5F). El meristema apical i els tricomes també desenvolupen tinció (Figura R2.5G). En plàntules de 14 dies crescudes en medis ½ MS suplementat amb BCS 100 μM, s'aprecia que la tinció se centra a les fulles vertades emergents (Figura R2.5H).

Segons els resultats presentats, *COPT2* és un gen que en el cos vegetatiu de la planta s'expressa a nivell de les arrels, cotiledons, meristemes tricomes i fulles vertaderes emergents. Tanmateix, els talls transversals d'arrels tenyides indiquen que *COPT2* s'expressa preferentment a les cèl·lules del còrtex i de l'exodermis.

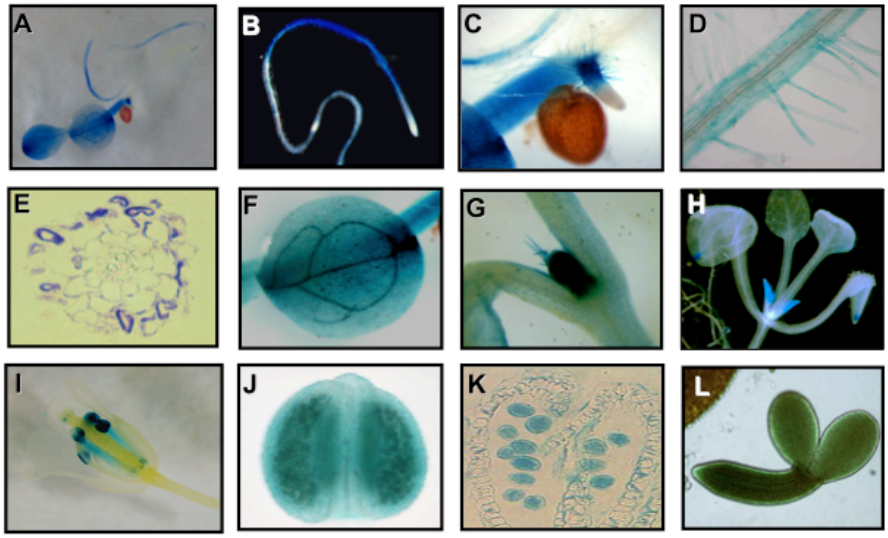


Figura R2.5: Patró d'expressió tissular de *COPT2*. Òrgans de plantes en diferents estadis de desenvolupament són embegudes en el reactiu X-gluc (Materials i Mètodes; apartat 4.3.2). Es mostra (A) una visió general d'una plàntula de 7 dies crescuda en condicions de dèficit de Cu, i (B-D) detalls de l'arrel primària i laterals, (E) un tall en secció a nivell de la zona d'elongació de l'arrel, (F) dels cotiledons, (G) meristema apical i tricomes, (H) la part aèria de plàntules de 14 dies, (I) flors, (J) anteres, (K) gra de pol·len i (L) embrions.

Amb la finalitat d'estudiar el patró d'expressió de *COPT2* durant el desenvolupament floral, vam utilitzar plantes de la línia *pCOPT2::GUS::NOS* D crescudes en substrat durant 30 dies. L'assaig β-glucuronidasa, efectuat amb flors en etapa de post-antesi, mostra tinció

positiva a nivell de les anteres (Figura R2.5H-J). Una observació més acurada de les anteres indica que la tinció es deu a l'expressió de *COPT2* a nivell del gra de pol·len madur (Figura R2.5J-K). Per altra banda, amb l'objectiu d'esbrinar si hi ha expressió de *COPT2,* en l'embrió es va embeure les llavors transgèniques amb la solució X-gluc i vam extraure'n els embrions, els quals presentaven un patró de tinció homogeni (Figura R2.5L).

3.3. Regulació per coure de l'mRNA de *COPT2*

Com ja hem mostrat al capítol 1, el gen *COPT2* esdevé un marcador de l'estat nutricional de Cu de la planta ja que s'indueix en condicions de dèficit de Cu (50% d'expressió màxima en medis amb Cu 0.06 μM; Taula R1.2). Atesa la regulació existent per Cu del mRNA de *COPT2,* es va avaluar si el patró d'expressió de *COPT2* sofreix variacions a nivell de teixits en funció de la concentració de Cu en el medi. Amb aquest propòsit, es va procedir a crèixer durant dues setmanes plàntules de la línia *pCOPT2::GUS::NOS* D en medis ½ MS suplementats amb sacarosa 1% i, en funció del cas, BCS 100 μM (dèficit de Cu) o $CuSO_4$ 1 μM (suficiència) o 10 μM (excés). En assolir els 15 dies, les plàntules foren sotmeses a la reacció β-glucuronidasa i es van aturar al mateix temps. Tan sols les plàntules crescudes en medis ½ MS suplementats amb BCS 100 μM desenvolupaven la tinció a nivell les fulles vertaderes emergents i de les arrels, a excepció de l'àpex (Figura 2.6). Contràriament, en condicions de suficiència i excés de Cu, la tinció no arriba a detectar-se. Aquests resultats mostren de nou la regulació existent per Cu del mRNA de *COPT2* i

estableixen que l'esmentada regulació afecta per igual a tots els òrgans de la plàntula estudiats (Figura R2.6).

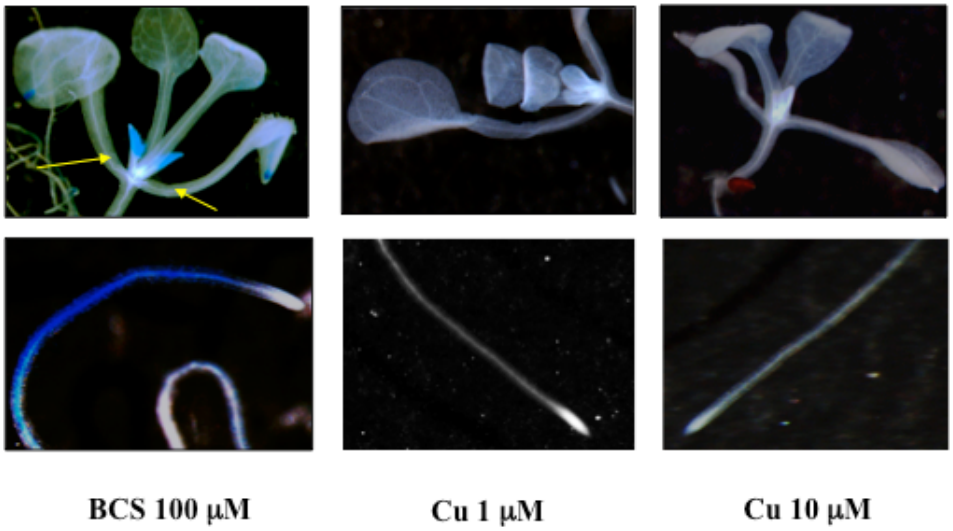


Figura R2.6: Regulació per Cu de l'expressió de la *β-glucuronidasa* via *pCOPT2*. Plàntules de la línia *pCOPT2::GUS::NOS* D foren crescudes durant 2 setmanes en medis ½ MS suplementats amb sacarosa 1% i la concentració de quelant BCS o Cu indicats i sotmeses a la tinció *β*-glucuronidasa. Panell superior, tinció en part aèria (fletxes grogues). Panell inferior, tinció en arrels.

4. Obtenció i caracterització de línies amb insercions de T-DNA que afecten l'expressió del gen *COPT2*

L'avaluació de la funció d'un gen es pot escometre mitjançant la caracterització fenotípica de mutants de pèrdua d'expressió del gen. En el cas d'*A. thaliana,* la forma més habitual d'obtindre mutants consisteix a transformar plantes amb *A. tumefaciens* per tal de generar una col·lecció de mutants amb insercions de T-DNA. La recerca de les línies amb insercions

de T-DNA per al gen *COPT2* s'efectuaren a la base de dades del TAIR (*The Arabidopsis Information Resource*; http://www.arabidopsis.org/). Segons aqueixa recerca, es va sol·licitar la línia SALK_083632.18.60 del *SALK Institute* (COPT2-1) i la línia AL770147 del *GABI-Kat Project* (COPT2-3). La línia COPT2-2, aïllada pel Dr. Vicent Sancenón i la Dra. Nuria Andrés Colás, no s'ha utilitzat degut a la pèrdua de viabilitat de les llavors.

4.1. Obtenció de línies mutants per a *COPT2*

Amb el propòsit de determinar el lloc exacte d'inserció del T-DNA en les línies mutants a estudiar, es va extraure gDNA de fulles de roseta de totes les línies mutants i es va dur a terme rondes de PCR amb els encebadors SALKLEFT, per a COPT2-1, o GKAT-PCR, per a COPT2-3, junt amb COPT2-1LP (Taula R2.1 i Materials i Mètodes; apartat 4). Els productes de PCR amplificats amb els encebadors esmentats, que corresponen als al·lels amb insercions de T-DNA, són purificats i seqüènciats amb els encebadors SALKLEFT o GKAT-PCR (Materials i Mètodes; Taula M5). La seqüenciació, i el subsegüent aliniament amb el genoma, indica la posició exacta de les insercions. Segons l'aliniament efectuat, la línia COPT2-1 presenta el lloc d'inserció a -134 pb (considerant +1 el primer nucleòtid del codó d'inici de traducció), fet que fa que el promotor remanent preserve 3 dels 4 elements de resposta a Cu (Figura R2.7). Per altra banda, la línia COPT2-3 (inserció a -55 pb) té allunyats tots quatre motius GTAC de l'inici de la seqüència codificant (Figura R2.7). Atès que no hem identificat cap línia que continga la inserció de T-DNA dins la seqüència codificant del gen, hem treballat amb línies en què la

inserció és en regions no codificants properes a l'inici de traducció codó del gen.

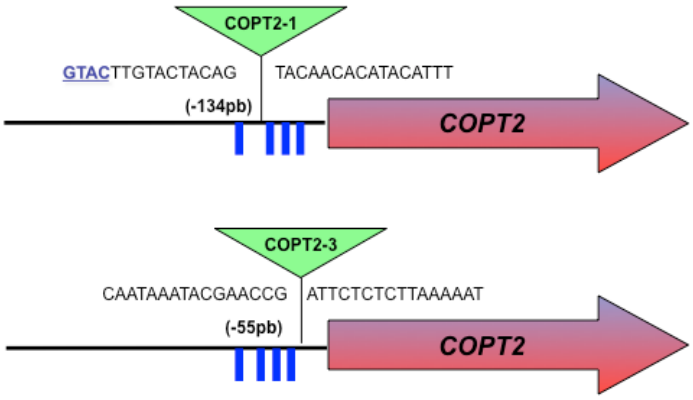


Figura R2.7: Esquema del lloc d'inserció de T-DNA en les línies mutants per a *COPT2*. La fletxa rosa indica la seqüència codificant del gen *COPT2* i la línia adjacent representa la seqüència promotora de *COPT2*. La inserció de T-DNA es representa mitjançant un triangle verd invertit que conté el nom de la línia en cadascun dels casos. Hi mostrem la distància a què està la inserció respecte del primer triplet de la seqüència codificant i les 2 regions que esdevenen els marges de la inserció. Els motius GTAC de possible regulació per Cu s'indiquen mitjançant 4 barres blaves.

Els individus homozigots per a les insercions de T-DNA es discriminen en base a una estratègia de PCR consistent a utilitzar el parell d'encebadors COPT2-1LB i COPT2-1RB per amplificar els al·lels silvestres (WT) i el parell SALKLEFT i COPT2-1LB o GKAT-PCR i COPT2-1RB per a les insercions de T-DNA (ins) (Taula R2.1; Materials i Mètodes; apartat 4.2). D'aquesta manera, en els individus silvestres tan sols s'amplifica l'al·lel silvestre, mentre que en els individus homozigots per a la inserció de T-DNA, l'únic amplificat possible és el de l'al·lel inserit. Els individus hemizigots amplificaran els dos al·lels (Figura R2.8)

De les 6 plantes COPT2-3 crescudes vam obtenir una planta homozigota per a la inserció. En el cas de COPT2-1, en la segona generació es va aïllar una planta COPT2-1 homozigota. A la figura R2.8 es presenta un exemple de cadascun dels estats gènics possibles per a les línies analitzades. Per tant, disposem de dues línies homozigotes per insercions de T-DNA a nivell de la regió promotora de *COPT2*. En aquest cas, hem decidit seguir únicament la línia COPT2-3, ja que és la que presenta el T-DNA més pròxim de l'inici de la seqüència codificant i allunya els 4 hipotètics motius GTAC de resposta a Cu del context inicial.

Taula R2.1: **Encebadors emprats per a genotipar les línies mutants COPT2.** Es mostra la combinació per a cadascun dels al·lels i el tamany de la banda que amplifiquen.

Línia	Al·lel silvestre	Tamany esperat	Al·lel inserció	Tamany esperat
COPT2-1	COPT2-1LB COPT2-1RB	979 pb	COPT2-1LB SALKLEFT	915pb
COPT2-3	COPT2-1LB COPT2-1RB	979 pb	COPT2-1RB GKAT-PCR	849 pb

Tot i que en COPT2-3 la inserció no interromp la seqüència codificant, ens resultaria interessant esbrinar com el T-DNA pot afectar l'expressió gènica de *COPT2*. Amb la finalitat de comprovar els nivells d'mRNA de *COPT2* en funció del contingut de Cu en el medi en les plantes COPT2-3, es va sembrar llavors de les línies silvestre i mutants en medis ½ MS suplementats amb sacarosa 1% i BCS 100 µM o diferents concentracions de $CuSO_4$. En arribar el dia 7, es va extraure l'RNA total de les plàntules i es va retrotranscriure a cDNA. Mitjançant els encebadors escaients (COPT2rtF i COPT2rtR, Materials i Mètodes; Taula M1), es va procedir a amplificar per sqPCR l'mRNA de *COPT2* sota condicions no saturants.

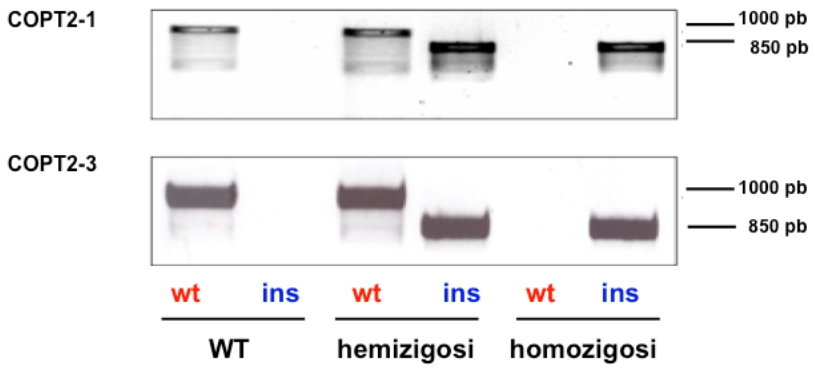


Figura R2.8: Genotipat per PCR de plantes de les línies COPT2 seleccionades. El gDNA de les diferents línies analitzades és sotmés a una bateria de PCR amb els encebadors de la Taula R2.1 per amplificar els al·lels silvestres (WT) i les variants amb inserció de T-DNA (ins). Les plantes silvestres tan sols amplifiquen la variant silvestre, mentre que els homozigots tan sols donen positiu per a la variant amb inserció. Els hemizigots, degut al seu estat genètic amplifiquen en ambdues combinacions. Al lateral dret es mostra la posició aproximada del marcador de tamanys.

Com és d'esperar, en la línia silvestre l'mRNA de *COPT2* tan sols es detecta en el rang de deficiència de Cu (representat per les condicions BCS 100 µM i ½ MS). No obstant, en el cas del mutant COPT2-3B no es detecta l'mRNA de *COPT2* en cap dels tractament efectuats (Figura 2.9). En base als nostres resultats, la inserció de T-DNA afecta l'expressió de *COPT2* de manera que no s'expressa en resposta al dèficit de Cu. Tanmateix, atès que la inserció no interromp la seqüència codificant de COPT2, no podem descartar que poguera haver-hi nivells mínims de transcrit o bé que l'expressió es donara sota unes altres condicions. Així i tot, a partir d'ara ens referirem a aquesta línia mutant com al mutant *copt2-3*.

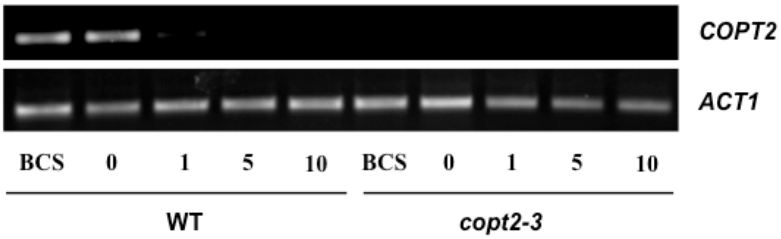


Figura R2.9: Anàlisi de l'expressió de *COPT2* per sqPCR en els mutants *copt2-3*. L'RNA total de plàntules de 8 dies en medis ½ MS suplementats amb sacarosa 1% i les concentracions de Cu indicades (µM) o de quelant de Cu (BCS 100 µM) es va retrotranscriure a cDNA i fou analitzat per sqPCR amb els encebadors escaients (COPT2-rt-F/COPT2-rt-R). El gen *ACT1* s'utilitza com a control de càrrega.

4.2. Caracterització del mutant *copt2-3*

Un cop hem determinat que els mutants *copt2-3* no expressen *COPT2*, cal estudiar-ne les conseqüències fenotípiques. Per a la caracterització dels mutants, ens vam centrar en els medis deficients en Cu, atès el patró d'expressió del gen *COPT2*. En aquest sentit, vam crèixer els mutants en substrat i en placa sense que mostraren cap alteració fenotípica que els diferenciara de les línies silvestres. De la mateixa manera, la determinació del contingut de Cu endogen en medis ½ MS comercial (*Sigma*) per a diferents estats nutricionals de Cu (sense afegir Cu per a la deficiència, 1 µM per a suficiència i 10 µM per a excés) no mostra variacions respecte de les línies silvestres (Taula R2.2).

Taula R2.2: Contingut en Cu endogen dels mutants *copt2-3*. Contingut en Cu endogen (en µg Cu/g pes sec) dels mutants *copt2-3* i de la línia silvestre (WT). La desviació estàndard s'associa a la mitjana de tres rèpliques d'un experiment representatiu.

	WT (µg Cu/g pes sec)	***copt2-3* (µg Cu/g pes sec)**
½ MS comercial	5.35 ± 2.18	5.57 ± 1.15
½ MS comercial + Cu 1 µM	7.74 ± 3.40	8.39 ± 0.39
½ MS comercial + Cu 10 µM	18.75 ± 4.01	18.01 ± 3.71

Tanmateix, amb la finalitat d'esbrinar si la manca d'expressió de *COPT2* comporta qualque alteració molecular, es va dur a terme experiments d'anàlisi d'expressió gènica, tant per sqPCR, com per qPCR. A partir del cDNA obtés de plàntules silvestres i *copt2-3* crescudes en ½ MS suplementat amb sacarosa 1% i BCS 100 µM o $CuSO_4$ en el rang micromolar, es va estudiar el comportament dels principals gens involucrats en l'homeòstasis del Cu (*COPT1*, *CSD1*, *FSD1*; Figura R2.10).

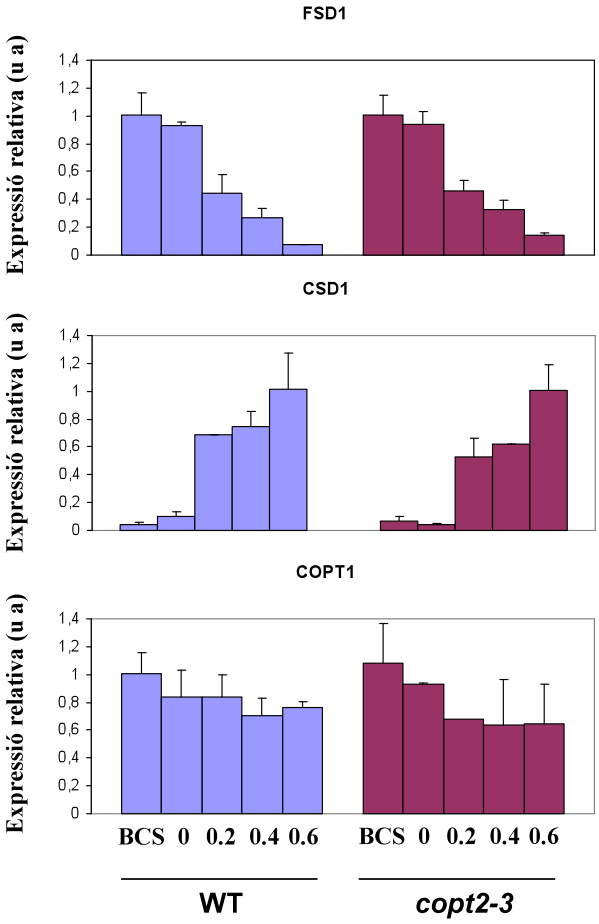


Figura R2.10: Anàlisi de l'expressió de *FSD1, CSD1* i *COPT1* per qPCR en els mutants *copt2-3*. L'RNA total de plàntules de 8 dies en medis suplementats amb sacarosa 1% i les concentracions de Cu indicades (µM) o de quelant de Cu (BCS 100 µM) es va retrotrotranscriure a cDNA i fou analitzat per qPCR amb els encebadors escaients (FSD1-qPCR-F/FSD1-qPCR-R; CSD1-qPCR-F/CSD1-qPCR; COPT1-qPCR-F/COPT1-qPCR-R). Els valors obtesos foren normalitzats amb el gen control de la UBQ10 (UBQ10-qPCR-F/UBQ10-qPCR-R). Les barres d'error corresponen a la desviació estàndard de la mitjana d'un experiment representatiu.

Com ja hem vist al capítol 1, l'expressió de *FSD1* i *CSD1* ens permeten avaluar l'estat nutricional de Cu de les plàntules. El màxim d'expressió d'*FSD1* i *CSD1* es dóna sota condicions de dèficit de Cu amb un 50% del màxim en 0.2 µM de Cu, però presenta el 50% del màxim de *CSD1* per a s'assoleix el màxim a partir de 0.5 µM de Cu (Figura R1.3 i R2.9). En el cas del mutant *copt2-3,* el patró d'expressió d'ambdós gens no manifesta cap diferència significativa en comparació a les línies silvestres. *COPT1* és un gen regulat negativament per Cu. Els mutants *copt1* antisentit es caracteritzen per induir el gen del transportador COPT2 per tal de millorar l'adquisició de Cu (Sancenón et al. 2003 i Sancenón et al. 2004). Per qPCR no es detecta cap alteració en el comportament de *COPT1* en funció del contingut de Cu en el medi en els mutants *copt2-3* (Figura R2.9).

DISCUSSIÓ

En aquest treball hem estudiat el transportador de Cu d'alta afinitat COPT2. COPT2 presenta un 78% d'identitat amb el transportador COPT1. A nivell funcional, l'expressió heteròloga de *COPT2* en la soca mutant de *S. cerevisiae ctr1Δctr3Δ* restableix el problemes de creixement en medis no fermentables i permet que el mutant incorpore altes taxes de ^{64}Cu en la mateixa mesura que COPT1 (Sancenón et al. 2003). En expressar la proteïna de fusió COPT2::GFP en protoplasts d'*A. thaliana* el patró de fluorescència s'associa a la membrana plasmàtica (Figura R2.3). Recentment, en el nostre laboratori hem establert la localització a nivell de membrana plasmàtica de la proteïna COPT1::GFP mitjançant la mateixa estratègia (Andrés-Colás et al. 2010). Tot plegat fa que considerem que COPT1 i COPT2 formen part d'una mateixa subfamília de transportadors de membrana plasmàtica.

Com ja hem discutit en el primer capítol, el gen *COPT2* esdevé un marcador molecular per identificar l'estat nutricional de deficiència de Cu, ja que el 50% de l'expressió màxima es dóna a concentracions de Cu exògenes inferiors a 0.1 μM (Figura R1.4). El *pCOPT2* presenta 4 elements GTAC de resposta a Cu pròxims a l'inici de la seqüencia codificant, tal i com s'ha descrit per als *pFSD1* i *pCOPT1* (Figura R2.4; Nagae et al. 2008; Yamasaki et al. 2009). Sota condicions de dèficit de Cu el factor transcripcional SPL7 indueix l'expressió d'aquests gens, probablement a través del reconeixement dels motius GTAC (Yamasaki et al. 2009). Les plàntules expressores de la fusió del *pFSD1* al gen de la β-glucuronidasa mostren que, tot i que *FSD1* és un gen induït en dèficit de Cu, en presència

de Cu hi ha un remanent d'expressió als cotiledons (Nagae et al. 2008). En canvi, cal destacar que la regulació de *COPT2* per dèficit de Cu es produeix per igual a nivell de tots els teixits ja que el patró de tinció de *pCOPT2::GUS::NOS* és únicament apreciable en plàntules crescudes sota medis deficients en Cu (Figura R2.6). Per tant, *COPT2* esdevé un marcador molecular per a la detecció del dèficit de Cu millor que *FSD1* ja que la seua regulació es dóna per igual en tota la planta.

En treballs previs del nostre grup s'ha establert que l'excés de Cu, propiciat per la sobreexpressió dels gens *COPT1* i *COPT3,* altera l'expressió i les oscil·lacions circadianes dels factors transcripcionals LHY i CCA1 (Andrés-Colás et al. 2010). De fet, cal considerar que l'estudi *in silico* de les caixes de *pCOPT2* detecta la presència d'un element *evening* involucrat en la regulació per ritme circadià. En l'actualitat estem estudiant la regulació de l'expressió diürna de *COPT2* per a millorar el coneixement de la funció dels transportadors de Cu i establir si la incorporació de Cu varia en funció del moment del dia i/o presenta ritme circadià.

En el present treball hem identificat una línia mutant amb una inserció de T-DNA a nivell del *pCOPT2,* a 55 pb del triplet d'inici de la traducció. Aquesta inserció de T-DNA allunya els 4 motius GTAC de l'inici de la seqüència codificant i impedeix que el mutant *copt2-3* expresse el gen *COPT2* en condicions de dèficit de Cu (Figura R2.7 i R2.9). Així i tot, atés el posicionament del T-DNA no podem descartar que *COPT2* s'expresse amb unes taxes no detectables. Tanmateix, tot i que hem suggerit COPT2 com un transportador de membrana plasmàtica, el contingut en Cu endogen

dels mutants *copt2-3* no varia significativament respecte del de les línies silvestres (Taula R2.2). Per altra banda, l'anàlisi d'expressió gènica de la línia *copt2-3* no es veu alterada per a *COPT1,* ni per als principals gens involucrats en la resposta al dèficit de Cu (Figura R2.10). Atés que el patró d'expressió de *COPT1* i *COPT2* esdevé complementari, i considerant que *COPT1* no s'indueix en *copt2-3*, no podem considerar que COPT1 estiga suplint la funció de COPT2. Per tant, aquests fenòmens podrien explicar-se o bé perquè el mutant *copt2-3* mantinguera uns mínims d'expressió que garantiren la quantitat suficient de proteïna COPT2 o bé pel fet que COPT1 constitueix la principal via d'entrada de Cu.

Pel que fa a la resta del patró d'expressió tissular, la participació de *COPT2* a l'embrió, al meristema apical caulinar i en les fulles emergents fa evident la importància del Cu en els processos de creixement i desenvolupament. També destaquem que, tant *COPT1* com *COPT2*, s'expressen al gra de pol·len. En els mutants *copt1* antisentit el 13% dels grans de pol·len presentaven una morfologia alterada, sense que aquest fet repercutira en la producció de llavors o en la seua viabilitat (Sancenón et al. 2004). En el mutant *copt2-3*, tot i poder tractar-se d'un mutant *knock-down*, no hem sigut capaços de determinar cap alteració en aquest sentit. Possiblement, la redundància amb altres transportadors explique l'absència d'anomàlies. Així doncs, amb l'objectiu de millorar la nostra comprensió en el procés d'adquisició del Cu en l'arrel i avaluar la resta de processos dependents de Cu, com ara la maduració del gra de pol·len, estem en vies d'obtindre un encreuament entre els mutants *copt1* i *copt2-3*.

Arribats a aquest punt, proposem un model per a l'adquisició espaciotemporal de Cu a nivell de l'arrel. En primer lloc, respecte d'un punt de vista espacial, sota condicions de dèficit de Cu, el Cu entra a l'arrel a través del transportador COPT1, que s'expressa a l'àpex radicular. COPT1 incorporaria el Cu a la via simplàstica per tal de garantir-lo a les cèl·lules dels voltants, dirigir-lo envers els feixos vasculars i emprendre la distribució a llarga distància (Figura R2.11, secció esquerra). Tot i que la major part del Cu deu ser adquirit a aquest nivell, no podem descartar que part del Cu incorporat migre cap a zones més distals de l'arrel on COPT2 s'encarregaria d'internalitzar cap a la via simplàstica els remanents de Cu que no han pogut ser incorporats a través de COPT1. A més, la funció de COPT2 també deu consistir en la incorporació de Cu a nivell de la zona distal de l'arrel i en la distribució a les cèl·lules de la regió (Figura R2.11, secció dreta).

Segons aquest model, COPT1 esdevé la principal via d'incorporació de Cu, mentre que COPT2 actuaria com un transportador encarregat de distribuir a les zones distals el Cu residual incorporat a l'àpex (Figura R2.11). Cal fer palés però que, malgrat la potencial importància del paper de la via apoplàstica en la distribució d'altres ions i metalls a nivell de l'àpex, la contribució en el cas del Cu deu ser mínima ja que, per una part el mutant *copt1* antisentit redueix el 50% del contingut del Cu endogen en fulles, fet que no s'explicaria si part del Cu es distribuïra per l'apoplast. Per tant, la via clau per a la distribució del Cu deu ser la simplàstica.

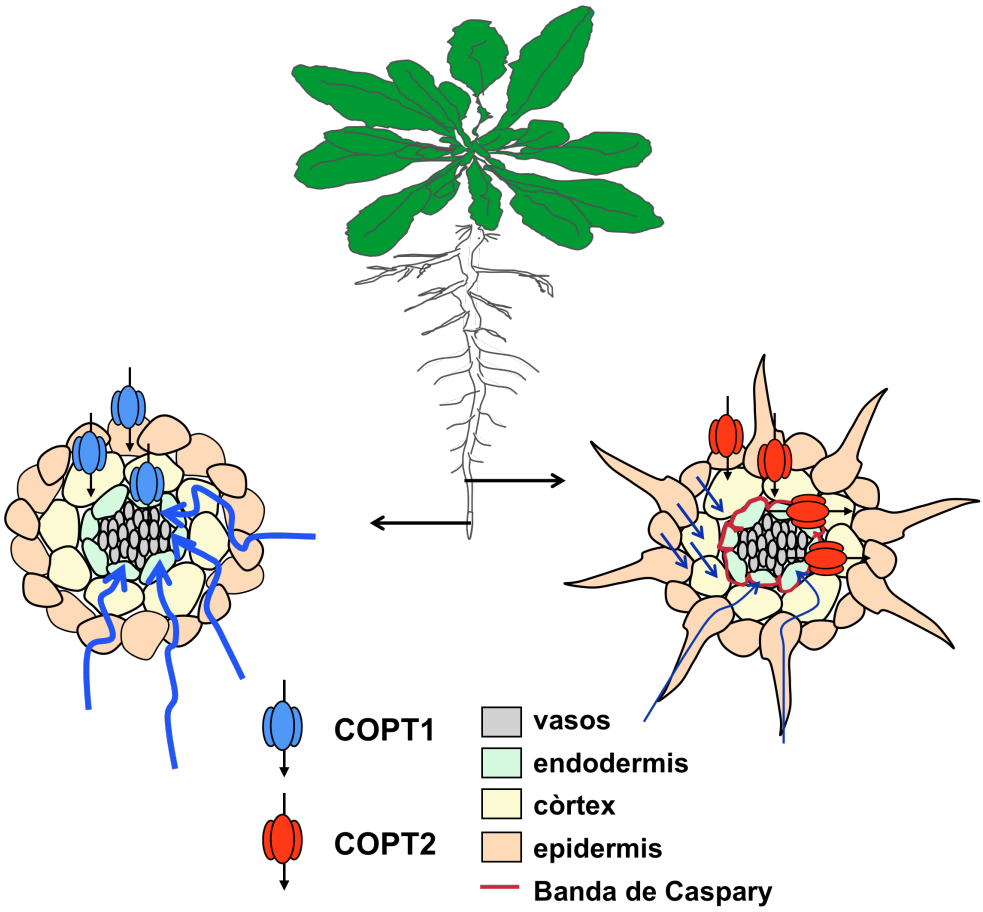


Figura R2.11: Model de l'adquisició de Cu al llarg de l'arrel. La part esquerra de la figura es mostra un tall en secció a nivell de l'àpex radicular. Les fletxes blaves indiquen el camí que descriu el Cu fins assolir els feixos vasculars mitjançant la via simplàstica. A la banda esquerra el tall en secció correspon a una zona més distal amb el recorregut del Cu. Es representa els feixos vasculars (gris), l'endodermis (verd), el còrtex (groc) i l'exodermis (taronja).

Des del punt de vista temporal, l'arrel és un sistema dinàmic que es desenvolupa i explora nous estrats en el substrat. La regió apical de l'arrel es nodreix dels estrats més profunds, de manera que quan l'arrel creix les zones més distals topen amb estrats ja consumits o esgotats, pel que fa als nutrients. Segons aqueixa consideració, la regió d'arrel dependent del

transportador COPT1 sempre disposaria d'un medi amb més disponibilitat d'ions que no pas la dependent de COPT2. Amb aquest punt de vista s'explicaria per què la major part dels ions s'incorporen a través de l'àpex i no de les zones més distals.

Un altra possible explicació del mecanisme de funcionament de COPT2, i que justificaria la manca de fenotips del mutant *copt2*, seria la localització polaritzada del transportador a les cèl·lules de l'arrel, de manera que contribuïria a la redistribució del Cu a partir del contingut disponible en els feixos vasculars (Figura R2.11).

Els resultats presentats en aquest capítol s'esquematitzen a l'atles 1 (p. 203)

CAPÍTOL 3: EL TRANSPORTADOR DE COURE D'ALTA AFINITAT COPT6

1. Identificació del transportador de coure d'alta afinitat COPT6 d'*Arabidopsis thaliana*

1.1. Anàlisi de la seqüència proteica de COPT6

Durant la reanotació del genoma d'*A. thaliana* es va identificar el gen At2g26975 (a partir d'ara *COPT6*). Per tal d'avaluar la similitud existent entre COPT6 i la resta de membres de la família COPT, es va comparar mitjançant l'aplicació DNAMAN la seqüència d'aminoàcids de COPT6 amb la dels 5 membres de la família COPT identificats en la primera anotació. COPT6 presenta un 61.18% d'identitat en seqüència amb COPT1 i un 72.78% amb COPT2, éssent aquesta darrera la major similitud detectada entre dos membres de la família COPT. Amb la resta de transportadors els percentatges d'identitat oscil·len entre el 20-50% (Figura R3.1).

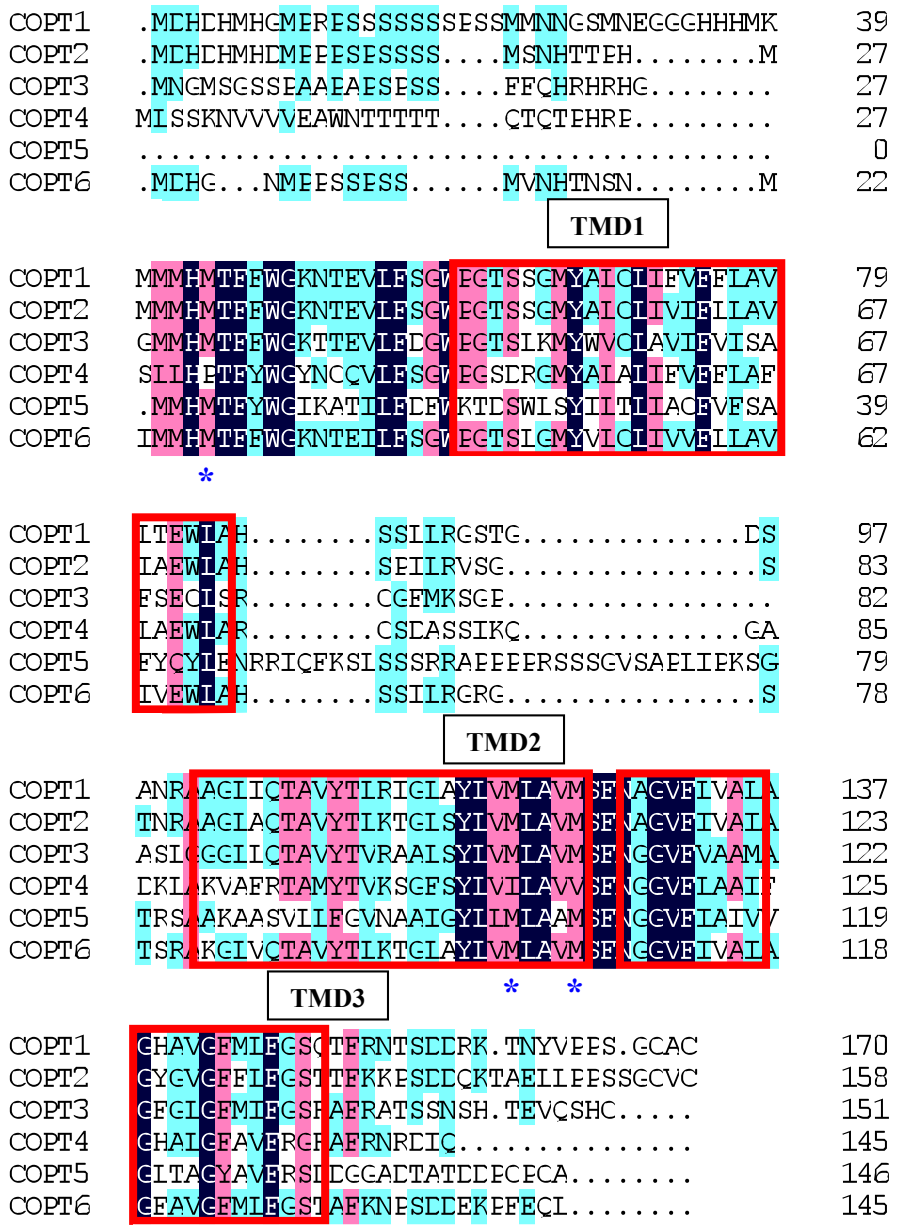


Figura R3.1: Aliniament entre els membres de la família COPT. Aliniament de la seqüència d'aminoàcids dels membres de la família COPT efectuat amb el programa DNAMAN. S'indica la posició relativa dels aminoàcids, els TMD (requadres rojos) i les metionines conservades (asteriscs blaus).

Amb la finalitat de determinar si la seqüència de COPT6 presenta les característiques dels membres de la família de transportadors de Cu d'alta afinitat CTR, es va analitzar el perfil d'hidrofobicitat dels 153 aminoàcids amb el servidor TMHMM i es va comparar el patró que oferia aquesta aplicació amb la posició dels segments transmembrana (TMD) en els altres COPT. Segons aquesta predicció hi distingim 3 hipotètics TMD: el TMD1 s'agruparia entre els aminoàcids 42-68, el TMD2 entre els 85-107 i el TMD3 entre el 111-133 (Figura R3.1, requadres rojos; Figura R3.2A i B). A més dels 3 TMD, COPT6 també presenta tot un seguit de residus conservats que en el transportador Ctr1 de llevat esdevenen essencials. Fem referència a una metionina a 15 aminoàcids del TMD1 i al motiu MxxxM del TMD2 (Puig et al. 2002b). A més, al TMD3 trobem un motiu GxxxG, que en el transportador Ctr1 d'humans estaria involucrat en afers estructurals, però no el motiu CxC descrit a l'extrem carboxiterminal d'altres membres de la família CTR (Figura R3.2B; Introducció apartat 4.2).

Addicionalment, l'algoritme utilitzat pel TMHMM també determina quins residus estarien encarats envers l'espai extracel·lular i quins s'exposarien cap a la vessant citosòlica. Aquesta predicció, junt amb la comparació de la topologia que adopten els altres membres de la família CTR, suggereix que COPT6 deixaria envers la vessant extracel·lular l'extrem aminoterminal i envers el citosol l'extrem carboxiterminal (Figura R3.2B). De la mateixa manera que ocorre en COPT1 i COPT2, l'extrem aminoterminal de COPT6 alberga 2 motius rics en metionines i histidines, els quals en *S. cerevisiae* incrementen l'eficiència del transport (Figura R3.2B; Puig et al. 2002).

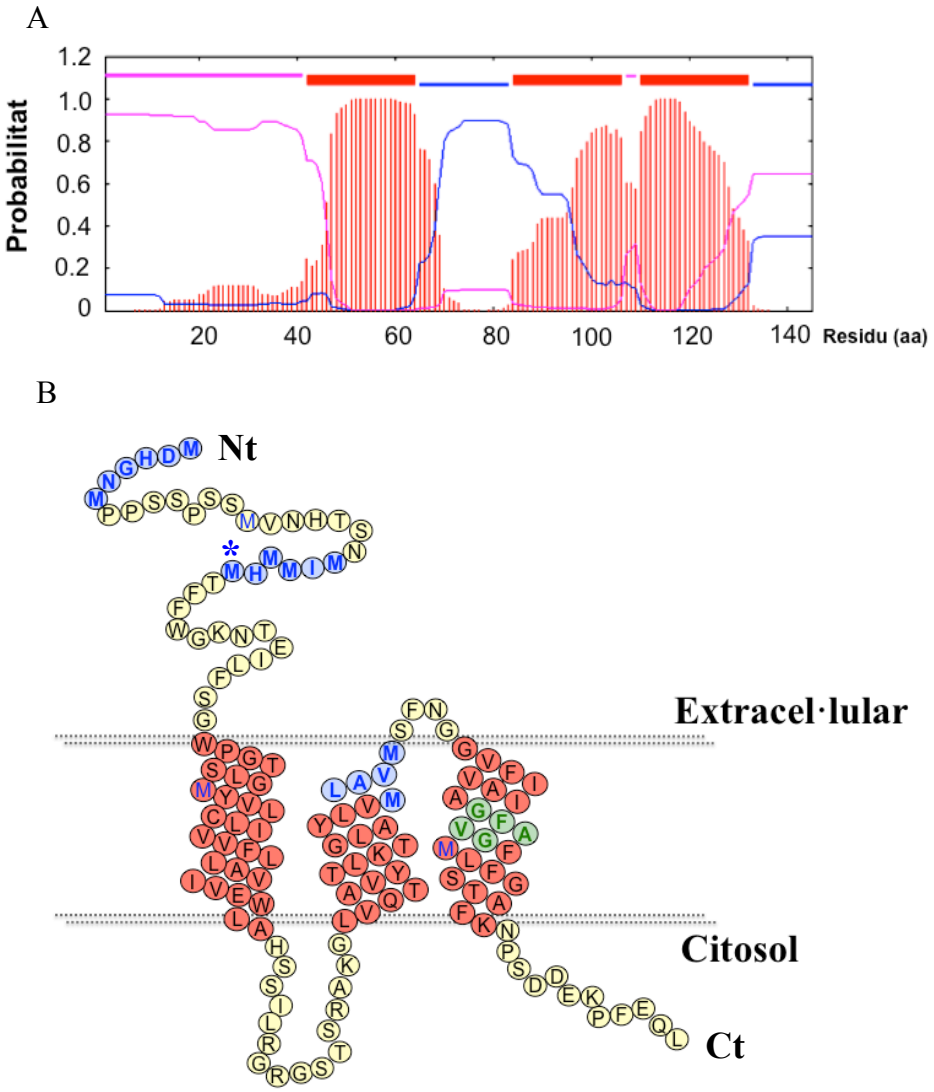


Figura R3.2: **Perfil d'hidrofobicitat i topologia del transportador COPT6**. **A)** Perfil d'hidrofobicitat de la proteïna COPT6 segons el servidor TMHMM. Les barres verticals mostren la hidrofobicitat dels residus. Les línies rosa indiquen la probabilitat de què els residus s'exposen a la vessant extracel·lular i les línies blaves la probabilitat de què s'orienten envers el citosol. A la part superior del gràfic es mostren els trams extracel·lulars (segments rosa), els tres possibles TMD (segments rojos) i els dos segments intracel·lulars (segments blaus). **B)** Topologia del transportador COPT6 amb els tres segments transmembrana (color roig), les metionines essencial (asterisc i blau) i el GxxxG (verd).

1.2. Complementació de la soca de *S. cerevisiae ctr1Δctr3Δ* amb *COPT6*

En l'apartat anterior hem vist que COPT6 presenta la topologia i els elements conservats en els transportadors de la famíla CTR. Amb la finalitat d'avaluar si COPT6 és un transportador de Cu d'alta afinitat, es va transformar la soca mutant de *S. cerevisiae ctr1Δctr3Δ*. L'esmentat mutant no pot crèixer en medis no fermentables, ja que la COX no disposa de Cu i per tant esdevé afuncional. De la mateixa manera, com hem explicat en l'apartat 2.1 del capítol 2, l'addició del quelant de Fe, BPS, posa a prova la distribució del Cu a través de la ruta de secreció. L'expressió d'un transportador de Cu d'alta afinitat en aquest fons genètic seria capaç d'esmenar la manca de creixement en ambdues condicions.

El gen *COPT6* fou clonat en el vector d'expressió per a llevat *p426GPD* i expressat en la soca *ctr1Δctr3Δ*. La soca mutant també fou transformada amb la resta de transportadors COPT. Tal i com es mostra a la figura R3.3, tots els transformants són capaços de crèixer en el medi sintètic SC-ura i en el medi ric YPD. Tanmateix, en afegir el quelant de Fe BPS, s'obté que els llevats transformats amb el vector buit són incapaços de crèixer. Pel que fa als transportadors COPT, com és d'esperar, *COPT3* i *COPT5* complementen parcialment la soca mutant, mentre que *COPT1* i *COPT2* la complementen totalment (Sancenón et al. 2003). El transportador COPT6 complementa la soca *ctr1Δctr3Δ* en les mateixes taxes que *COPT1* i *COPT2*. En assajar els mateixos transformants sobre un medi amb font de carboni no fermentable, com ara l'etanol i el glicerol, s'obté un resultat idèntic. La dependència del

creixement pel Cu es palesa en suplementar el medi amb Cu 100 µM (Figura R3.3).

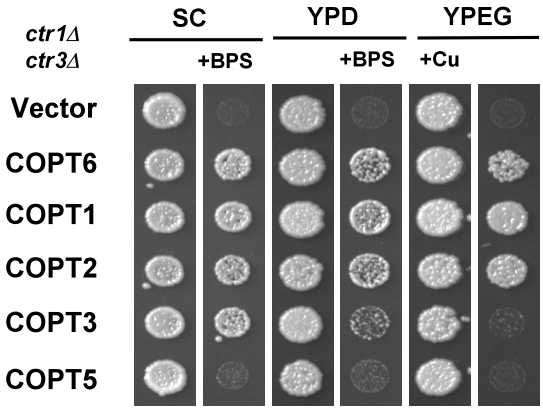


Figura R3.3: Complementació del mutant *ctr1Δctr3Δ* amb el transportador COPT6. La soca de *S. cerevisiae ctr1Δctr3Δ* fou transformada amb el vector *p426GPD::COPT1-6* (Sancenón et al. 2003) i crescuda fins a la fase exponencial en medi selectiu. A continuació, se sembren gotes en medi control SC-ura, YPD i YPEG (etanol/glicerol) i en els mateixos medis suplementats amb BPS 100 µM o Cu 100 µM. Com a control s'ha utilitzat els transformants amb el vector buit. Les plaques es desen a 30 ºC durant 3 dies i es fotografien.

2. Localització subcel·lular de la proteïna COPT6

Atès que el grau de complementació de *COPT6* és similar al de *COPT1* i *COPT2*; i la similitud en seqüència existent entre tots tres transportadors (Figura R3.2), suposem que COPT6 forma part d'aqueixa subfamília, com un tercer transportador de Cu d'alta afinitat de membrana plasmàtica. Per esbrinar la localització subcel·lular de COPT6, vam etiquetar la seqüència codificant amb la proteïna GFP a nivell de l'extrem carboxiterminal. A partir del vector *p426GPD::COPT6* es va amplificar la seqüència codificant

de *COPT6* amb els encebadors COPT6-SalI-F i COPT6-NcoI-R (Materials i Mètodes; Taula M3) i es va clonar entre els llocs *Sal*I i *Nco*I del vector *pCaMV(35S)::sGFP,* conservant la pauta de lectura de la GFP (Miras et al. 2002 i Materials i Mètodes; apartat 3.2.2).

2.1. Funcionalitat de la proteïna de fusió COPT6::GFP en llevat

En primer lloc, per tal de testar la funcionalitat de la quimera COPT6::GFP, la proteïna de fusió es va clonar en el vector d'expressió de llevat *p426GPD* a partir del vector *pCaMV(35S)::COPT6::sGFP* amb els encebadors COPT6-ATG-BamHI i GFP-R-SalI (Materials i Mètodes; Taula M3) i es va transformar la soca mutant de *S. cerevisiae ctr1Δctr3Δ* junt amb els plasmidis *p426GPD*::*COPT1* i *p426GPD::COPT6* (Sancenón et al. 2003). Els transformants creixen en medis SC-ura (glucosa). Ara bé, en el medi amb el quelant BPS, els llevats transformats amb el vector buit van deixar de crèixer. De forma similar a la figura R3.3, els llevats que expressen *COPT1* i *COPT6* complementen perfectament la soca *ctr1Δctr3Δ*. En els medis amb font de carboni no fermentable (glicerol), vam obtindre el mateix resultat. En aquest cas, la dependència de Cu per al correcte creixement es fa evident en afegir un suplement de Cu a aqueixos medis. En totes les condicions l'expressió de *COPT6::GFP* és capaç de complementar la mutació del llevat de la mateixa manera que *COPT1* i *COPT6*. Per tant, l'etiquetatge de COPT6 amb GFP a nivell de l'extrem carboxiterminal no comporta cap anomalia funcional en *S. cerevisiae* (Figura R3.4).

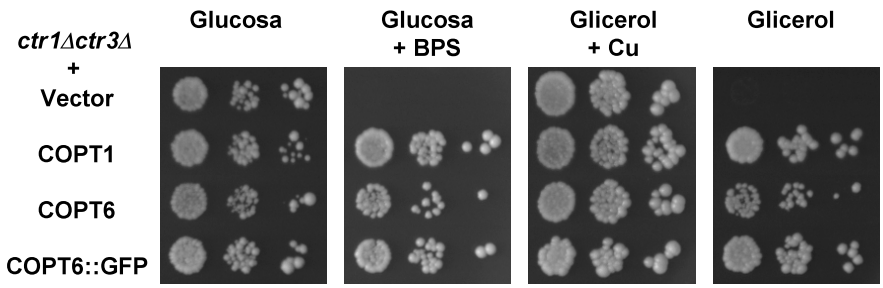


Figura R3.4: Complementació de la soca mutant de llevat *ctr1Δctr3Δ* amb COPT6::GFP. La soca de *S. cerevisiae ctr1Δctr3Δ* fou transformada amb el vector *p426GPD* buit i amb *COPT1*, *COPT6* i *COPT6::GFP*. Els transformants van ser crescuts en medi selectiu fins assolir la fase logarítmica i es va sembrar dilucions 1/10 successives en gotes. Els medis de creixement escollits són SC-ura (glucosa com a font de carboni) o medi YP amb glicerol. Ambdós medis foren suplementats amb Cu 100 µM i BPS 100 µM, respectivament. Les plaques es desen a 30 ºC durant 3 dies i es fotografien.

2.2. Localització subcel·lular de la COPT6::GFP en protoplasts d'*A. thaliana*

Una vegada hem avaluat la funcionalitat de la proteïna de fusió COPT6::GFP, es va expressar transitòriament en protoplasts de fulles d'*A. thaliana* la construcció *pCaMV(35S)::COPT6::sGFP* per determinar-ne la localització subcel·lular. Mitjançant microscopia confocal, es va distingir la fluorescència de la proteïna de fusió COPT6::GFP de l'autofluorescència de la clorofil·la. El senyal de la fluorescència de COPT6::GFP s'associa a la membrana plasmàtica (Figura R3.5). Segons aquest experiment, confirmem que COPT6, junt amb COPT1 i COPT2, conformen una subfamília de transportadors que s'ubiquen a la membrana plasmàtica.

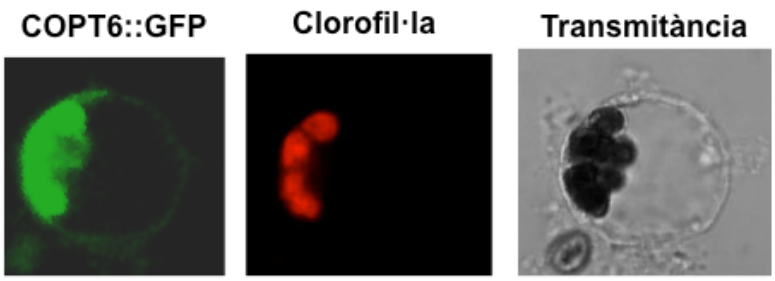


Figura R3.5: Localització de COPT6::GFP en protoplasts d'*A. thaliana*. Protoplasts aïllats de fulles de plantes de 30 dies, crescudes en test, van ser transformats transitòriament amb els vectors *pCaMV(35S)::COPT6::sGFP*. Imatges amb els filtres per a la fluorescència de la GFP i clorofil·la i transmitància.

3. Estudi de l'expressió gènica de *COPT6* en *A. thaliana*

3.1. Anàlisi *in silico* de la seqüència promotora de *COPT6*

Per tal d'avaluar els elements teòrics de regulació i d'expressió en teixits de *COPT6* es va analitzar els 1077 pb més propers al primer nucleòtid de la seqüència codificant (a partir d'ara promotor de *COPT6* o *pCOPT6*) mitjançant el servidor PLACE. De forma general, destaquem la presència de caixes relacionades amb expressió en diferents teixits, així com dianes de factors involucrats en la regulació per Cu. Breuement, detectem dos motius GTAC identificats com a possibles elements de resposta a Cu en posició -115 pb i -146 pb (Kropat et al. 2005; Yamasaki et al. 2009) que podrien estar involucrats en la resposta al dèficit de Cu (Figura R3.6; en blau). Per altra banda, s'ha establert 3 caixes E (*E-box*) descrites com el lloc d'unió de factors transcripcionals amb dominis hèlix-volta-hèlix (*bHLH*) (Hartmann et al. 2005). En aquest cas, de les tres caixes trobades, dues s'ubiquen en posició a -279 pb i -241 pb del triplet d'inici (Figura R3.6; en roig). A nivell

d'elements d'expressió en teixit, palesem caixes de direccionament a llavor (CAAT; Rogers et al. 2001), mesòfil·le (CACT; Gowik et al. 2004), endosperm i pol·len (AGAAA i AAAG; Bate i Twell, 1998; Yanagisawa et al. 1999; Yanagisawa et al. 2000; Filichkin et al. 2004) (Figura R3.6).

```
-1077 AGTAAGACTA ATCGGAGGAA GGTAACCTAA AAGAGAAAAA ATCGGTCTCT
-1027 TTGACCCAAA AACAAAGCCA AACAAATAAA AAAAAAAAAC GGCGAAATAA
-977  ACTTAATTAA CATGTTTTAC TTAAAAAATA TAATTATAAC TATTTTAGTC
-927  AGTAAAAAGA ACATATACCA TATTGGTCAA AAAATAATTA GATAGATTTA
-877  ATTTTGTATA GAAATTGACT AATGTCGCAA TTCGCAAAGT AATCTCATAA
-827  TTGTGACCAC ATTTCCGACT AACACTTGAG ATTACAACTG ATTTGCTACC
-777  TTACAATCCC ATAACTGTGA CCACATTTGC GACTAACACT TGAGATTACA
-727  ACTGATTTGA TATCGTATAT TAGAAAACTT TTTTATATAT CTTGTATATT
-677  TGTTTGATCT TGATAACATT TCTATGGTTG TATCCACTAT ATGTCTGTAT
-627  TGGTTCGTTT TGTCCTTGTT TTCGAATTTT CTAGAATGGG TTGTGACGAA
-577  CCAGTGAATT TTAGACCTAG ATTGATATGT TTCTTGTCCA AGGTTTTGAG
-527  CCAAATTTAC ATTTTTATAT TTTGATAAGT CTTCGTAGGT TTGGGTTTGC
-477  CTAATTTCTT TGGTCTATGT TTAGAGTTTT GCAAGTGATG AATTGGGGAG
-427  AGTTGCATTT TGTTGATTGA ACTGAACTTG AAACTCATAA GCTTAACACA
-377  ATGTTGTTGT CATTGATTTA TAAGTAAATA TCGTTTAGAA GAATAACTTG
-327  TTAAATTCCA CTACGAATAT AAATTTCATC ACTTTCTCAA ATTATGTTCA
-277  AATGATGTAA ATCGTTTTTC TTCCACCACA ATTCTACAAA TGGTGTGTTA
-227  CCATTTATAT CATGAAAATA AGTTGAATAA CTGAATAGGT ATTTAAAAGG
-177  CTTTCTAAAA TTAGTATTGA CTTCTACTTG TACTACACAA AGTTTGACAA
-127  GTCAAAACGT GAGTACAACC ACAAACACAT TTAAGAGACC ACATGATAAC
-77   AAGAACATCA CAATAAATAC GAAACCATTT TCTCTAAGTT TTGTCCCAAA
-27   CAAAAAATTT CAGAAACTTA TCATATAATG
```

Figura R3.6: Anàlisi *in silico* de la seqüència del *pCOPT6*. Al marge esquerre de l'esquema s'ennumeren els parells de bases considerant +1 el primer nucleòtid de la seqüència codificant (subratllat amb negreta). S'indica en diferents colors les caixes obteses mitjançant el servidor PLACE els possibles elements de resposta a Cu (GTAC, blau), les caixes E (resaltades en roig), les caixes relacionades amb expressió en llavors (CAAT, roig), les d'expressió en mesòfil·le (CACT, taronja), les d'endosperm i pol·len (AAAG i AGAAA, verd). Les fletxes morades indiquen els encebadors COPT6-730F-HindIII i COPT6-ATG-R-XbaI i amb una doble franja color groguenc s'indica la posició d'una diana de restricció de l'enzim *HindIII*.

3.2. Regulació per coure de l'mRNA de *COPT6*

En l'anàlisi del *pCOPT6* hem localitzat dos possibles elements GTAC pròxims a l'inici de la seqüència codificant (Figura R3.6). Per tal d'avaluar si existeix regulació per Cu, es va obtindre el cDNA a partir de l'RNA total de plàntules de 7 dies crescudes en medis ½ MS suplementats amb sacarosa 1% i amb diferents concentracions de $CuSO_4$ o de quelant BCS 100 μM. L'expressió de *COPT6* es va seguir per qPCR i els valors obtesos es van normalitzar amb l'expressió del gen d'expressió constitutiva de l'ubiqüitina *UBQ10.* Malgrat la presència de dos possibles elements GTAC de regulació per Cu, les taxes d'expressió de l'mRNA de *COPT6* romanen invariables independentment del contingut de Cu en el medi (Figura R3.7). Amb aquests cDNA havíem observat que el gen *COPT2* s'indueix en condicions de dèficit de Cu (Figura R1.4).

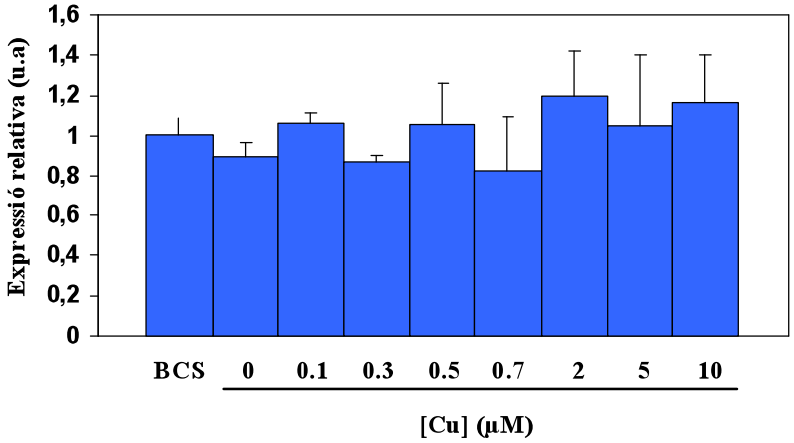


Figura R3.7: Anàlisi de l'expressió de l'mRNA de *COPT6* per qPCR. L'RNA total de plàntules de 7 dies crescudes en ½ MS suplementat amb sacarosa 1% i diferents concentracions de quelant de Cu (BCS 100 µM) o de Cu (com s'indica a la figura) fou extret i retrotranscrit a cDNA. El cDNA va ser analitzat per qPCR mitjançant els encebadors COPT6qPCR-F i COPT6qPCR-R i referint els valors d'expressió al gen d'expressió constitutiva *UBQ10* (Materials i Mètodes; taula M2). Es mostra un experiment representatiu en què les barres d'error corresponen a la mitjana de triplicats tècnics.

3.3. Establiment del patró d'expressió tissular del gen *COPT6*

3.3.1. Estudi de l'expressió per òrgans

Amb la finalitat d'establir el patró d'expressió de *COPT6* per òrgans, vam dissenyar un experiment de sqPCR a partir del cDNA obtés de l'RNA total de fulles, tiges i flors de d'*A. thaliana* de l'ecotipus *Col0* crescudes durant 30 dies en substrat. La mostra d'arrels es va obtindre d'arrels de plàntules silvestres de 21 dies crescudes en medi ½ MS suplementat amb sacarosa 1% i BCS 100 µM. Junt amb *COPT6*, es va amplificar el transportador *COPT1* i el gen *ACT1* com a control de càrrega (Materials i Mètodes; taula M1).

Les diferències d'eficiència entre els encebadors ens impedeixen valorar el grau d'expressió d'un gen respecte d'un altre. Ara bé, basant-nos en la normalització feta amb el gen *ACT1*, sí que podem establir comparacions relatives entre òrgans per a cada gen. *COPT1* s'expressa en tots 4 òrgans assajats però de forma més abundant en arrels i flors. Per la seua banda, destaquem que l'mRNA de *COPT6* no es detecta a les arrels. Nogensmenys, tot i que *COPT6* s'expressa en tiges i flors, és a les fulles on l'expressió és significativament més abundant (Figura R3.8).

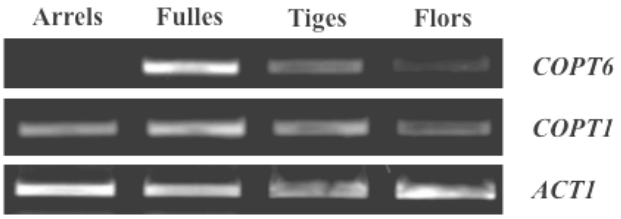


Figura R3.8: Estudi de l'expressió de *COPT6* en teixits per sqPCR. L'RNA total de diferents òrgans (fulles, tiges i flors) de plantes de 30 dies crescudes en substrat en condicions de fotoperíode llarg i d'arrels de plàntules de 21 dies crescudes en medi ½ MS suplementat amb sacarosa 1% i BCS 100 µM fou retrotranscrit i analitzat per sqPCR sota condicions no saturants per als gens *COPT1* i *COPT6*. El gen de l'actina (*ACT1*) s'utilitza per normalitzar la quantitat d'RNA. Els parells d'encebadors utilitzats són: COPT1-rt-F/COPT1-rt-R per a *COPT1*; COPT6-rt-F2/COPT6-NcoI-R per a *COPT6* i ACTINARA1/ACTINARA2 per a *ACT1* (Materials i Mètodes; Taula M1).

3.3.2. Estudi del patró d'expressió tissular amb línies *pCOPT6::GUS*

La fusió de part del *pCOPT6* al gen *GUS* ens permet establir amb més detall el patró d'expressió per teixits de *COPT6*. A partir de gDNA total de fulles d'*A. thaliana* crescudes en substrat es va amplificar per PCR els 730

pb del *pCOPT6* més pròxims al primer nucleòtid de la seqüència codificant amb els encebadors COPT6-730F-HindIII i COPT6-ATG-R-XbaI (Figura R3.6). El producte de PCR inicial fou digerit amb *Hind*III i *Xba*I aprofitant l'existència d'una diana de restricció *Hind*III en posició -389 pb (a partir d'ara *p(389)COPT6*) i clonat en el vector *pFP101::GUS::NOS.* Es va transformar *A. thaliana* amb el vector *pFP101::p(389)COPT6::GUS::NOS* i es va destriar els individus transformants en base a la fluorescència de les llavors, per obtindre línies homozigotes independents (Materials i Mètodes; apartat 1.3.2).

Les plàntules homozigotes *p(389)COPT6::GUS* foren crescudes en medis ½ MS comercial (*Sigma*) suplementats amb sacarosa 1%. En assolir 8 dies de creixement, les plàntules van ser embegudes en la solució de reacció fins que va aparèixer color (Materials i Mètodes; apartat 4.3.2). El patró de tinció de les plàntules corrobora que *COPT6* s'expressa a nivell de la part aèria als cotiledons, tant a nivell de nervadures com en la resta de l'òrgan, i a les primeres fulles vertaderes emergents (Figura R3.9A i B). Per altra banda, també desenvolupen tinció els tricomes i el meristema apical caulinar (Figura R3.9C i D).

En plantes crescudes en substrat durant 30 dies, les fulles adopten una tinció preferent a les nervadures (Figura R3.9E). No obstant, els talls transversals efectuats a nivell del peciol mostren que la tinció s'ubica cap a les capes de l'epidermis (Figura R3.9F). També es detecta tinció als estomes en observar les fulles amb més deteniment (Figura R3.9G).

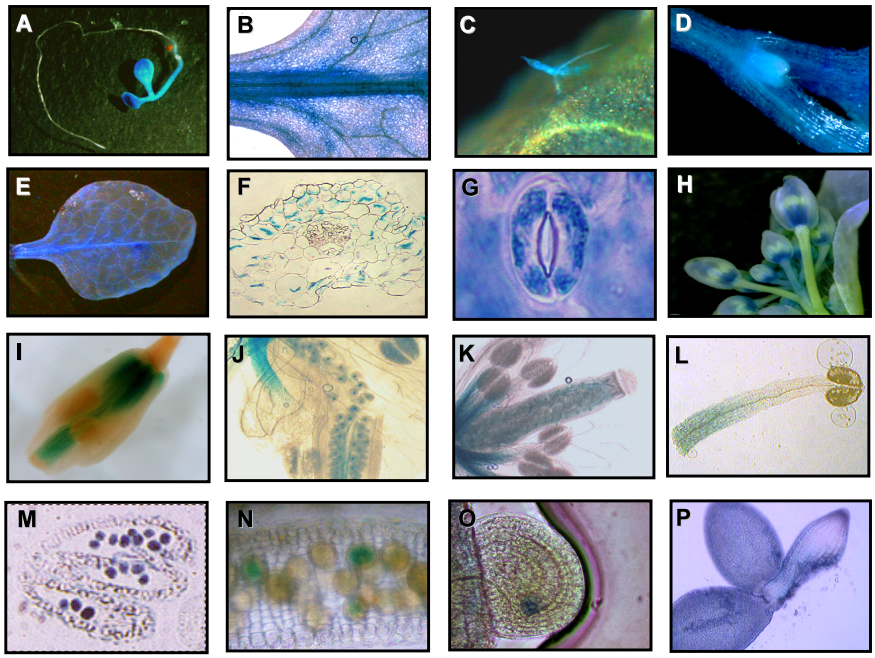


Figura R3.9: Patró d'expressió tissular de *COPT6*. Òrgans de diferent estadis del cicle vital de plantes *p(389)COPT6::GUS* es van sotmetre a la reacció X-gluc. Les fotografies del panell corresponen a: (A) plàntules de 7 dies, (B) fulles vertaderes, (C) tricomes, (D) meristema apical caulinar, (E) fulles de planta adulta, (F) un tall en secció del peciol fulles de planta adulta, (G) estomes, (H-I) flors en preantesi, (J-K) en postantesi, (L) estam, (M) anteres, (N) sacs pol·línics, (O) òvuls i (P) embrions.

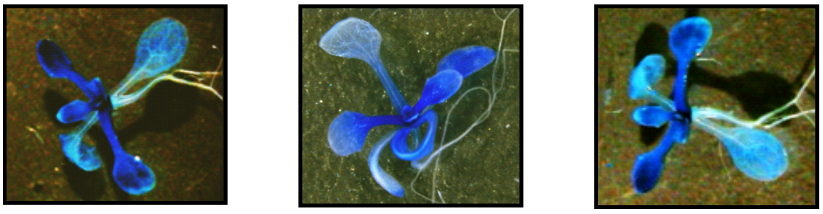
En l'apartat anterior hem vist que *COPT6* és un gen que no s'expressa a l'arrel. Aquesta observació ha sigut corroborada amb l'estratègia de fusionar *p(389)COPT6* al gen alertador *GUS* (Figura R3.9A). Per tant, concloem que *COPT6* és el primer transportador de Cu d'alta afinitat ubicat estríctament a la part aèria. Aquest resultat també està en concordança amb la predicció teòrica del promotor, ja que hi hem estimat 5 caixes CACT d'expressió al mesòfil·le i cap de direccionament a l'arrel.

Pel que fa als òrgans reproductors, vam treballar amb les flors de plantes *p(389)COPT6::GUS* crescudes durant 30 dies en substrat. En flors en estat de preantesi, la tinció es desenvolupa a nivell dels filaments dels estams i del pistil (Figura R3.9H i I). En canvi, durant la post-antesi, a més de mantindre's aquest patró, s'hi aprecia que l'expressió de *COPT6* també es dóna en els òvuls i grans de pol·len (Figura R3.9L-O). Les llavors de la planta *p(389)COPT6::GUS* van ser embegudes en la solució de reacció i se'n va extraure l'embrió, el qual manifestava un patró de tinció homogeni (Figura R3.9P).

En òrgans reproductius, *COPT6* s'expressa en la major part de la flor, tant a nivell de la part femenina com de la masculina. Tanmateix, la previsió teòrica del *pCOPT6* ens alertava de la presència de caixes AGAAA capaces de direccionar l'expressió del gen al gra de pol·len. *COPT6* també s'ha detectat en l'embrió de forma homogènia. Al *pCOPT6* havíem trobat caixes AAAG d'expressió a l'endosperm i caixes CAAT, que en lleguminoses estan involucrades en la inducció de proteïnes de reserva a nivell de les llavors (Shirsat et al. 1989). Tot i que sabem que *COPT1* i *COPT2* també s'expressen al gra de pol·len i a l'embrió (Sancenón et al. 2004 i capítol 2), fins ara, encara no s'havia descrit cap transportador de Cu d'alta afinitat associat al òvuls.

Nogensmenys, un cop establert el patró tissular de les plàntules de la línia *p(389)COPT6::GUS::NOS,* vam dissenyar un experiment per tal d'estudiar si el patró d'expressió de *COPT6* es veia alterat en algun teixit en funció del contingut en Cu del medi de cultiu. Amb aquesta finalitat, les

plàntules *p(389)COPT6::GUS::NOS* van ser crescudes durant 14 dies en medis amb diferent concentració de Cu. Tal i com es mostra en la figura R3.10, es va escollir un medi deficient en Cu (BCS 100 µM), un de suficient (1 µM) i un d'excés (10 µM). En totes les condicions assajades, vam reproduir el patró d'expressió adès descrit, de manera que en cap de les tres condicions es van detectar alteracions en el patró d'expressió, ni cap tipus de regulació per teixit.



BCS 100 µM Cu 1 µM Cu 10 µM

Figura R3.10: Localització de l'activitat β-glucuronidasa en *pCOPT6::GUS::NOS* en funció del Cu disponible al medi. Plàntules de 14 dies crescudes en ½ MS suplementat amb sacarosa 1% i quelant (BCS 100 µM) o diferents concentracions de Cu van ser utilitzades per a la tinció β-glucuronidasa. Les plàntules mostrades són un exemple representatiu.

4. Estudi de la sobreexpressió del gen *COPT6* en *Arabidopsis thaliana*

La sobreexpressió d'un gen és una estratègia que ens permet aprofundir en l'estudi de la seua funció. Recentment, al nostre laboratori s'ha caracteritzat la sobreexpressió dels gens *COPT1* i *COPT3* en *A. thaliana*. Aquestes plantes sobreexpressores augmenten el contingut de Cu endogen i esdevenen més sensibles a la presència de Cu al medi (Andrés-Colás et al. 2010). Per tal d'estudiar la sobreexpressió de *COPT6* en *A. thaliana*, vam amplificar per PCR el gen *COPT6* amb els encebadors COPT6- XbaI-F i

COPT6HA-SalI-R. L'encebador revers introdueix una cua amb tres epítops HA per poder detectar la proteïna resultant per *Western blot*. L'amplicó generat fou clonat en el vector *pFP101* entre els llocs *Xba*I i *Sal*I per generar la construcció *pFP101::COPT6::HA*, la qual ens permet sobreexpressar el nostre gen d'estudi ja que el vector utilitzat presenta dos promotors *CaMV(35S)CaMV* (2xCaMV(35S)) (Materials i Mètodes; apartat 2.3.5 i 3.2.2).

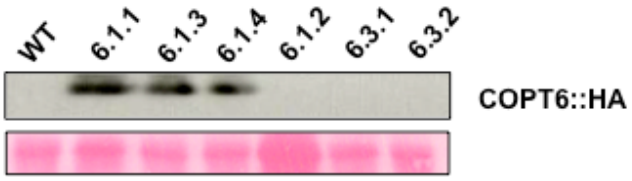


Figura R3.11: Detecció de la sobreexpressió de COPT6::HA. *Western blot* amb l'anticòs anti-HA a partir de 20 µg d'extractes totals de proteïnes de fulles crescudes en tests. La tinció de Ponceau de la subunitat menuda de la RubisCO es mostra com a control de càrrega.

Les plantes transformades amb aqueix vector van ser destriades en base a la fluorescència que presenten les llavors i crescudes en tests. Amb l'objectiu de comprovar el grau de sobreexpressió de *COPT6* es va extraure les proteïnes totals de fulles d'aquestes plantes i es va detectar els nivells de COPT6::HA per *Western blot* mitjançant un anticòs contra l'epítop HA. De les 6 plantes assajades tan sols la meitat expressaven COPT6::HA. Les 3 línies sobreexpressores es van crèixer de nou per tal d'obtenir un homozigot (Figura R3.11 i Materials i Mètodes; 1.3.2).

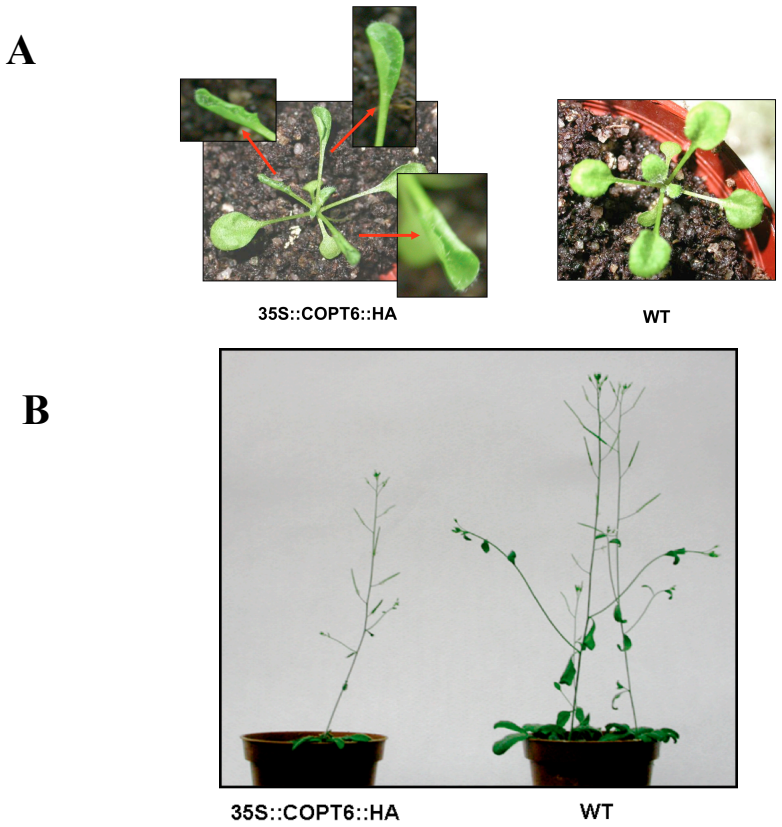


Figura R3.12: Fenotips de les plantes COPT6::HA. **A)** Fenotip de les fulles de la planta sobreexpressora de COPT6 i silvestre. **B)** Visió general de les línies COPT6::HA i silvestre (WT) crescudes en test durant 30 dies.

Algunes de les plantes transgèniques de la primera generació mostraven un fenotip consistent en una reducció del tamany general de la planta i l'enroscament de les fulles de roseta (Figura R3.12). Els esmentats fenotips són similars als que han sigut descrits en les plantes sobreexpressores de *COPT1* (Andrés-Colás et al. 2010). Nogensmenys, al llarg de les següents generacions, en cap de les tres línies homozigotes de què disposem no hem sigut capaços de reproduir els fenotips observats en la primera generació.

5. Obtenció i caracterització de línies amb insercions de T-DNA que afecten el gen *COPT6*

Amb la finalitat de trobar línies d'inserció de T-DNA dins la seqüència codificant del gen *COPT6,* es va fer una recerca a la base de dades del TAIR (www.arabidopsis.org) i es va sol·licitar la línia N583445 de la col·lecció del *SALK Institute* (a partir d'ara COPT6-1) i les línies 350E02 i 405H10 del *GABI-kat Project* (a partir d'ara COPT6-2 i COPT6-3).

5.1. Obtenció de línies mutants per a *COPT6*

Per tal d'identificar el lloc exacte d'inserció del T-DNA en les línies obteses es va escometre la seqüenciació dels fragments corresponents als al·lels amb inserció. Les diferents línies foren crescudes en substrat i se'n va obtindre el gDNA de fulles. Es va dissenyar una remesa de PCR per amplificar, a partir del gDNA, els al·lels amb inserció de T-DNA mitjançant el parell d'encebadors SALK-LEFT i COPT6-2LB per a la lína COPT6-1, el GABI-PCR i COPT6-2RB per a la línia COPT6-2 i COPT6-3. Els amplicons obtesos van ser seqüenciats amb l'encebador SALK-LEFT o GABI-Seq, en funció de la línia (Materials i Mètodes; apartat 4.2 i Taula M5).

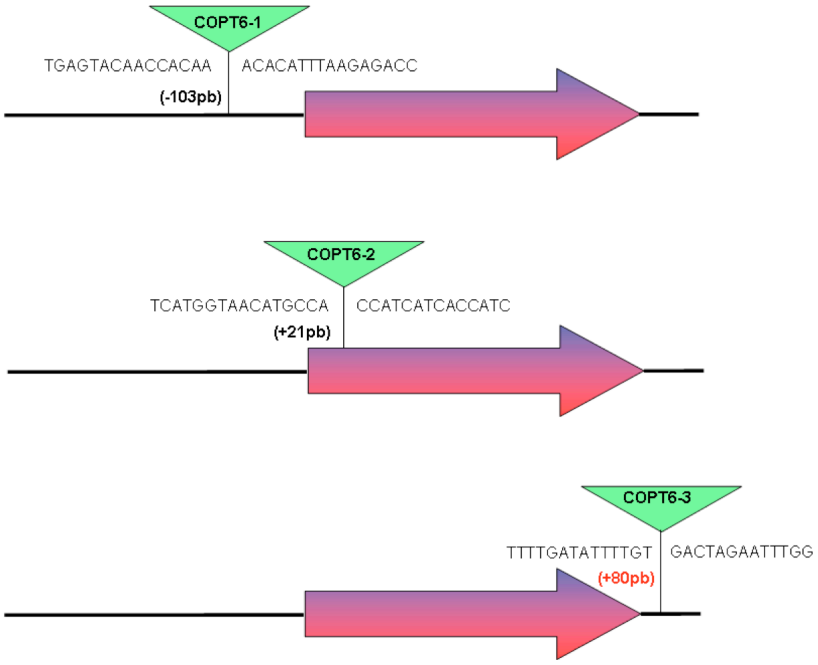


Figura R3.13: Esquema de les insercions de T-DNA en el gen *COPT6*. La fletxa representa el gen *COPT6* i mitjançant les línies contínues, les regions en 5' i 3' UTR. El punt d'inserció s'indica mitjançant un triangle verd amb el nom de la línia mutant, junt amb la seqüència que interromp i la posició relativa.

En aliniar la seqüència dels al·lels mutants amb la seqüència de *COPT6,* es va determinar que la línia COPT6-1 conté la inserció a -103 pb (considerant +1 el primer nucleòtid de la seqüència codificant), de manera que deixa un promotor mínim sense els dos motius GTAC de resposta a Cu i la majoria dels elements teòrics que reglen l'expressió tissular. Per altra banda, de les insercions provinents del *GABI-kat*, COPT6-2 té interrompuda la seqüència codificant a nivell del nucleòtid +21, mentre que en COPT6-3 s'ubica en 80 pb després del codó d'aturada (Figura R3.13). Conseqüentment, es va decidir estudiar el mutant COPT6-2 ja que esdevé el millor candidat per a mutant de pèrdua de funció.

Per tal de distingir quins individus mutants COPT6-2 són homozigots per a la inserció de T-DNA es va dissenyar dues remeses de PCR en què amplifiquem, en un cas l'al·lel silvestre (WT) amb els encebadors COPT6-2RB i COPT6-2LB (872 pb), i en l'altre l'al·lel amb inserció (ins) mitjançant el GABI-PCR i COPT6-2RB (900 pb). Les combinacions possibles en funció de l'estat gènic de les plantes, es recullen a la figura R3.14. Els individus silvestres tan sols amplifiquen l'al·lel silvestre, mentre que els mutants tan sols amplifiquen la variant insertada. En el cas dels hemizigots, s'amplifiquen ambdues variants.

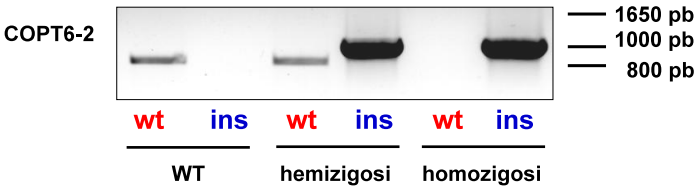


Figura R3.14: Genotipat per PCR de la línia mutant COPT6-2. Amplificació per PCR de l'al·lel silvestre (WT) i l'al·lel amb inserció de T-DNA (ins) a partir de gDNA de diferents plantes de la línia COPT6-2, mitjançant els encebadors proposats a la taula M5 de Materials i Mètodes. Els parells de bases del marcador de tamany s'indiquen al marge dret.

Com ja hem apuntat adès, els mutants COPT6-2 constitueixen l'única línia candidata a mutants de pèrdua de funció, degut a què el punt d'interrupció afecta la seqüència codificant del gen *COPT6*. Per tal d'establir si els individus d'aquesta línia no expressen *COPT6,* es va sembrar llavors homozigotes de la línia COPT6-2 i silvestre en medi ½ MS suplementat amb sacarosa 1% i diferents concentracions de BCS o $CuSO_4$. Es va extraure l'RNA total de plàntules de 7 dies i es va retrotranscriure a cDNA per a analitzar l'expressió per sqPCR (Materials i Mètodes; Taula M1).

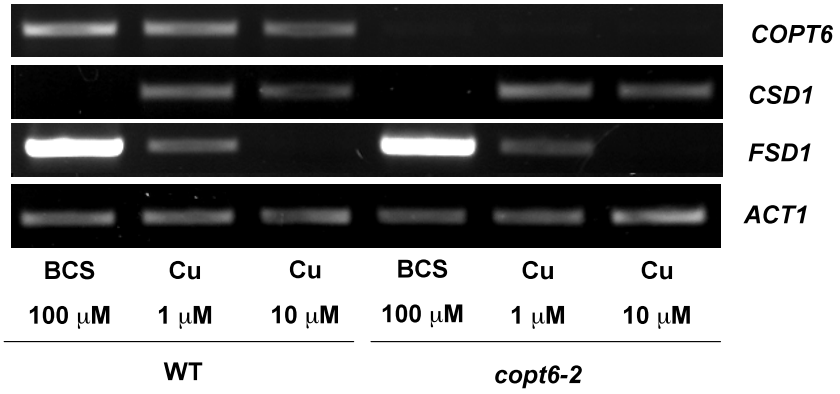


Figura R3.15: Estudi per sqPCR de l'expressió gènica en *copt6-2*. L'RNA total de plàntules de 7 dies crescudes en ½ MS suplementat amb sacarosa 1% i les quantitats de Cu o BCS indicades fou convertit a cDNA i analitzat per sqPCR sota condicions no saturants per amplificar *COPT6*, *CSD1*, *FSD1*. El gen *ACT1* s'inclou com a control de càrrega. Els parells d'encebadors utilitzats en cada cas són: COPT6-rt-F2/COPT6-NcoI-R, per a *COPT6*, FSD1-rt-F/FSD1-rt-R, per a *FSD1*, CSD1-rt-F/CSD1-rt-R, per a *CSD1* i ACTINARA 1/ACTINARA2, per a *ACT1*(Materials i Mètodes; Taula M1).

A la figura R3.15 mostrem la substitució de les superòxid dismutases que ja hem descrit anteriorment. En la línia COPT6-2, el comportament dels gens de les superòxid dismutases és idèntic al de la línia silvestre. També s'hi evidencia l'expressió constant de *COPT6* independentment del contingut en Cu del medi. Ara bé, els mutants són incapaços d'expressar *COPT6*, per tant, d'aquest experiment es desprén que els mutants *copt6-2* esdevenen mutants de pèrdua de funció en què l'expressió gènica per dèficit de Cu no es veu alterada (Figura R3.15).

5.2. Anàlisi dels mutants *copt6-2*

Amb l'objectiu d'estudiar com afecta la manca d'expressió de *COPT6* en els mutants *copt6-2*, es va dur a terme tot un seguit d'assajos fisiològics i

moleculars per tal de cercar si hi havia diferències significatives respecte de les plantes silvestres. La línia *copt6-2* fou crescuda, tant en substrat com en placa, sense que forem capaços de detectar cap tipus d'anomalia durant el creixement o desenvolupament. Tanmateix, comsevulla que COPT6 participa en la part reproductora, tant a nivell del gra de pol·len com en els òvuls, potser la no expressió de *COPT6* en els mutants es podria traduir en una reducció en el nombre de llavors produïdes per síliqua. Les síliqües de plantes de 40 dies crescudes en medi hidropònic en condicions suficiència de Cu (medi Hoagland) i en dèficit de Cu (Hoagland sense afegir la concentració de Cu requerida) foren recollides i es va fer el recompte de les llavors que contenien. Els resultats d'aquest experiment s'expressen a la Taula R3.1 i mostren que el mutant produeix un número de llavors significativament major que la línia silvestre en la condició de suficiència, mentre que el recompte de llavors *copt6-2* és significativament menor que per a la línia silvestre en substraure el Cu del medi.

Taula R3.1: Llavors per síliqua en *copt6-2*. Plàntules de la línia *copt6-2* i silvestre (WT) crescudes en substrat durant un 2 de setmanes foren a cultius hidropònics durant 8 setmanes amb la solució de creixement (Hoagland i Hoagland sense Cu, -Cu). Les llavors de cada síliqua van ser recomptades. La desviació estàndard correspon a la mitjana de les llavors de 6 síliqües i les diferències significatives per a $p<0.05$ (*) i $p<0.01$(**).

	WT	***copt6-2***
Hoagland	31 ± 7	40 ± 5 *
Hoagland –Cu	41 ± 4	30 ± 8 **

Per altra banda, el contingut de Cu endogen en plàntules de 8 dies crescudes en medis ½ MS comercial suplementat amb sacarosa 1% i diferents concentracions de Cu es va determinar per absorció atòmica. La línia *copt6-2* acumula Cu en dintre del rang de deficiència en medis

comercials, ara bé en afegir el medi Cu 1 o 10 µM els mutants responen i acumulen Cu dins un rang òptim o d'excés, respectivament (Taula R3.2). Per tant, els nivells de Cu endogen detectats no comporten diferències significatives respecte dels que acumulen els individus silvestres en aqueixes condicions. Igualment, tampoc es va trobar cap diferència en el contingut de Cu de les fulles i flors de plantes crescudes en tests.

Taula R3.2: Contingut en Cu en de les línia *copt6-2*. Plàntules de 7 dies crescudes en ½ MS suplementat amb sacarosa 1% i les quantitats de Cu indicades foren liofilitzades i posteriorment digerides per ser analitzades per absorció atòmica.

	WT	***copt6-2***
½ MS comercial	2.38 ± 0.22	2.61 ± 0.33
½ MS comercial + Cu 1 µM	10.81 ± 4.14	8.16 ± 2.99
½ MS comercial + Cu 10 µM	23.92 ± 2.38	21.27 ± 1.70

Malgrat no detectar fenotips visuals, podria ser que la manca d'expressió de *COPT6* es traduira en alteracions de tipus molecular, de manera que vam optar per analitzar l'expressió de gens involucrats en l'homeòstasi del Cu, tant per sqPCR, com per qPCR. A l'apartat anterior, hem descrit que l'anàlisi de l'expressió gènica per sqPCR de les superòxid dismutases de Fe i Cu no es veuen alterats en el mutant *copt6-2* (Figura R3.15). Per qPCR, l'anàlisi de *FSD1* i *CSD1* en *copt6-2* també manté la tendència de la línia silvestre ja que, malgrat la variabilitat observada, el màxim d'expressió s'obté a concentracions de Cu exogen entre 0 i 0.1 µM i, per al cas de la *CSD1* i *CCS*, en *copt6-2* els màxims es detecten a partir de 0.3-0.4 µM de Cu (Figura R3.16).

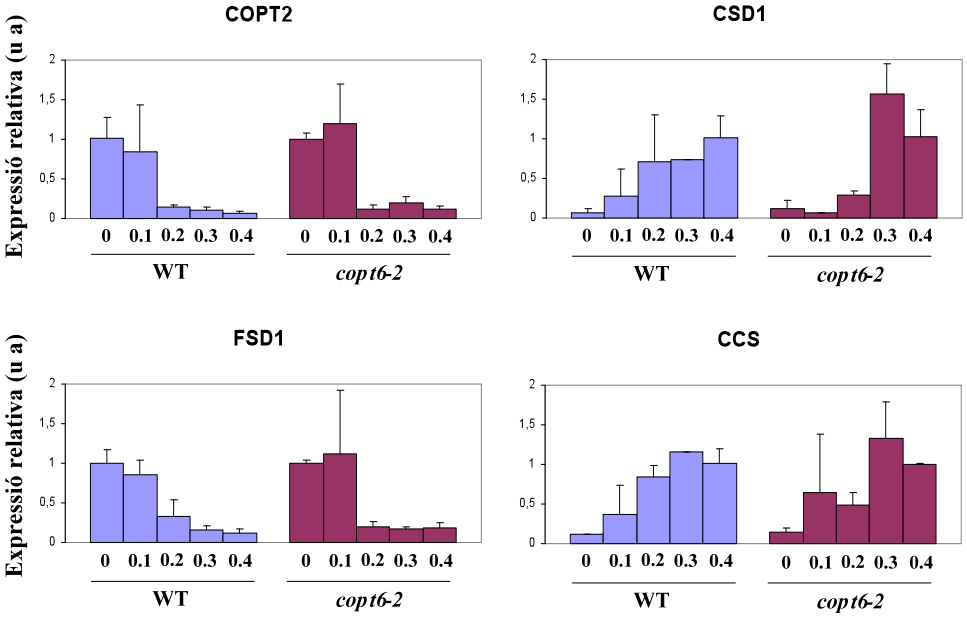


Figura R3.16: Estudi per qPCR de l'expressió gènica en *copt6-2*. L'RNA total de plàntules de 7 dies crescudes en ½ MS suplementat amb sacarosa 1% i les quantitats de Cu indicades fou retrotranscrit a cDNA i analitzat per qPCR. Els gens analitzats són normalitzats en base a l'expressió del gen d'expressió constitutiva *UBQ10*. Les barres d'error corresponen a la desviació estàndard de la mitjana d'un experiment representatiu. Els parells d'encebadors utilitzats són: COPT2-qPCR-F/COPT2-qPCR-R, per a *COPT2*; FSD1-qPCR-F/FSD1-qPCR-R, per a *FSD1*; CSD1-qPCR-F/CSD1-qPCR-R, per a *CSD1* i CCS-qPCR-F/CCS-qPCR-R per a *CCS* (Materials i Mètodes; Taula M2).

La manca d'expressió de *COPT6* no es tradueix en la inducció del transportador *COPT2* com s'havia descrit en el mutant *copt1* antisentit (Sancenón et al. 2004), ja que manté els màxims d'expressió per al rang comprés entre 0 i 0.1 µM de Cu (Figura R3.16). En conclusió, segons els experiments mostrats no podem concloure que existesquen diferències significatives d'expressió dels principals gens de l'homeòstasi del Cu en el mutant *copt6-2* sota les condicions que hem assajat.

DISCUSSIÓ

En el present capítol presentem el gen *COPT6* com un nou gen homòleg de la família COPT d'*A. thaliana*. A més de la similitud estructural amb COPT1 i COPT2, l'expressió de *COPT6* complementa el dèficit de creixement de la soca mutant de *S. cerevisiae ctr1Δctr3Δ* en la mateixa mesura que ho fan *COPT1* i *COPT2* (Figura R3.3). Per tant, suggerim que COPT6 forma part d'una subfamília de transportadors de membrana plasmàtica junt amb COPT1 i COPT2. De fet, la proteïna de fusió COPT6::GFP complementa la soca *ctr1Δctr3Δ* i, en expressar-se en protoplasts d'*A. thaliana*, es localitza a la membrana plasmàtica, amb un patró de fluorescència similar al descrit per a COPT1::GFP i COPT2::GFP (Figura R2.3, Figura R3.5 i Andrés-Colás et al. 2010).

No obstant, COPT6 presenta peculiaritats que el distingeixen de la resta dels membres COPT caracteritzats fins al moment. En primer lloc, a nivell de l'extrem carboxiterminal no es detecta el motiu CxC present en altres membres de la família CTR. Recentment, s'ha descrit que la deleció del motiu CxC del transportador ScCtr1 incrementa la sensibilitat al Cu i els nivells de SOD. S'ha proposat que el paper de CxC consisteix a modular canvis conformacionals en cas d'excés de Cu per impedir el transport en condicions desfavorables (Wu et al. 2008). La manca del domini CxC en COPT6 suggeriria que aquesta proteïna s'escapa d'aquest mecanisme de regulació (Wu et al. 2008).

Un altre tret característic prové de l'estudi del patró d'expressió per òrgans de *COPT6*, el qual revela que es tracta d'un transportador exclusiu de part aèria, ja que no es detecta a l'arrel (Figura R3.8 i R3.9). La fusió de 389 pb del *pCOPT6* al gen *GUS* revela que *COPT6* és el primer membre de la família COPT expressat a la part reproductora femenina (carpels), concretament a nivell del sac embrionari. Pel que fa a la resta del patró d'expressió, destaquem que *COPT6* s'expressa a nivell del meristema apical caulinar, als estomes, al gra de pol·len i a l'embrió, fet que reitera la importància del Cu en els processos de desenvolupament i reproducció de la planta (Figura R3.9).

Un altre tret particular de *COPT6* és que l'expressió de l'mRNA i el patró de tinció de les plàntules *p(389)COPT6::GUS* no sofreixen variacions en funció del contingut de Cu del medi (Figura R3.7 i R3.10). Els gens de l'homeòstasi del Cu que s'indueixen en dèficit de Cu presenten en el promotor diversos motius GTAC, possiblement involucrats en la regulació per Cu. Teòricament, a través dels esmentats elements, s'hi uniria el factor transcripcional SPL7 per exercir la inducció en condicions de dèficit de Cu. Mitjançant experiments de mutagènesi dirigida s'ha descrit que un promotor amb dos motius GTAC, és capaç de dur a terme la resposta a dèficit de Cu (Yamasaki et al. 2009). Per tant, tot i que l'anàlisi *in silico* del *pCOPT6* detecta dos motius GTAC, la manca de regulació de *COPT6* a través de SPL7 podria deure's a què al *pCOPT6* no es disposa del context necessari per poder reclutar els elements que participen en aqueixa via. Considerant els baixos nivells de Cu a la part aèria en plantes crescudes en substrat i el fet que el patró d'expressió de *COPT6* comprenga exclusivament la part

aèria, suggerim que la manca de regulació per Cu de *COPT6* i l'absència del motiu CxC de l'extrem carboxiterminal, podria ser degut, en part, a la necessitat de disposar d'un mecanisme de captació de Cu contínuament actiu. Així i tot, no podem descartar que existesquen unes altres vies de regulació per dèficit de Cu de *COPT6* a nivell post-transcripcional o post-traduccional.

Per escometre més acuradament la caracterització de COPT6, es va estudiar la resposta a diferents condicions de Cu del mutant *copt6-2*. El mutant *copt6-2* presenta una inserció de T-DNA dins de la seqüència codificant de *COPT6* que li impedeix expressar el gen (Figura R3.15). Tanmateix, no hem observat conseqüències fenotípiques diferencials degudes a la manca d'expressió de *COPT6* independentment del sistema de creixement escollit i de les condicions de Cu. De la mateixa manera l'expressió gènica dels principals gens involucrats en l'homeòstasi del Cu no es veu alterada (Figura R3.15 i R3.16). Per altra banda, les plàntules *copt6-2* de 7 dies crescudes sota diferents concentracions de Cu no mostren diferències en l'acumulació de Cu respecte de la línia silvestre (Taula R3.1). De la mateixa manera, cal tindre present que el Cu endogen en fulles i flors de plantes *copt6-2* crescudes en test no difereixen significativament de les de la línia silvestre.

Una altra característica del patró d'expressió de *COPT6* és que s'expressa a les flors. Tot i que anteriorment hem descrit que *COPT1* i *COPT2* s'expressen a nivell del gra de pol·len, *COPT6* és el primer transportador expressat en el gametòfit femení. Nogensmenys, amb els

mutants *copt6-2* no hem pogut establir cap alteració que concernesca la viabilitat de les llavors. Si bé, és cert que en cultius hidropònics sense suplementació de Cu els mutants *copt6-2* produeixen menys llavors que els individus silvestres. Ara bé, aquest paràmetre és molt variable i, per si sol, no ens serveix per a determinar possibles afeccions. Per tant, per discernir si els mutants *copt6-2* presenten algun tipus d'alteració a nivell del procés reproductiu, en el futur es durà a terme aproximacions per tal d'avaluar amb més detall si aquest procés es veu afectat.

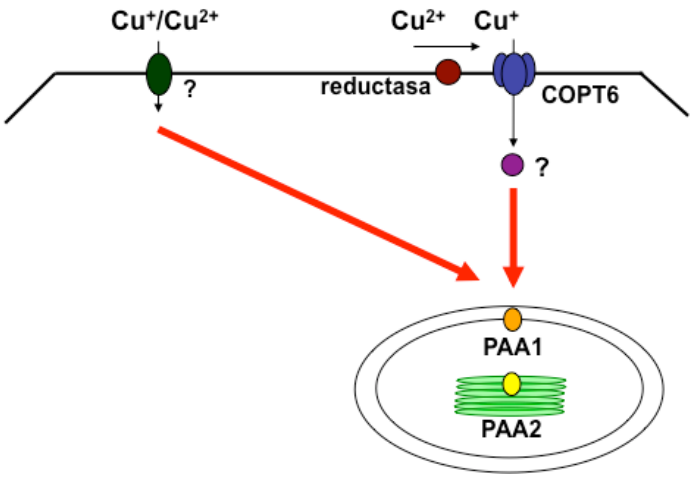


Figura R3.17: Hipòtesi per a la distribució del Cu a les cèl·lules de la part aèria. El Cu arribaria a les cèl·lules de la part aèria en forma de Cu^{+} o Cu^{2+} i seria internalitzat a través d'algun mecanisme de transportadors a identificar. De la mateixa manera, el Cu^{2+} lliure seria reduït a Cu^{+} i incorporat mitjançant el transportador d'alta afinitat de Cu COPT6. De forma directa o a través d'algun tipus d'intermediari el Cu es distribuïria, entre d'altres llocs, al cloroplast.

Tot plegat, el fet que la supressió de l'expressió de *COPT6* no cause alteracions en els nivells de Cu endogen i no implique cap fenotip, ni cap alteració fisiològica o molecular suggereix la possibilitat que existesquen mecanismes alternatius involucrats en el transport de Cu. Per tant, proposem

que la via d'entrada del Cu a les cèl·lules de la part aèria deu efectuar-se a través d'un sistema independent dels transportadors COPT, mentre que el paper de COPT6 podria consistir a transportar el Cu que arriba mitjançant la via apoplàstica als òrgans aeris a través de rutes de menor importància o específiques de processos determinats com ara el reciclatge de proteïnes durant l'etapa de senescència (Figura R3.17). Conseqüentment, en base a aqueix postulat caldrà escometre futurs experiments destinats a aclarir la participació de COPT6 amb el transport de Cu a llarga distància, així com en la mobilització del Cu en la fulla durant la senescència.

Els resultats presentats en aquest capítol s'esquematitzen a l'atles 2 (p. 204).

CAPÍTOL 4: EL TRANSPORTADOR DE COURE D'ALTA AFINITAT COPT5

1. Anàlisi de la seqüència codificant del transportador COPT5

El gen *COPT5* (At5g20650) codifica un possible transportador de Cu d'alta afinitat de la família COPT. La seqüència d'aminoàcids de COPT5 presenta un 22.8% d'identitat amb COPT1 i un 19.5% amb COPT2. Així i tot, segons els estudis previs sobre la topologia dels transportadors COPT, el perfil d'hidrofobicitat dels 146 aminoàcids de la proteïna COPT5 preveu l'existència de 3 possibles segments transmembrana: el TMD1 comprendria els aminoàcids 24-41, el TMD2 els 87-106 i el TMD3 els 111-128 (Figura R4.1). Com la resta dels membres de la família CTR, a més dels 3 TMD, COPT5 presenta dos elements conservats que en *S. cerevisiae* són essencials per al transport de Cu, ço és: una metionina a 20 aminoàcids del TMD1 i un motiu ric en metionines tipus MxxxM al TMD2 (Figura 4.1; Puig i Thiele 2002). També destaquem els motius estructurals descrits en altres CTR responsables de la trimerització GxxxG a nivell del TMD3 i el motiu CxC de l'extrem aminoterminal (Nose et al. 2006). En comparació a la resta de transportadors CTR, l'extrem carboxiterminal de COPT5 s'exposaria envers el citosol. A més, en COPT5, tal i com també ocorre en COPT3, a nivell de l'extrem aminoterminal tan sols hi ha un motiu enriquit en metionines tipus MMHM (Figura R4.1; Introducció; apartat 4.2.1; Sancenón et al, 2003; Puig et al. 2002).

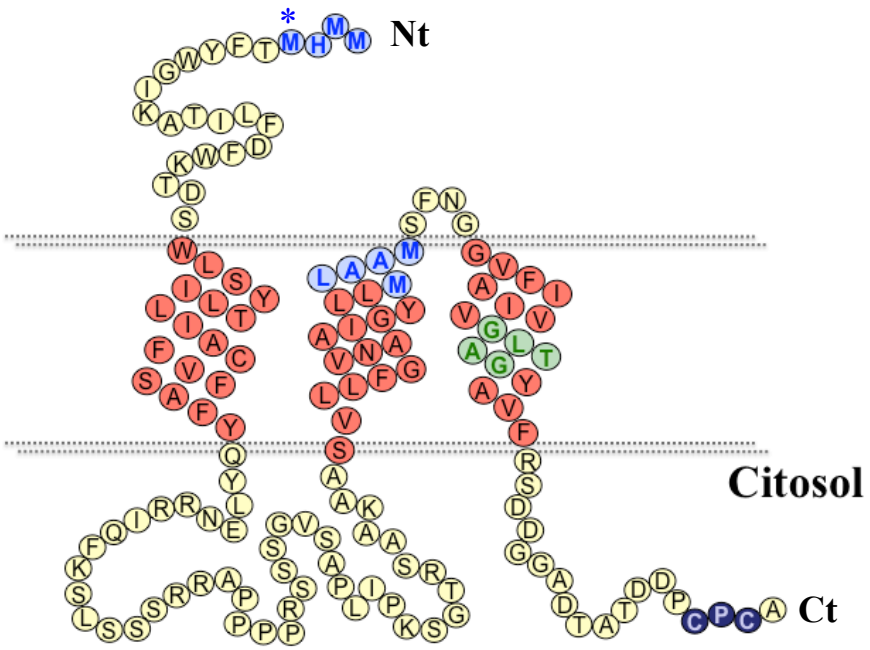


Figura R4.1: **Topologia del transportador COPT5**. Topologia teòrica que podria adoptar la seqüència d'aminoàcids del transportador COPT5 amb els residus dels tres segments transmembrana (roig), el motiu ric en metionines de l'extrem aminoterminal (blau; metionina conservada assenyalada amb un asterisc) i el motiu essencial MxxxM del TMD2 (blau), el motiu el GxxxG del TMD3 (verd) i el motiu ric en cisteïnes (lila).

L'assaig de complementació de la soca de *S. cerevisiae ctr1Δctr3Δ* amb els membres de la família COPT mostra que el gen *COPT5* restableix parcialment els defectes associats al creixement del mutant en medis no fermentables (Sancenón et al. 2003). Tanmateix, les taxes d'incorporació de ^{64}Cu en aqueix llevat complementat minven en comparació als mutants complementats amb *COPT1* i *COPT2* (Sancenón et al. 2003). Aquestes dades prèvies indiquen que *COPT3* i *COPT5* complementen parcialment el llevat *ctr1Δctr3Δ*, incorporen taxes de ^{64}Cu menys eficientment que COPT1 i COPT2 (Sancenón et al. 2003). Per tant, en base a què COPT3 i COPT5 comparteixen trets estructurals i funcionals propis, s'agruparien dins d'una

subfamília diferent d'aquella que conformen COPT1, COPT2 i COPT6 (Sancenón et al. 2003 i capítol 3).

2. Localització subcel·lular de COPT5

Com ja hem esmentat, el transportador COPT5 complementa parcialment el dèficit de creixement de la soca de llevat *ctr1Δctr3Δ* en medis no fermentables. Aquest fet podria justificar-se des del punt de vista estructural (reducció del número de metionines en l'extrem aminoterminal), funcional (menor eficàcia que els altres transportadors) o atenent a la ubicació subcel·lular. No obstant, cal esmentar que la predicció teòrica de la localització subcel·lular de COPT5 amb el servidor *PSORT* no revela cap seqüència senyal de localització.

2.1. Localització de COPT5::HA en *A. thalina* per fraccionament subcel·lular

La ubicació subcel·lular d'una proteïna per aproximacions bioquímiques es pot realitzar mitjançant el fraccionament d'un extracte proteic total i la identificació de les fraccions on es localitza la proteïna d'estudi junt amb marcadors de compartiment. Per a dur a terme aquest propòsit, la seqüència codificant de *COPT5* va ser etiquetada amb l'epítop HA en posició carboxiterminal i clonada en el vector *pFP101* per construir el vector de sobreexpressió de *COPT5,* ja que l'esmentat vector conté el promotor *CaMV(35S)* per duplicat (Materials i Mètodes; apartat 2.3.5). Amb aqueix vector es va transformar *A. thaliana* i es va seleccionar les llavors

transgèniques. A partir d'extractes totals de fulles de les diferents línies de plantes transgèniques obteses, es va realitzar un *Western blot* amb un anticòs contra l'epítop HA i es va seleccionar la línia COPT5::HA 5.6 per ser la línia que més sobreexpressava el transgèn (Figura R4.2). Nogensmenys, les línies sobreexpressores de *COPT5* no han mostrat cap tipus d'alteració respecte de les variants silvestres, independentment del medi de creixement emprat.

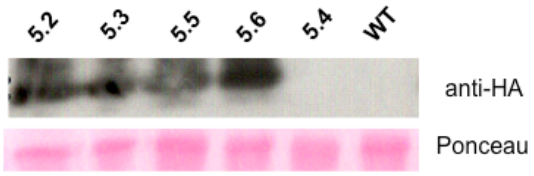


Figura 4.2: **Sobreexpressió del gen *COPT5* en *Arabidopsis thaliana***. *Western blot* amb l'anticòs anti-HA a partir d'extractes de fulles de plantes transgèniques crescudes en substrat durant 30 dies per establir els nivells de proteïna COPT5::HA. El control de càrrega de proteïnes es mostra amb la tinció de Ponceau de la subunitat gran de la RuBisCO.

Per tal d'abordar la localització subcel·lular de COPT5 des d'un punt de vista bioquímic, es va fraccionar un extracte proteic de fulles adultes de plantes COPT5::HA de 30 dies, crescudes en substrat, en un gradient continu de sacarosa 20-47% (p/v) (Materials i Mètodes; apartat 3.2.3). Les fraccions recollides es van analitzar per *Western blot* amb anticossos contra l'epítop HA per detectar la proteïna COPT5::HA i amb anticossos contra proteïnes marcadores de compartiments: AHA3 (membrana plasmàtica), SEC21 (cis-Golgi), SYP21 (PVC), PC (cloroplast) i la pirofosfatasa V-HPPasa (tonoplast) (Materials i Mètodes; Taula M4).

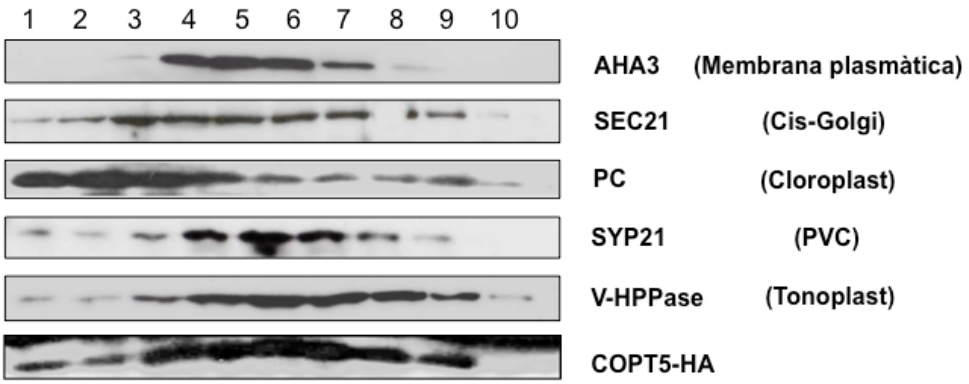


Figura 4.3: Fraccionament subcel·lular de COPT5::HA en gradient de sacarosa. L'extracte cru de proteïnes provinents de fulles de plantes de 30 dies de la línia sobreexpressora COPT5::HA crescudes en test en fotoperíode de dia curt és sotmés a un gradient de sacarosa 20-45% (p/v). Volums iguals de cada fracció són carregats en un gel SDS-PAGE i sotmesos a *Western blot* amb anticossos marcadors d'orgànuls: plasmalemma (AHA3), cis-Golgi (SEC21), cloroplast (PC), PVC (SYP21), tonoplast (V-HPPasa) i contra l'epítop HA (COPT5::HA).

Distingim 4 patrons diferents de migració segons el comportament dels marcadors en el fraccionament efectuat. En primer lloc, el marcador de membrana plasmàtica AHA3 adopta un patró particular, ja que es concentra des de la fracció 4 a la 7. En segon lloc, el marcador SEC21 del *cis*-Golgi es distribueix per totes les fraccions, però de forma més abundant des de la fracció 3 a la 9, amb un màxim en la tercera. El tercer patró pertany a la PC, que comprén, sobretot, de la fracció 1 a la 4. El quart patró de distribució és el dels marcadors de PVC i tonoplast, ja que ambdós es detecten de forma gradual des de la tercera a la huitena fracció amb un màxim en la cinquena (Figura 4.3). El fraccionament de COPT5::HA és similar al dels marcadors SYP21 i V-HPPasa, ja que s'hi aprecia la mateixa gradació, entre la tercera i huitena fracció, amb un màxim en la cinquena (30.1% de sacarosa). Per tant concloem que COPT5::HA és una proteïna que es localitza al PVC i/o tonoplast.

2.2. Funcionalitat de la proteïna de fusió COPT5::GFP en llevat

Amb l'objectiu d'establir la localització subcel·lular de COPT5 mitjançant aproximacions cel·lulars, vam dur a terme una estratègia consistent a etiquetar COPT5 amb la proteïna GFP a nivell de l'extrem carboxiterminal. A partir del vector *p426GPD::COPT5* es va amplificar el gen *COPT5* amb els encebadors COPT5-SalI-F i COPT5-NcoI-R; i es va clonar en el vector binari *pCaMV(35S)::sGFP* en fase amb la GFP, i sota la direcció del promotor *CaMV(35S)* (Sancenón et al. 2003; Materials i Mètodes; apartat 2.3.2).

En primer lloc, per tal d'avaluar la funcionalitat de la quimera COPT5::GFP, la proteïna de fusió es va expressar en la soca de llevat *ctr1Δctr3Δ*. A partir del vector *pCaMV(35S)::COPT5::sGFP* es va amplificar COPT5::GFP amb el encebadors COPT5-BamHI-F i GFP-SalI-R i es va clonar en el vector d'expressió *p426GPD* (Materials i Mètodes; Taula M3). Junt amb *p426GPD::COPT5::GFP*, la soca *ctr1Δctr3Δ* va ser transformada amb el vector buit i les construccions *p426GPD::COPT1* i *p426GPD::COPT5* (Sancenón et al. 2003). Els transformants sembrats en medi selectiu, amb glucosa com a font de carboni, no manifestaven cap alteració en el creixement. Ara bé, en canviar la font de carboni del medi a glicerol, observem que tan sols *COPT1* complementa perfectament la manca de creixement de la soca mutant en aquest medi (Figura R4.4A). Com ja havíem descrit, *COPT5* complementa parcialment la manca de creixement del mutant (Sancenón et al. 2003). Pel que fa a la fusió COPT5::GFP, les taxes de complementació també són parcials. Concretament, COPT5 i

COPT5::GFP complementen la soca de llevat *ctr1Δctr3Δ* en la mateixa mesura (Figura R4.4A). Les diferències de creixement en medis no fermentables estan relacionades amb la disponibilitat de Cu ja que en suplementar el medi amb un excés de Cu, tots els transformants creixen perfectament (Figura R4.4A).

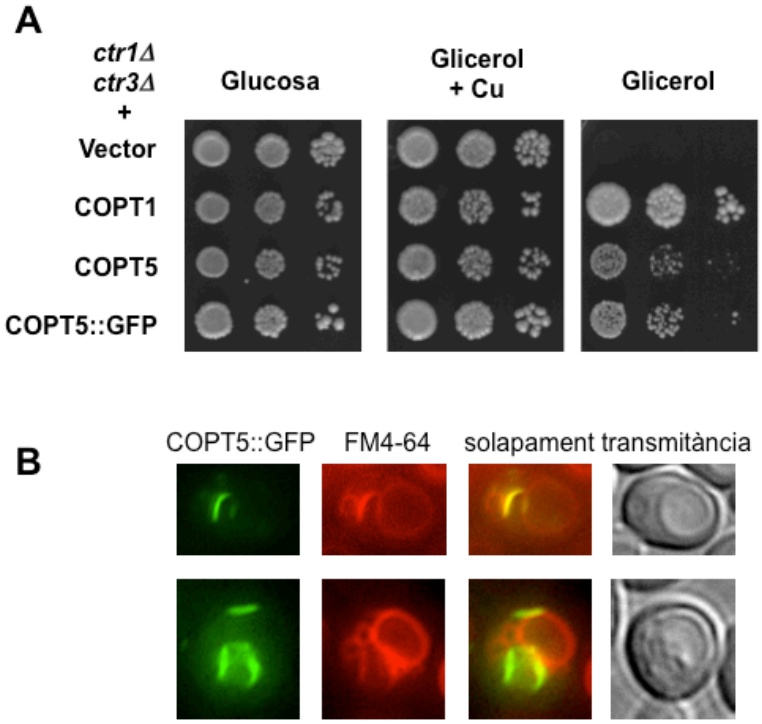


Figura R4.4: Complementació i localització de COPT5::GFP en la soca mutant de llevat *ctr1Δctr3Δ*. A) Complementació la soca mutant de *S. cerevisiae ctr1Δctr3Δ* amb COPT5::GFP. La soca mutant *ctr1Δctr3Δ* va ser crescuda fins assolir la fase exponencial i va ser transformada amb els vectors *p426GPD*, *p426GPD::COPT1*, *p426GPD::COPT5* i *p426GPD::COPT5::GFP*. Els transformants obtesos van ser crescuts en medi selectiu SC-ura (glucosa com a font de carboni) i en medis amb glicerol suplementat amb 100 µM de Cu. En cadascuna de les fileres, cada gota representa una dilució 1/10 del cultiu respecte de l'anterior. **B)** Localització subcel·lular de COPT5::GFP en la la soca mutant de *S. cerevisiae ctr1Δctr3Δ*. Es mostra el patró de fluorescència de COPT5::GFP, la fluorescència de la sonda FM4-64, junt amb el solapament dels senyals i la imatge de transmitància corresponent.

A continuació, es va estudiar la localització subcel·lular de COPT5::GFP en els llevats transformants mitjançant la fluorescència de la GFP. Les cèl·lules es van tractar amb el colorant FM4-64 per tal de distingir els vacuols. En aquest cas, la fluorescència de COPT5::GFP s'estableix irregularment al citosol del llevat, sense que s'hi observe cap patró definit (Figura R4.4B). D'aquests experiments es desprén que la proteïna de fusió COPT5::GFP es localitza intracel·lularment en llevat i que, probablement, la baixa complementació de la soca de llevat *ctr1Δctr3Δ* siga deguda, en part, a aqueixa distribució intracel·lular del transportador.

2.3. Localització subcel·lular de COPT5::GFP en *A. thaliana*

Amb la finalitat de testar si la ubicació intracel·lular observada en llevat es confirma en cèl·lules vegetals, vam optar per transformar la línia silvestre d'*A. thaliana* amb el vector d'expressió *pFP101::pCOPT5::COPT5::GFP*, el qual dirigeix l'expressió de la proteïna de fusió COPT5::GFP sota el control del promotor endogen, *pCOPT5* (Materials i Mètodes; apartat 2.3.3). En la primera ronda de transformació es va recollir 10 línies transgèniques independents que foren sembrades de nou per tal d'obtindre línies homozigotes. A partir de plàntules de 7 dies, es va estudiar la fluorescència mitjançant microscopia confocal. La distinció de la fluorescència de la GFP de l'autofluorescència de la paret vegetal en arrels s'aconsegueix tenyint les cèl·lules amb una solució de iodur de propidi (Materials i Mètodes; 4.3.1). El patró de fluorescència associat a la quimera COPT5::GFP comprén una sèrie de punts al citoplasma, tant a nivell de les arrels com en la part aèria (Figura R4.4A). Per tant, amb aquesta estratègia, concloem que la proteïna

de fusió COPT5::GFP s'associa amb algun compartiment intracel·lular per determinar.

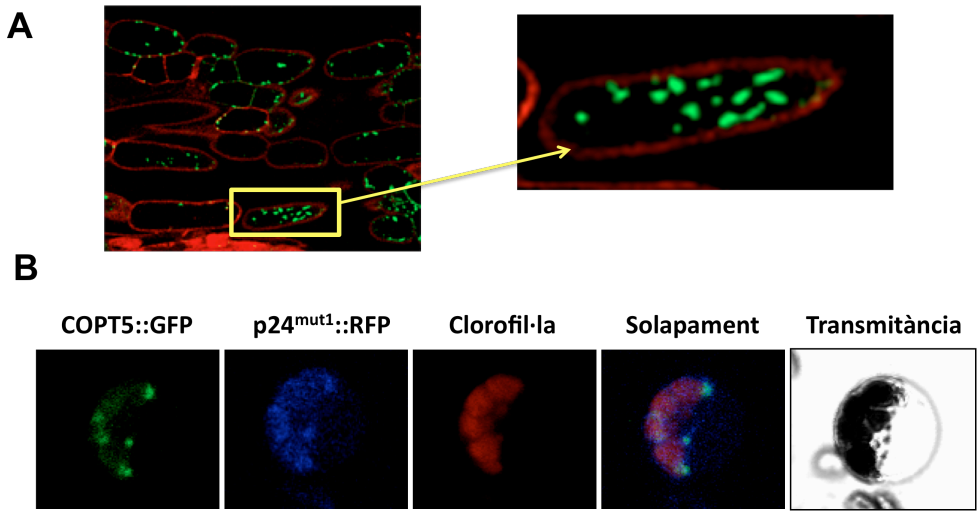


Figura R4.4: **Localització subcel·lular de la proteïna quimèrica COPT5::GFP**. **A)** Localització subcel·lular de la proteïna COPT5::GFP en cèl·lules de l'arrel de plàntules *pCOPT5::COPT5::GFP* de 7 dies. La fluorescència roja es deu a la tinció amb iodur de propidi de la paret cel·lular Es mostra un detall al panell dret. **B)** Localització subcel·lular de la proteïna COPT5::GFP en protoplasts d'*A. thaliana*. En protoplasts aïllats de fulles de plantes de 30 dies crescudes en test es va coexpressar transitòriament *COPT5::GFP* i *p24^{mut1}::RFP*. Imatges amb els filtres per a la fluorescència de la GFP, RFP, la clorofil·la, el solapament d'ambdues i la imatge de transmitància.

Amb l'objectiu de precisar a nivell de quin compartiment s'estableix COPT5::GFP, es va aïllar protoplasts de fulles d'*A. thaliana* de plantes de 30 dies crescudes en test. A continuació, es van transformar transitòriament amb el vector *pCaMV(35S)::COPT5::sGFP* i un seguit de proteïnes marcadores de compartiments fusionades a la proteïna roja fluorescent (RFP): *pBP30::ManI::RFP* (aparell de Golgi), *pBP30::p24::RFP* (reticle endoplasmàtic) i *pB30::p24^{mut1}::RFP* (compartiment prevacuolar, PVC, i

vacuol) cedides pel doctor Fernando Aniento (Universitat de València) (Langhans et al. 2008). El patró de fluorescència de la proteïna de fusió COPT5::GFP s'observa en forma de cossos granulats intracel·lulars adjacents als cloroplasts i tan sols colocalitza amb el senyal del marcador $p24^{mut1}$::RFP (Figura 4.4B). Conseqüentment, COPT5 esdevé una proteïna del PVC.

Finalment, com a conclusió dels estudis de localització realitzats, volem indicar que els resultat de tots els experiments presentats evidencien la ubicació intracel·lular de COPT5 a nivell del PVC i, atés la topologia que adopten els transportadors de la família CTR, proposem que COPT5 deu actuar transportant el Cu envers el citoplasma.

3. Estudi de l'expressió gènica de *COPT5*

3.1. Estudi *in silico* de la seqüència promotora de *COPT5*

Amb la finalitat d'establir els elements en *cis* presents al promotor de *COPT5* (a partir d'ara *pCOPT5*), es va dur a terme una anàlisi *in silico* amb el servidor PLACE (Materials i Mètodes; apartat 2.2.7). A l'hora de considerar el *pCOPT5* hem de tindre present que en el genoma d'*A. thaliana*, *COPT5* i el següent gen, At5g20660 (possible peptidasa vacuolar), es transcriuen en sentit oposat, i les seues seqüències codificants es troben separades per 480 pb, de manera que poden compartir elements reguladors en *cis*.

```
-357  ACCAGAATCA GGTTAACACT ATTGAATTTG AATGGGACAA ATAGAAAAAA
-307  TCAGCTTGAT GATGATGACG ACGAAGACGA GATTTTTTTT TTTTTTTTTG
-257  ACAACAAAGG AAGAGTTGAT TACAAATGCC CCTTAGATTG CACTTATTTA
-207  CGTAAATACC ACTTTGACTT TTTAGCGGCA GTAGCTGCAC TAAAATATAT
-157  GAAGCCTTGT GTTATTGTAA GCCCACTGGA CTATAATGTG AGCCCACGAA
-107  GAAACGTATC TTCTAATCAA TAATTCAACA AACCAAACCT CTTCCCAATC
-57   CCAACAGCTT CATCGTTTTA TCTTCCAATC AAAGCAGCTC AAATCAAGCT
-7    CGCAAAGATG
```

Figura R4.6: **Seqüència de nucleòtids del promotor de *COPT5***. Seqüència de nucleòtids del fragment considerat com a *pCOPT5* amb la posició relativa respecte del primer nucleòtid del triplet d'inici. Caixes CACT i CAACA d'expressió a fulles de roseta i mesòfil·le (taronja), els elements CAAT d'expressió a llavors (roig), els elements ACGT de resposta a etiolació (subratllats en blau) i els MACCWAMC de resposta a lignificació (marró). La caixa E apareix subratllada en roig. Tant l'inici de la seqüència codificant com la caixa TATA es resalten en negreta i subratllat. Les fletxes morades indiquen la posició dels encebdors COPT5-357-HindIII-F i COPT5-ATG-R.

Dels 480 pb que separen COPT5 del gen precedent, es va fer la predicció teòrica dels 357 pb més pròxims al triplet d'inici de *COPT5* (*pCOPT5*). Aquesta anàlisi no identifica cap motiu GTAC de regulació per Cu (Kropat et al. 2005), però sí una caixa E relacionada amb els factors transcripcionals tipus *bHLH*, com l'encarregat d'induir els gens de resposta al dèficit de Fe, FIT1 (Colangelo i Guerinot, 2004). També trobem dos elements de regulació tipus ACGT relacionats amb l'etiolació (Simpson et al. 2003) i una caixa MACCWAMC involucrada en el procés de lignificació (Tamagnone et al. 1998). Pel que concerneix els motius específics d'expressió en teixit, el *pCOPT5* presenta dues caixes de direccionament al pol·len tipus GTGA i AGAA (Rogers et al. 2001; Filichkin et al. 2004) i 2 caixes CAAT de direccionament a llavors (Shirsat et al. 1989) (Figura R4.6). Així doncs, aquesta anàlisi *in silico* del *pCOPT5* indica que, a nivell

de teixits, *COPT5* s'expressa principalment a les fulles, pol·len i llavors. Per altra banda, les dades recollides a l'*eFP Browser* postula que *COPT5* és un gen d'expressió intensa al llarg de tot el cicle vital d'*A. thaliana* a nivell de la major part dels teixits de la planta, excepte al pol·len.

3.2. Establiment del patró d'expressió tissular del gen *COPT5*

Amb l'objectiu d'establir quin és el patró d'expressió per teixits de *COPT5*, es va procedir a fusionar el *pCOPT5* al gen alertador *GUS*. L'esmentada estratègia ens permet identificar les regions on s'expressa *COPT5* en base al precipitat blau que genera la β-glucuronidasa en presència del reactiu X-gluc (Materials i Mètodes; apartat 4.3.2). A partir de gDNA de fulles de plantes de l'ecotipus *Col0* d'*A. thaliana* crescudes en test vam amplificar per PCR els 357 pb del *pCOPT5* amb els encebadors COPT5-357-F-HindIII i COPT5-ATG-R (Figura R4.6; Materials i Mètodes; Taula M3). L'amplicó generat es va fusionar al gen *GUS* en el vector d'expressió binària *pFP101::GUS::NOS* entre els llocs *Hind*III i *Xba*I. A continuació, plantes de la línia silvestre van ser transformades amb el vector *pFP101::pCOPT5::GUS::NOS* per immersió floral i, en base a la fluorescència de les llavors, es va recollir vora 30 llavors transformants independents (Materials i Mètodes; apartat 1.3.2).

Per esbrinar el patró d'expressió de *COPT5* en teixits vegetatius, es va sembrar llavors de la línia *pCOPT5::GUS::NOS*, i les plàntules recollides van ser embegudes amb la solució de reacció X-gluc i posteriorment destenyides amb etanol. A nivell de plàntules de pocs dies, la tinció

associada a GUS es concentra a l'arrel, tant a la principal com a les laterals (Figura R4.7A i B). La tinció apareix ràpida i intensament, cosa que reflecteix l'alta expressió del *pCOPT5* en aquest teixit. Una observació més acurada de les arrels permet esclarir que la tinció és més intensa a nivell dels vasos conductors. Aquest patró es repeteix, tant en plàntules de 5 dies, com en les de 7 i 15 (dades no mostrades). A la part aèria, la tinció es desenvolupa més tard i de forma menys intensa que en el cas de les arrels, fet que indica que les taxes d'expressió del promotor no són tan elevades com a l'arrel. A partir de la corona i fins els cotiledons, *COPT5* s'expressa de forma tènue cap a les capes epidèrmiques, si bé és evident que, de nou, la ubicació preferent són els teixits que envolten els feixos conductors (Figura R4.7C). Durant la primera setmana, els cotiledons mostren una tinció general de forma més intensa a nivell de les nervadures. Aquest patró es repeteix en les fulles vertaderes emergents, fulles de roseta, caulinars i senescents (Figura R4.7D-F). A nivell de la tija, la tinció observada se centra en les cèl·lules dels voltants dels feixos vasculars i de forma més tènue cap a l'epidermis. També observem tinció en els tricomes i en el meristema apical caulinar (Figura R4.7F i G).

Amb la finalitat d'establir el patró d'expressió de *COPT5* en plàntules etiolades, llavors de la línia *pCOPT5::GUS::NOS* van ser sembrades en medis ½ MS sense sacarosa i suplementat amb BCS 100 µM. Les plaques es van desar en una càmera de cultiu durant 7 dies protegides de la llum. Les plàntules etiolades van ser recollides en foscor i es va efectuar l'assaig GUS. Aquestes plàntules reprodueixen el patró de tinció de les plàntules de setmanes ja que s'hi observa una tinció ràpida i intensa a l'arrel i,

posteriorment, de forma més tènue als hipocòtils i cotiledons (Figura R4.7H i I). A més, es torna a fer palés la tinció dels feixos conductors.

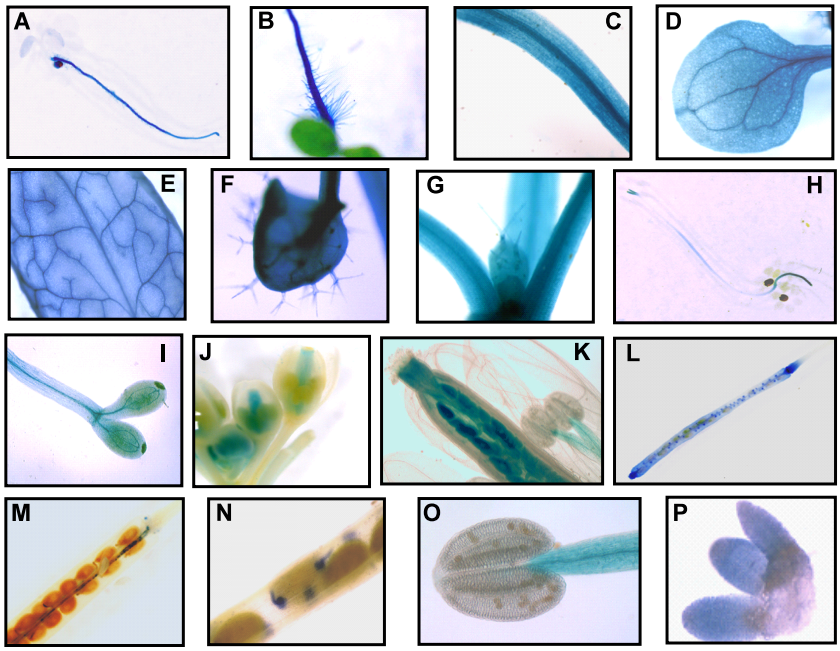


Figura R4.7: Patró d'expressió tissular de COPT5. Tinció β-glucuronidasa en òrgans de plantes *pCOPT5::GUS::NOS*: (A) visió general de plàntules de 7 dies i (B) detalls dels pèls radiculars, (C) de la tija, (D) cotiledons, (E-F) fulles vertaderes, (G) meristema apical caulinar i tricomes, (H i I) plàntules etiolades, (J i K) flors en pre i post-antesi, (L-N) síliqües, (O) estams i (P) embrió.

Pel que concerneix els òrgans reproductors de la planta, es va seleccionar flors i síliqües en diferents estadis de plantes de 30 dies crescudes en substrat. A nivell de flors, la tinció GUS apareix a la part femenina, tant als òvuls com als pistils de flors en preantesi i post-antesi (Figura R4.7J-K). Per altra banda, en síliqües joves el patró de tinció comprén el conducte que recorre transversalment la síliqua i els embrions

que alberga (Figura R4.7L). En estudiar síliqües més avançades, la tinció se centra en el feix vascular i els furuncles (Figura R4.7M i N). A la part masculina, destaca que els filaments de les anteres presenten tinció positiva, però no mai el gra de pol·len (Figura R4.7O). L'estudi de l'embrió es va fer a partir de llavors embegudes en la solució de reacció. En extraure'n l'embrió es va observar que aquest presentava un patró de tinció homogeni (Figura R4.7P).

Aquests resultats posen de manifest l'àmplia expressió de *COPT5* per tot el cos de la planta al llarg del cicle vital, excepte en el gra de pol·len. A més, es palesa la implicació de *COPT5* en els estadis inicials del desenvolupament i en els feixos conductors, fet que suggereix que COPT5 siga un transportador clau per a la distribució i translocació del Cu en la planta.

3.3. Regulació per coure de l'mRNA de *COPT5*

Els mRNA dels transportadors *COPT1* i *COPT2*, estan regulats negativament en presència de Cu (Sancenón et al. 2003; Yamasaki et al. 2009 i capítol 2). Nogensmenys, en el capítol 2 hem vist que els nivells de l'mRNA *COPT2* disminueixen en presència de Cu. L'anàlisi teòrica dels 357 nucleòtids del *pCOPT5* no revela la presència d'elements de regulació per Cu. Així i tot, amb la finalitat d'esbrinar si l'mRNA de *COPT5* està regulat per Cu, es va sembrar llavors de les línies silvestres en medis ½ MS suplementat amb sacarosa 1% i diferents concentracions de $CuSO_4$ o BCS 100 μM, tal i com es descriu a la Figura R4.8. Als 7 dies es va recollir una

primera remesa de plàntules i se'n va aïllar l'RNA total per retrotranscriure'l a cDNA. Aquest cDNA fou utilitzat com a motlle per analitzar per qPCR les taxes d'expressió de *COPT5* en funció del Cu exogen i constitueix el mateix material de partida que hem utilitzat per analitzar l'expressió de *COPT2* i *COPT6* en els capítols anteriors (Figura R1.4 i R3.7). Per altra banda, als 25 dies es va recollir una segona remesa de plàntules i es va repetir l'experiment. En tots els casos, els resultats obtesos es normalitzen amb els valors d'expressió del gen de l'ubiqüitina. En l'experiment fet amb plàntules de 7 dies explorem el rang de Cu que comporta dèficit (0-0.3 μM de $CuSO_4$) i el de suficiència (0.3-2 μM de $CuSO_4$). Independentment de la concentració de Cu exogen, els nivells d'expressió relativa de l'mRNA de *COPT5* no experimenten cap diferència significativa (Figura R4.8A). En plàntules de 25 dies, el comportament de *COPT5* en medis deficients (BCS 100 μM i 0 μM de $CuSO_4$), en condicions de suficiència (1 μM de $CuSO_4$) i excés (10 μM de $CuSO_4$) no implica cap tipus de regulació per Cu (Figura R4.8B).

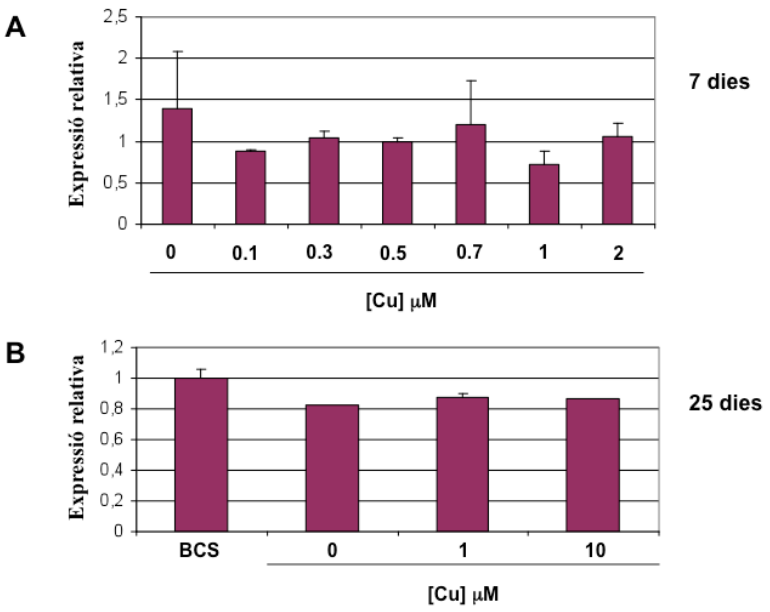


Figura R4.8: Anàlisi per qPCR de l'expressió de *COPT5* en medis amb diferent concentració de Cu. **A)** Expressió relativa de l'mRNA de *COPT5* en plàntules de 7 dies. L'RNA total de plàntules de 7 dies crescudes en condicions de dia intermedi i sota diferents concentracions de Cu segons s'indica a les figures va ser retrotranscrit a cDNA i quantificat per qPCR amb els encebadors específics per a *COPT5* (COPT5-qPCR-F i COPT5-qPCR-R) i normalitzat amb l'expressió del gen *UBQ10* (Materials i Mètodes; Taula M2). Les concentracions de Cu s'expressen en µM. **B)** Expressió relativa de l'mRNA de *COPT5* en plàntules de 25 dies. Es quantifica per qPCR els nivells d'mRNA de *COPT5* en plàntules crescudes amb diferents concentracions de Cu o de quelant BCS (100 µM). Les barres d'error indiquen l'error associat a la mitjana de tres experiments independents.

Amb l'objectiu d'estudiar l'expressió de l'mRNA de *COPT5* mitjançant una altra aproximació, en tant que disposem de la línia *pCOPT5::GUS::NOS*, es va estudiar si el Cu present al medi era capaç de modificar el patró d'expressió descrit a l'apartat anterior. En comparar la tinció de la β-glucuronidasa en plàntules de 7 dies crescudes en medis ½ MS suplementat amb sacarosa 1% i BCS 100 µM amb les plàntules crescudes en presència de Cu 1 µM no es va detectar cap variació, ni en la tinció, ni en el patró descrit prèviament (dades no mostrades).

En conclusió, els nivells d'mRNA de *COPT5* no experimenten cap tipus d'alteració significativa en funció del Cu present al medi de cultiu. Aquest fenomen no és exclusiu dels primers dies de creixement, ja que les plàntules de 25 dies d'edat mantenen el mateix patró de regulació. Tanmateix, la manca de regulació a nivell d'mRNA no exclou la possibilitat de què els sistemes de regulació actuen a nivell post-transcripcional. Aprofitant que disposem d'una línia *pCOPT::COPT5::GFP,* en què la quimera COPT5::GFP està dirigida pel promotor autòcton, es va decidir crèixer llavors en medis amb diferent concentració de Cu, amb l'objectiu d'esbrinar si existeix algun tipus de regulació post-transcripcional a través de la fluorescència de la GFP. En aquest cas, les llavors transgèniques es van sembrar en medis ½ MS suplementats amb sacarosa 1% i BCS 100 µM (dèficit de Cu), Cu 1 µM (suficiència) i 10 µM (excés). Mitjançant una lupa acoblada a un feix de llum ultraviolada, vam comprovar el senyal fluorescent a nivell de les arrels. En aquest cas, hi vam observar que la fluorescència associada a la GFP es mantenia en totes tres condicions, sense que es detectara cap patró diferencial. Per tant, concloem que la quimera COPT5::GFP, a més d'expressar-se independentment de la concentració de Cu present al medi, també es tradueix a proteïna. De la mateixa manera, en les plàntules sobreexpressores, els nivells de proteïna COPT5::HA es mantenen constants independentment del Cu exogen.

4. Obtenció i caracterització de línies amb insercions de T-DNA que afecten el gen *COPT5*

Amb la finalitat d'avaluar la participació del transportador COPT5 en el metabolisme general d'*A. thaliana*, es va cercar línies transgèniques amb insercions de T-DNA dins la seqüència codificant del gen *COPT5* en la base de dades del TAIR (www.arabidopsis.org) per tal d'obtenir mutants incapaços d'expressar el gen d'estudi. Es va adquirir les línies COPT5-2 (*SALK collection*, NASC ID: N593550) i COPT5-3 (*NASC collection*, NASC ID: N842717).

4.1. Obtenció de mutants per a *COPT5*

Tot i que a les bases de dades se'ns indica la posició relativa de les insercions de T-DNA, cal establir exactament a quin nivell es produeix la interrupció del gen. Per tal d'establir el lloc exacte d'inserció del T-DNA, es va dissenyar una primera ronda de PCR per amplificar els al·lels amb insercions, mitjançant els encebadors COPT5-LB i SALKdins, per a la línia COPT5-2; i COPT5-LB i SAIL-LB3-R, per a la línia COPT5-3 (Taula R4.1 i Materials i Mètodes). Les llavors de les dues línies de mutants van ser crescudes en test i se'n va extraure el gDNA a partir de fulles. La determinació exacta del lloc d'inserció es va establir mitjançant la seqüenciació de la banda de PCR corresponent a l'al·lel inserit amb l'al·lel SALKdins o SAIL-LB3-R (Materials i Mètodes; Taula M5). Atenent a la seqüenciació i el posterior aliniament de seqüència, els mutants COPT5-2 i COPT5-3 presenten la inserció de T-DNA a nivell del nucleòtid + 4 i + 8,

respectivament (considerant + 1 el primer nucleòtid de la seqüència codificant) (Figura R4.9A), de manera que ambdues línies esdevenen candidates per a mutants de pèrdua de funció.

Taula R4.1: Combinació d'encebadors per distingir els al·lels silvestres i inserits en els mutants *copt5* així com el tamany dels amplicons esperats (en pb)

Línia	Al·lel sílvestre	Tamany	Al·lel inserit	Tamany
COPT5-2	COPT5-LB COPT5-RB	1040 pb	COPT5-LB SALKdins	858 pb
COPT5-3	COPT5-LB COPT5-RB	1040 pb	COPT5-LB SAIL-LB3-R	862 pb

Amb la finalitat de destriar els individus homozigots per a cadascuna de les línies estudiades, es va dissenyar, a més de la combinació d'encebadors per a l'al·lel inserit indicada en l'apartat anterior, el parell COPT5-LB i COPT5-RB per distingir la variant silvestre (Taula R4.1). Com es mostra a la figura R4.9B, amb els individus silvestres tan sols som capaços d'amplificar l'al·lel inserit, mentre que en els mutants homozigots s'amplifica únicament les variants amb inserció. En aquest cas, se seleccionaren els individus homozigots per a la inserció per als futurs assaigs.

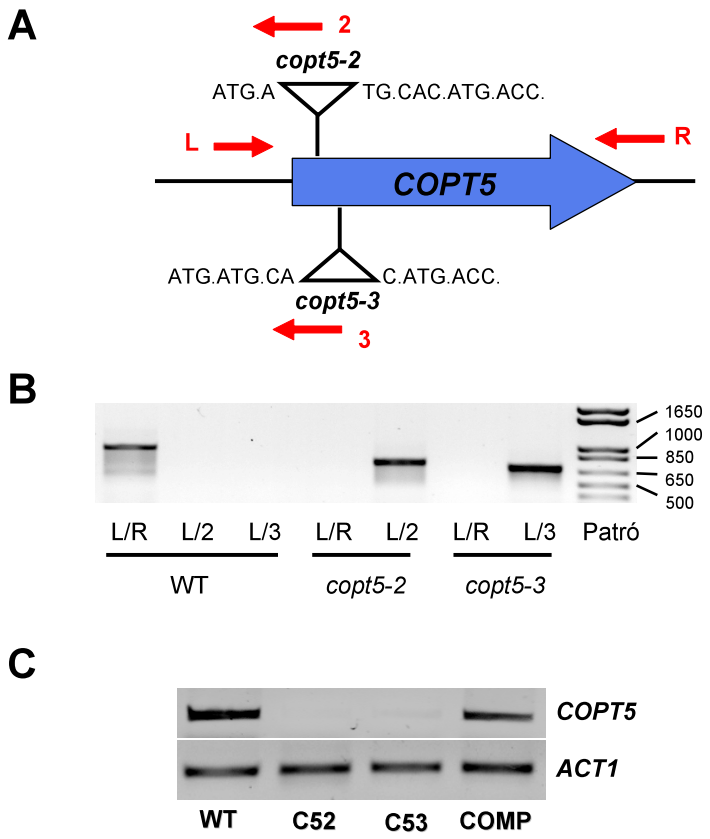


Figura 4.9: Anàlisi dels mutants amb insercions de T-DNA *copt5-2* i *copt5-3*. A) Esquema de la disposició del lloc exacte d'inserció del T-DNA (triangle invertit), les seqüències flanquejants en cadascuna de les dues línies mutants assajades i els encebadors emprats per genotipar els mutants: COPT5-RB (R), COPT5-LB (L), SALKdins (2) i SAIL-LB3-R (3) (fletxes roges). **B)** Genotipat de les línes mutants. Els productes de PCR, fruït de les combinacions d'encebadors proposades, a partir de gDNA dels mutants homozigots per a la inserció de T-DNA i plàntules silvestres, es migren en un gel d'electroforesi on el patró de tamanys s'expressa en parells de bases (pb). **C)** Manca d'expressió de *COPT5* en els mutants *copt5*.Productes de sqPCR per a *COPT5* de plàntules de 7 dies de les línies silvestre (WT), *copt5-2* (C52), *copt5-3*(C53) i mutant *copt5-2* complementat (COMP), crescudes en medi ½ MS comercial suplementat amb sacarosa 1%. El gen *ACT1* s'utilitza com a control de càrrega.

Amb l'objectiu de comprovar com la inserció de T-DNA afecta l'expressió del gen *COPT5*, es va aïllar l'RNA total de plàntules silvestres i de les línies homozigotes per a la inserció de T-DNA: COPT5-2 i COPT5-3,

crescudes en medi ½ MS comercial, suplementat amb sacarosa 1% (*Sigma*) durant 7 dies. L'RNA total fou retrotranscrit a cDNA amb la finalitat de ser analitzat per sqPCR, sota condicions no saturants, per al gen *COPT5*. Les quantitats obteses es van comparar en base a l'amplificació del gen de l'actina. Segons aqueix experiment, les línies mutants COPT5-2 i COPT5-3 són incapaces d'expressar el gen *COPT5*. Considerant que el T-DNA inserit a les línies COPT5-2 i COPT5-3 interromp la seqüència codificant i que aquestes línies no expressen *COPT5* concloem que es tracta de dos mutants de pèrdua de funció (a partir d'ara *copt5-2* i *copt5-3*) (Figura R4.9C). Addicionalment, el mutant *copt5-2* fou crescut en test i transformat amb la construcció *pCOPT5::COPT5* (Materials i Mètodes ; apartat 2.3.4), per tal d'obtenir un mutant complementat que revertira l'expressió de *COPT5* (Figura R4.9).

4.2. Caracterització dels mutants de pèrdua de funció per a *copt5*

4.2.1. Anàlisi fenotípica en medis deficients en coure

Amb l'objectiu d'analitzar com afecta al conjunt de la planta la impossibilitat d'expressar *COPT5*, es va crèixer les línies: mutants *copt5-2* i *copt5-3*, silvestre i mutant complementat, en substrat durant 30 dies. De la mateixa manera, les mateixes línies van ser sembrades en medi ½ MS suplementat amb sacarosa i diferents concentracions de Cu. En primer lloc, fem palés que les línies mutants crescudes en substrat no s'hi aprecia cap tipus d'anomalia visible durant el creixement i no tenen problemes per tancar el cicle vital. Tampoc s'observaren alteracions en plantes crescudes

en cultiu hidropònic. Pel que concerneix les plàntules de 7 dies, els mutants *copt5* crescuts sota condicions de suficiència o excés de Cu (½ MS + Cu 1 µM o ½ MS + Cu 10 µM) no manifesten cap fenotip en comparació a la línia silvestre o complementada (Figura R4.10). Ara bé, en les plàntules de les línies mutants crescudes en medis ½ MS amb sacarosa 1% s'hi aprecia una lleugera reducció en la longitud de l'arrel principal. Per tal de testar si la reducció en les arrels dels mutants *copt5* està relacionada amb el dèficit de Cu, es va repetir l'experiment en medis on introduïem diferents concentracions del quelant de Cu extracel·lular BCS. En aquest cas, s'hi observa una progressiva reducció de la longitud de l'arrel principal a mesura que augmentem la concentració de quelant en el medi (Figura R4.10). Sota les condicions més dràstiques que hem assajat (½ MS + BCS 100 µM + sacarosa 1%), la reducció observada és aproximadament del 75% respecte de la línia silvestre (Figura R4.10).

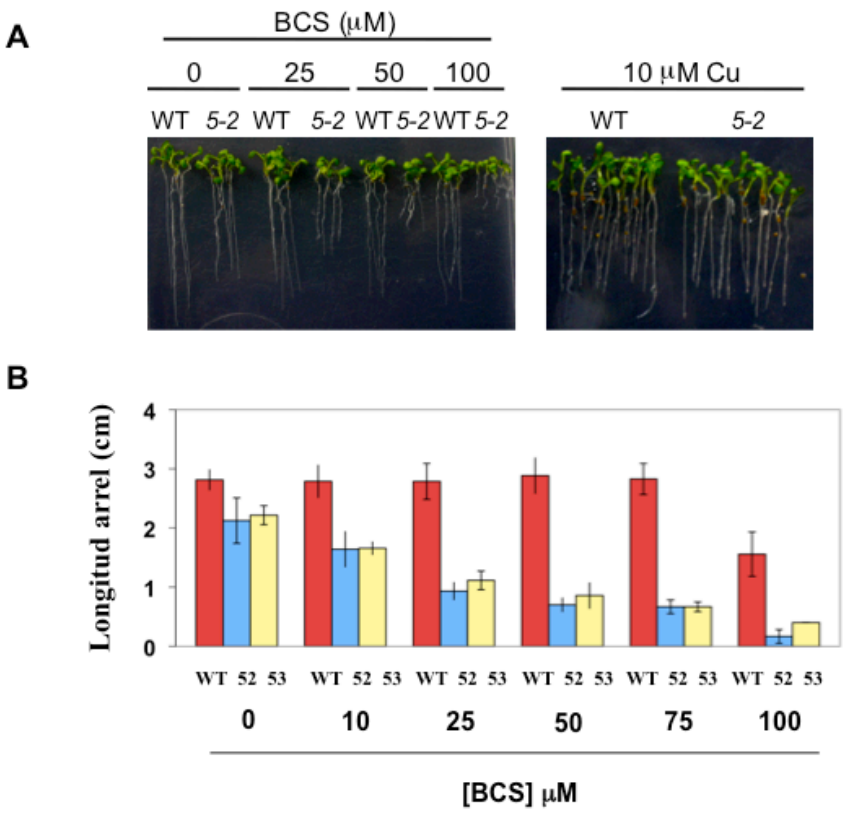


Figura R4.10: **Inhibició del creixement de l'arrel principal en els mutants *copt5*. A)** Creixement en vertical de plàntules silvestres (WT) i *copt5-2* (52) durant 7 dies en medis ½ MS suplementats amb sacarosa 1% i diferents concentracions de BCS o Cu indicades. **B)** Representació de les dades provinents de les mesures de la longitud de l'arrel principal de plàntules silvestres (WT), *copt5-2* (52) i *copt5-3* (53) de 3 experiments independents amb la desviació estàndard associada a la mitjana.

Paral·lelament, vam dur a terme el mateix experiment per tal d'avaluar si l'esmentada resposta al dèficit de Cu s'exacerbava al llarg del temps. Després de 25 dies, les plàntules de les línies *copt5* exhibien una major inhibició del creixement de l'arrel principal i una disminució del tamany, fet que es tradueix en una reducció de pes fresc (Figura R4.11). En concret, ambdós mutants manifesten una pèrdua de vora el 50% del pes fresc

respecte de la línia silvestre en condicions de dèficit extrem, fet que implica una major sensibilitat dels mutants *copt5* al dèficit de Cu. Per contra, en condicions de suficiència (½ MS + Cu 1 µM + sacarosa 1%) no s'hi aprecien diferències fenotípiques en pes fresc (Figura R4.11). En tots els casos, la línia mutant *copt5-2* complementada amb el gen *COPT5*, restablia el fenotip de la línia silvestre.

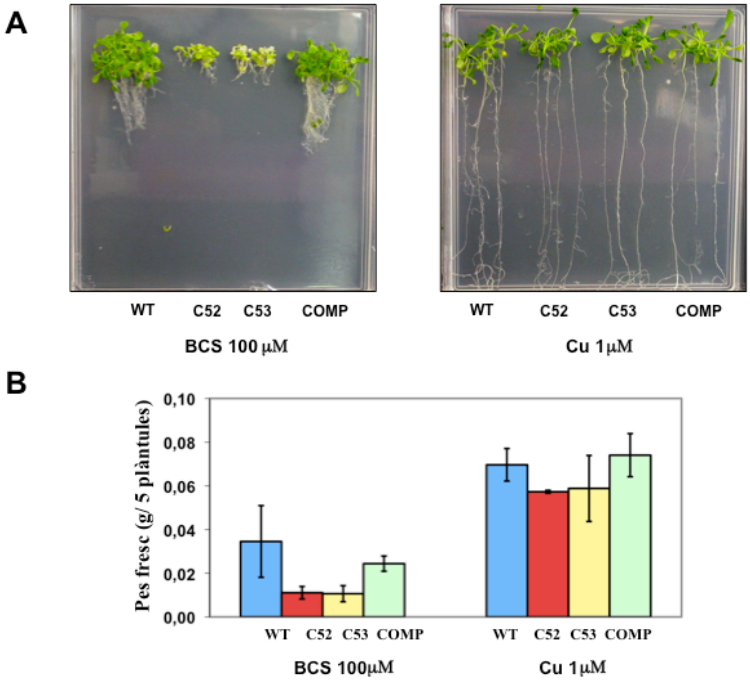


Figura R4.11: **Caracterització del fenotip de *copt5* crescudes en placa durant llargs períodes A)** Fenotip de les quatre línies: silvestres (WT), mutants *copt5* (C52 i C53) i mutant complementat (COMP) crescudes en vertical durant 25 dies en medis ½ MS suplementats amb sacarosa 1% i Cu (1 µM) o BCS (100 µM). **B)** Mesura del pes fresc a partir del pes de 5 plàntules de cadascuna de les línies adès considerades. Les barres d'error corresponen a la desviació estàndard de les mitjanes de 3 experiments biològicament independents.

Per tal d'assegurar-nos que els fenotips que hem descrit són conseqüència del dèficit de Cu^+ causat pel quelant BCS, es va procedir a fer

un assaig de competència amb diferents metalls. El medi ½ MS suplementat amb sacarosa 1% i BCS 50 µM va ser enriquit amb 30 µM de sals de diferents metalls. Sobre aquests medis, es va sembrar la línia silvestre junt amb les dues línies *copt5* i, en assolir el seté dia de creixement, es va efectuar la mesura de la longitud de l'arrel principal. El BCS competeix pel Cu^+ amb els sistemes de transport de la planta, de manera que, malgrat l'efecte quelant, l'excés de Cu que hem aportat garanteix el metall per a la planta i evita la inhibició del creixement de la longitud de l'arrel principal en les línies mutants (Figura R4.12). La plata (Ag), metall isoelèctric al Cu^+, competeix amb el Cu^+ pel BCS, de forma que l'excés de Ag^+ és quelat pel BCS i la planta pot disposar del Cu^+ (Figura R4.12). Per tant, s'evidencia que l'especificitat del fenotip del mutant *copt5* és deu a l'estat nutricional de dèficit de Cu causat pel quelant BCS.

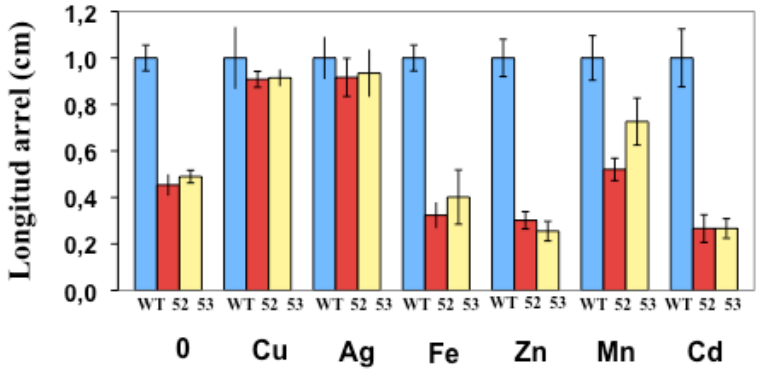


Figura R4.12: **Especificitat del Cu^+ en el fenotip dels mutants *copt5*.** Les línies silvestre i mutants *copt5-2* i *copt5-3* (52 i 53) van ser crescudes durant 7 dies en medis ½ MS amb BCS 50 µM i sacarosa 1% suplementat amb sals de diferents metalls (30 µM): medi control sense afegir-hi metalls (0), Cu, Ag, Fe, Zn, Mn i Cd. Les mesures de l'arrel principal es van fer per triplicat i se'n mostren les barres d'error corresponents a la desviació estàndard associada a la mitjana i es van relativitzar al valor màxim de cada tractament.

Amb l'objectiu de discernir si la inhibició de la longitud de les arrels era conseqüència d'haver germinat les llavors directament sobre medis extremadament deficients en Cu o si es tractava d'un defecte que concerneix el creixement de la plàntula, es va fer un nou assaig de sensibilitat al dèficit de Cu (Materials i Mètodes ; apartat 4.3.1). En aquest cas es va sembrar llavors de les línies *copt5-2*, *copt5-3*, mutant complementat i silvestre en medis ½ MS amb sacarosa 1% i Cu 2.5 µM, i es van crèixer durant 6 dies. A continuació, es van transferir a medis ½ MS amb sacarosa 1% i BCS 40 µM o Cu 2.5 µM. Després de 7 dies es va mesurar la longitud de l'arrel principal a partir del punt de transferència (línia puntejada en Figura R4.13). Tant les plàntules de la línia silvestre com les de la línia complementada no mostren diferències en la longitud de les arrels en els dos medis assajats. Ara bé, en el cas de les plàntules mutants, mentre que en les condicions de suficiència no s'hi observa cap diferència de creixement, en els medis deficients presentaven una reducció de vora el 50% en la longitud de l'arrel respecte de les línies silvestre i complementada (Figura R4.13).

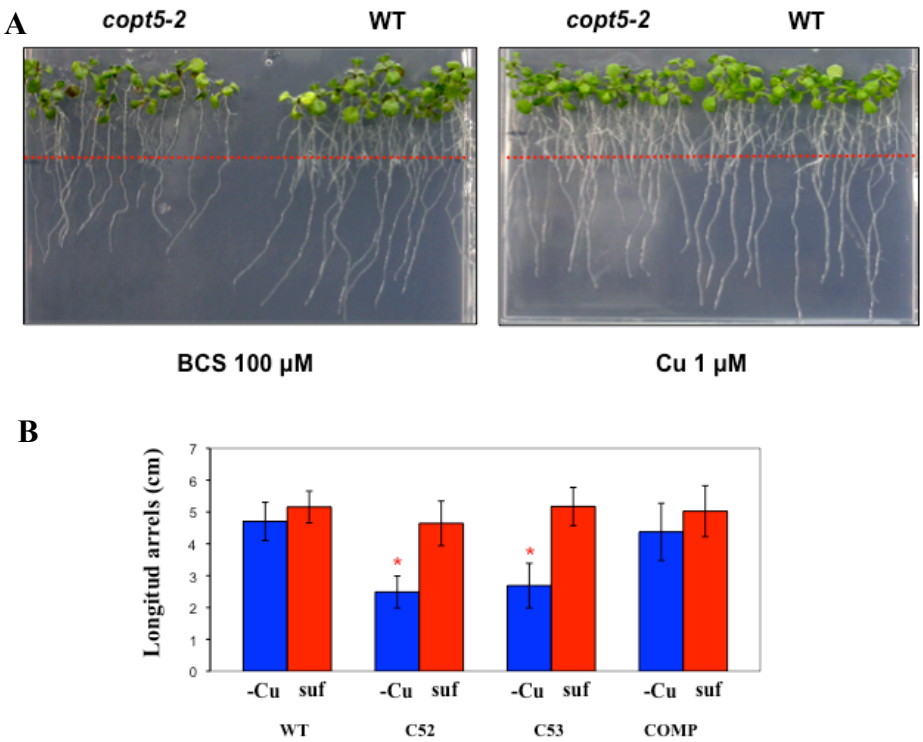


Figura R4.13: Experiment de sensibilitat al dèficit de Cu dels mutants *copt5*. A) Creixement de les arrels de plàntules silvestres (WT) i mutants *copt5-2* crescudes durant 6 dies en medi ½ MS suplementat amb sacarosa 1% i Cu 2.5 µM i transferides a medis amb deficiència (BCS 50 µM) o suficiència (Cu 2.5 µM) en Cu. La línia discontínua indica el punt de referència de la mesura. **B)** Representació de la longitud diferencial assolida en l'experiment A) per part de les línies silvestres (WT), mutants *copt5-2* (C52) i *copt5-3* (C53) i mutant complementat (COMP) en medis amb deficiència (-Cu, BCS 50 µM; barres blaves) o suficiència de Cu (suf, Cu 2.5 µM; barres roges). Les barres d'error corresponen a la desviació estàndard associada a les mitjanes d'almenys 3 experiments independents i els asteriscs les diferències estadísticament significatives amb un $p<0.005$.

Per tal d'escometre si l'acurtament de les arrels dels mutants *copt5* en condicions de dèficit de Cu es deu a la pèrdua de viabilitat de les cèl·lules de l'arrel, es va efectuar un experiment de viabilitat a partir de plàntules silvestres i *copt5-2* de 7 dies crescudes en medis ½ MS suplementat amb sacarosa 1% i BCS 100 µM. La pèrdua de viabilitat es pot monitoritzar

mitjançant l'increment en la lignificació, de manera que les cèl·lules lignificades es tinyen amb iodur de propidi i incrementen l'emissió de fluorescència respecte de les cèl·lules viables (Materials i Mètodes; apartat 4.3.1). En observar les arrels tenyides sota un microscopi confocal, no vam ser capaços de distingir cap diferència entre les línies silvestres i les mutants (Figura R4.14). Per tant, concloem que l'acurtament que experimenten les arrels dels mutants no es conseqüència d'un increment de la mort cel·lular.

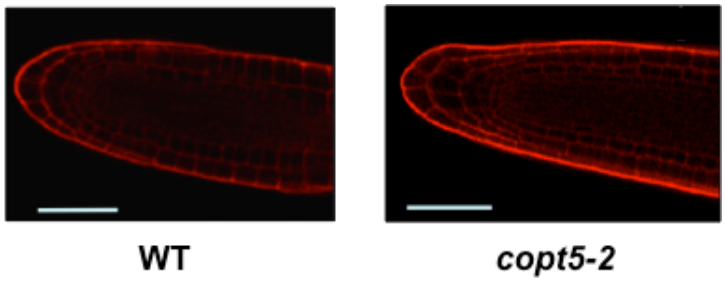


Figura R4.14: Estudi de la viabilitat de les cèl·lules de l'arrel principal dels mutants *copt5-2*. Plàntules de la línia silvestre i mutant *copt5-2* de 7 dies, crescudes en medis ½ MS amb BCS 100 µM i sacarosa 1%, van ser tenyides amb una solució de iodur de propidi i observades al microscopi confocal per tal d'establir els dipòsits de lignificació. En ambdues figures s'indica amb una franja l'escala equivalent a 50 µm.

Amb la finalitat d'escrutar si la manca de Cu altera el creixement dels mutants *copt5* en condicions d'etiolació, llavors de les línies silvestres, *copt5-2* i mutant complementat es van estratificar durant dos dies en medis ½ MS sense sacarosa, suplementats amb Cu 1 µM o BCS 100 µM, i es van fer crèixer protegides de la llum durant 6 dies en condicions de fotoperíode intermedi. Transcorregut aquest temps, es va mesurar la longitud de l'hipocòtil. Les plàntules etiolades de la línia silvestre i del mutant complementat no exhibien diferències en la longitud dels hipocòtils, independentment del medi on havien crescut. Nogensmenys, les plàntules

etiolades de la línia *copt5-2* presentaven una reducció de vora el 35% en la longitud de l'hipocòtil (Figura R4.15).

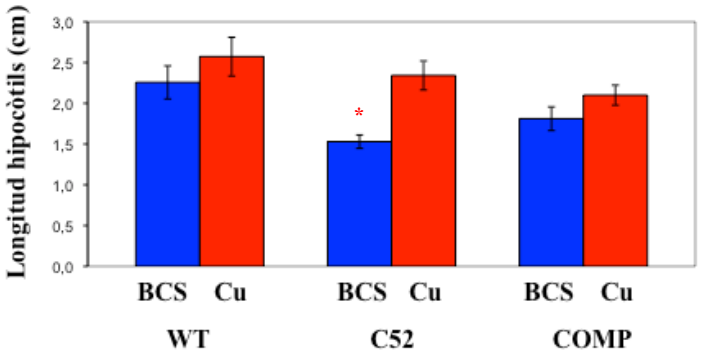


Figura R4.15: **Mesura de la longitud dels hipocòtils en el mutants *copt5***. Llavors de les línies mutants silvestres (WT), mutant *copt5-2* (C52) i mutant complementat foren sembrades en medi ½ MS sense sacarosa i suplementat amb BCS 100 µM (BCS, barres blaves) o Cu 1 µM (Cu, barres roges) i estratificades durant 2 dies a 4 ºC. Es desaren, protegides de la llum, en cambres de cultiu sota un fotoperíode de dia curt amb cicles de temperatura i al cap de 6 dies es va mesurar la longitud dels hipocòtils. Les barres d'error s'associen a la desviació estàndard de la mitjana de més de 6 plàntules, i els asterisc es les diferències estadísticament significatives amb un $p<0.005$.

Tot plegat, d'aquesta remesa d'experiments es conclou que els fenotips dels mutants *copt5* relacionats amb al creixement ocorren com a conseqüència d'un dèficit de Cu.

4.2.2. Determinació del contingut en coure endogen dels mutants

Per tal de caracteritzar en més detall el comportament dels mutants *copt5,* es va determinar el contingut en Cu endogen. Per a aquest propòsit, es va crèixer llavors de les línies silvestre i mutants *copt5-2* i *copt5-3* en medis ½ MS suplementat amb sacarosa i BCS 100 µM o Cu 1 µM. Es va

recollir una remesa de plàntules de 7 dies i una altra de 25 dies. El material va ser secat en un forn i digerit amb àcid nítric per fer la mesura de Cu total per absorció atòmica (Materials i Mètodes; apartat 4.3.5). La determinació de Cu endogen que hem efectuat mostra que no existeixen diferències significatives entre les plàntules silvestres i mutants crescudes en medis deficients o suficients en Cu (BCS 100 µM o Cu 1 µM, respectivament; Figura R4.16). Independentment de si hem utilitzat plàntules de 7 o 25 dies, els valors obtesos no impliquen diferències significatives entre les línies silvestre i mutants *copt5* per a les condicions assajades. El fet que els mutants *copt5* no mostren variacions en el contingut de Cu es consistent amb la hipòtesi de què el transportador COPT5 actua a nivell intracel·lular mobilitzant el Cu i que no s'encarrega d'incorporar-lo del medi exterior.

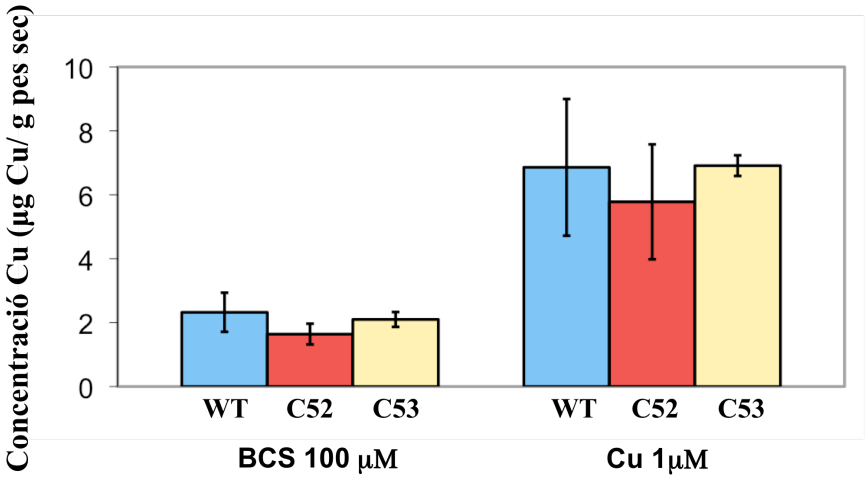


Figura R4.16: **Contingut de Cu endogen dels mutants *copt5*.** Plàntules de 25 dies de les línies silvestre (WT) i mutants *copt5-2* i *copt5-3* (C52 i C53) crescudes en medis ½ MS + BCS 100 µM o Cu 1 µM suplementades amb sacarosa 1%, foren llavades i secades per mesurar el Cu endogen per absorció atòmica en càmera de grafit. Les barres d'error indiquen la desviació estàndard de la mitjana de 3 experiments independents.

4.2.3. Mesura del contingut en clorofil·les

En complir els 25 dies, els mutants *copt5* crescuts en medis deficients en Cu (BCS 100 μM) mostren, junt amb la reducció de la longitud de l'arrel principal i la pèrdua de pes fresc que hem descrit anteriorment, un avançat estat de clorosi (Figura R4.11). Amb la finalitat de quantificar aqueixa observació, vam extraure i mesurar el contingut en clorofil·les d'aquestes plàntules en base al mètode tricoloromètric (Materials i Mètodes; apartat 4.3.1). Mentre que les línies silvestres i els mutants complementats crescuts sota condicions deficients de Cu presenten el mateix contingut en clorofil·les que les mateixes plàntules crescudes en condicions de suficiència de Cu (1 μM), les plàntules mutants exhibeixen una reducció de vora el 50% en el contingut de clorofil·les respecte de la condició de suficiència, i de les línies silvestres i complementades (Figura R4.17). Tanmateix, la relació entre la clorofil·la a i b roman constant per a tots els casos (Figura R4.17)

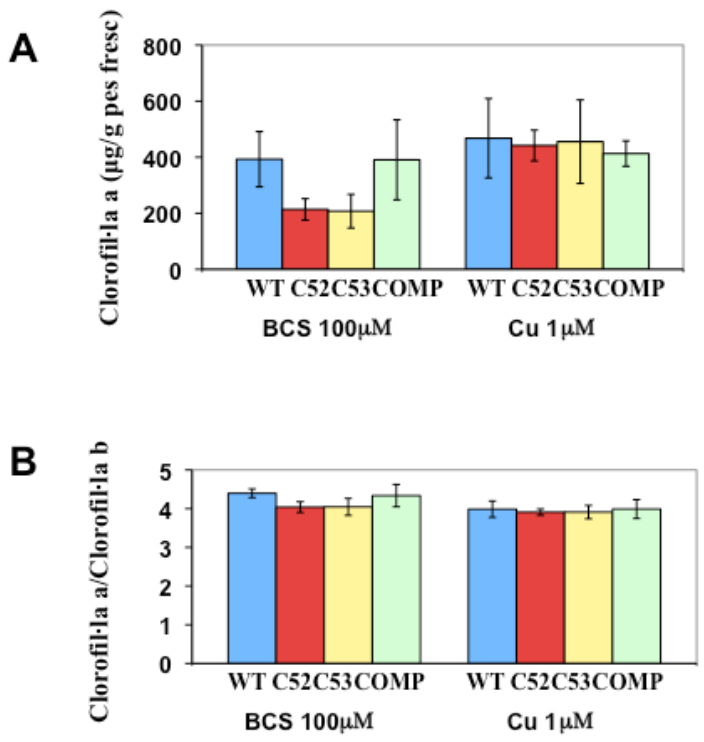


Figura R4.17: Mesura del contingut en clorofil·la. A) Contingut en clorofil·la a (µg/g pes fresc) de plàntules de 25 dies de les 4 línies assajades, crescudes en dia intermedi (12L/12D) en medis ½ MS suplementat amb sacarosa 1% i BCS 100 µM o Cu 1 µM. **B)** Relació entre el contingut de clorofil·la a i clorofil·la b. Les barres d'error corresponen a l'error estàndard associat a les mitjanes de 3 experiments independents.

4.2.4. Estudi del transport d'electrons en la cadena fotosintètica

Fins al moment, hem demostrat que els mutants *copt5* es caracteritzen per mostar hipersensibilitat al dèficit sever de Cu (BCS 100 µM). Com a conseqüència de la hipersensibilitat manifesta, un dels fenotips que exhibeixen els mutants és una reducció del 50% del contingut de clorofil·les en assolir 25 dies. En base a aquest fenotip vam escometre la mesura de paràmetres relacionats amb la fluorescència de la clorofil·la en plàntules de

25 dies de les línies silvestre, *copt5-2* i mutant complementat, crescudes en condicions de dèficit sever de Cu (½ MS suplementat amb sacarosa 1% i BCS 100 μM) amb la finalitat d'abordar possibles defectes en el funcionament de l'aparell fotosintètic. Les mesures de la fluorescència de les clorofil·les s'efectuen un cop les plàntules han sigut adaptades a condicions de foscor. En aquest punt, s'efectua un pols amb llum actínica saturant que permeten obtenir la fluorescència màxima (Fm'), mínima (Fo') i estacionària (Ft). Tot seguit, es duu a terme una cinètica de 15 minuts en què a cada minut s'efectua un pols amb una radiació fotosintèticament activa (PAR) de 120-125 μmols fotons/m^2·s per fer un seguiment dels tres paràmetres anteriors al llarg del temps. En base als valors determinats, es poden calcular tota una sèrie de paràmetres relacionats amb l'activitat fotosintètica de les mostres (Materials i Mètodes; apartat 4.3.3).

El rendiment màxim del PSII (Fv/Fm) és un paràmetre que estima la fracció de la llum incident que arriba al PSII respecte del total. En els medis que representen l'estat nutricional de suficiència de Cu la línia silvestre, *copt5-2* i el mutant complementat assoleixen valors similars entre ells, sense que s'hi aprecie cap variació en aquest paràmetre (Figura R4.18). En canvi, en els medis deficients en Cu, s'observa una disminució en comparació als valors obtesos en medis suficients, en totes les línies. Mentre que en la línia silvestre i en el mutant complementat aquesta disminució és de vora el 25%, en el mutant *copt5-2* el decreixement d'aquest paràmetre és del 75% (Figura R4.18).

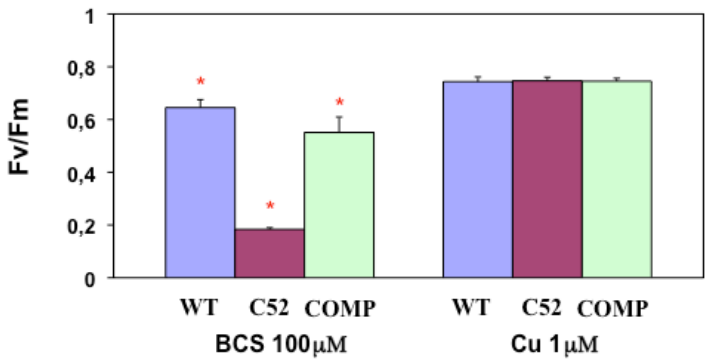


Figura R4.18: Determinació del paràmetre de Fv/Fm. Relació Fv/Fm per a les línies silvestre (WT), copt5-2 (C52) i mutant complementat (COMP) en medi ½ MS suplementat amb sacarosa 1% i BCS 100 μM i Cu 1 μM. Els errors indiquen la desviació estàndard d'almenys tres rèpliques biològiques i els asteriscs les diferències significatives per a $p<0.005$.

Addicionalment, es va calcular el rendiment màxim del PSII (Y_{PSII}), el qual és un sensor de l'estrés que sofreix el PSII i ens indica quina fracció dels fotons que arriben al centre de reacció del PSII són fotoconvertits. En els medis que comporten la condició de suficiència de Cu, en totes 3 línies assajades assolia un valor estàndard ($Y_{PSII} \approx 0.6$), mentre que en condicions de dèficit sever de Cu en la línia silvestre i el mutant complementat, aquest paràmetre minva entre un 30-40%, i en el Y_{PSII} del mutant *copt5-2* és pràcticament nul. El producte del Y_{PSII} pel PAR de cada mesura ens permet obtindre un paràmetre proporcional al Y_{PSII} que estima el flux d'electrons (ETR) a través del PSII. A partir dels valors obtesos en les cinètiques a temps 15 min, es va calcular l'ETR de cada mostra i es va relativitzar el valor màxim al 100%. En els medis suplementats amb Cu 1 μM, totes tres línies presenten entre un 90 i un 100% de flux electrònic a través del PSII. En canvi, en suplementar el medi amb BCS 100 μM, en les línies silvestre i

mutant complementat aquest paràmetre minva fins a un 30-40%, i en el mutant *copt5-2* és inferior al 10% (Figura R4.19). Conseqüentment, en base al descens observat en els valors de Fv/Fm i del Y_{PSII} i ETR en dèficit sever de Cu podem extraure dues conclusions. En primer lloc, el Cu és necessari per a mantenir l'estructura i garantir el correcte funcionament del PSII i; en segon lloc, la manca d'expressió de *COPT5* exacerba l'estrés i la desestructuració del PSII, així com la reducció del flux d'electrons a través del PSII sota condicions de dèficit sever de Cu.

A partir dels valors de fluorescència obtesos també podem calcular l'estat d'oxidació de la quinona A (Q_A) associada al PSII, qP. La Q_A és una proteïna que rep els electrons del centre de reacció del PSII i, a continuació s'oxida ràpidament per iniciar la cadena de transport d'electrons associada a la fotosíntesi. La definició de qP fa que els valors que tendeixen a 0 representen formes majoritàriament reduïdes i, per contra, els valors que tendeixen a 1, indiquen formes majoritàriament oxidades. Per a les variants silvestres, s'ha documentat que a mesura que el PAR augmenta, el paràmetre qP sofreix un ràpid increment cap a valors de la unitat. Els valors de qP obtesos a temps 15 min per a les línies silvestre, *copt5-2* i mutant complementat, en condicions de suficiència de Cu, indiquen que la Q_A es troba completament, oxidada (qP≈ 0.99). En el medis deficients en Cu, les plàntules silvestres i el mutant complementat també presenten valors de qP que tendeixen a formes plenament oxidades. Nogensmenys, el mutant *copt5-2* es caracteritza per mostrar un estat de la Q_A majoritàriament reduïda (qP≈ 0.2) (Figura R4.19). Convé destacar que els paràmetres calculats per a la línia silvestre crescuda en plaques amb medis suficients en Cu es

correlacionen amb les dades obteses prèviament amb plantes adultes crescudes en tests a un PAR similar. Aquest fet valida el sistema i les condicions de creixement del material biològic utilitzat.

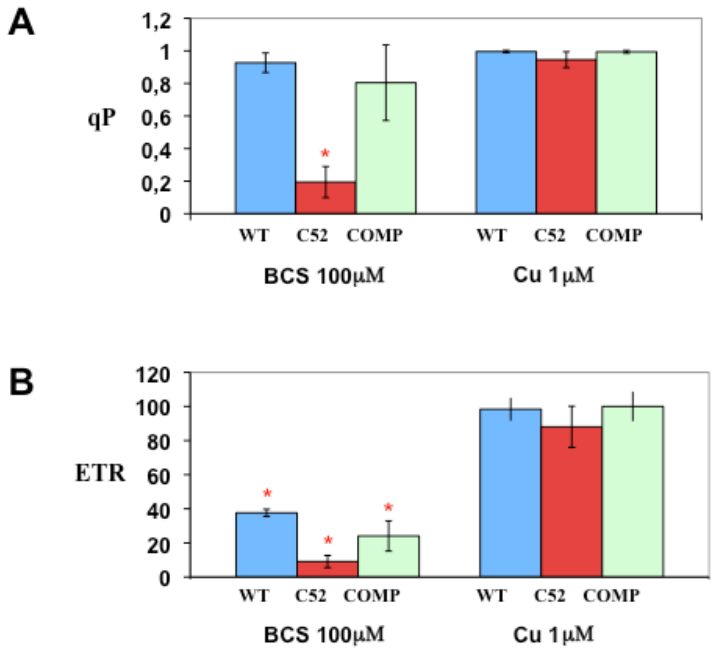


Figura R4.19: **Representació dels valors qP i ETR.** Estat oxidatiu de la Q_A associada al PSII (qP) (panell A) i ETR (panell B) en plàntules de les línies silvestre (WT), mutant *copt5-2* (C52) i mutant complementat (COMP) crescudes durant 25 dies en medis ½ MS suplementat amb sacarosa 1% i BCS 100 µM o Cu 1 µM a temps 15 minuts. Els errors representen la desviació estàndard d'almenys 3 experiments independents i els asteriscs les diferències estadísiticament significatives amb un $p<0.005$.

Tot plegat, els experiments de fluorescència ens suggereixen que els mutants *copt5-2* crescuts en condicions de dèficit extrem de Cu manifesten tota una sèrie de desajusts pel que fa a la funcionalitat del PSII. Concretament, hem descrit un descens en la taxa de transport d'electrons a través del PSII i una alteració en l'estat oxidatiu de la Q_A. El fet que la Q_A

estiga en forma reduïda implica que el mutant *copt5-2* no pot mantindre el flux d'electrons de la cadena fotosintètica.

Malauradament, el fet que els mutants *copt5* tan sols presenten fenotips en condicions *in vitro* en dèficit sever de Cu ens limita a l'hora d'escometre l'aïllament de cloroplasts per mesurar el Cu endogen. Tanmateix, vam procedir a quantificar el Cu acumulat en cloroplasts aïllats de fulles de plàntules crescudes en test. Amb aquesta finalitat, un extracte fresc de fulles de plantes de 30 dies crescudes en substrat va ser fraccionat en gradient de Percoll. La fase corresponent als cloroplasts fou recuperada i concentrada per mesurar el contingut de Cu endogen per absorció atòmica (Materials i Mètodes; apartat 4.3.4). Sota aquestes condicions, la concentració de Cu en els orgànuls purificats del mutant *copt5-2* no difereix significativament dels valors obtesos per al silvestre (Figura R4.20).

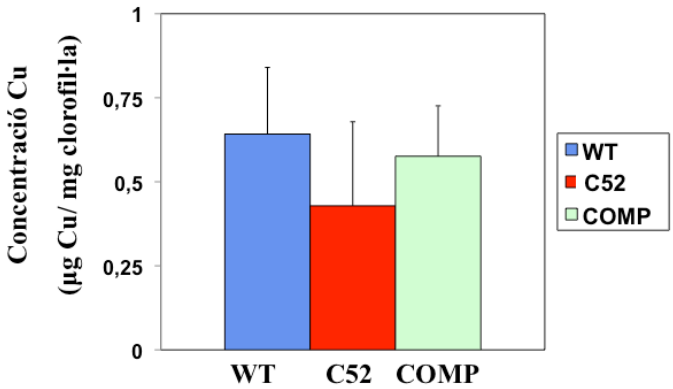


Figura R4.20: Contingut de Cu endogen en cloroplasts. Cu endogen en fraccions enriquides en cloroplasts de fulles de plantes silvestres (WT), mutant *copt5-2* (C52) i mutant complementat (COMP) crescudes en tests. Les barres d'error corresponen a la desviació estàndard de la mitjana de 3 rèpliques tècniques d'un experiment representatiu.

4.2.5. Avaluació de processos dependents de coure

Amb la finalitat d'estudiar processos dependents de Cu en els mutants *copt5* crescuts sota condicions de dèficit sever de Cu, es va decidir avaluar, l'activitat CAT, l'activitat APX i el patró de lignificació. Les activitats CAT i APX són components de la barrera antioxidant de tipus enzimàtic de la cèl·lula que participen en l'eliminació de les ROS que s'hi produeixen. En aquest cas, la mesura de les activitats enzimàtiques no mostrava diferències significatives entre les línies assajades en cap de les condicions.

Figura R4.21: Patró de lignificació de la línia silvestre i *copt5*. Tinció amb de plàntules de la línia silvestre (WT) i *copt5-2* de 25 dies crescudes en medi ½ MS suplementat amb sacarosa 1% i BCS 100 µM. Els patrons de lignificació mostrats són representatius de diferents experiments.

Per altra banda, en les plantes la lignificació és un procés que es dóna preferencialment a la paret cel·lular, en les cèl·lules que perden viabilitat i a nivell dels vasos conductors, més concretament al xilema. La lignificació es pot observar de forma qualitativa a partir de la tinció de les plàntules amb una solució de fluoroglucinol saturada amb àcid clorhídric. El patró de

lignificació en els mutants crescuts durant 7 o 25 dies en medis ½ MS suplementats amb sacarosa i Cu 1 μM no difereix de la que presenta la línia silvestre i complementada. Ara bé, en plàntules de 25 dies crescudes condicions de dèficit extrem de Cu (½ MS suplementat amb sacarosa 1% i BCS 100 μM) la lignificació observada varia respecte de la que hem determinat per a la línia silvestre i complementada. En les plàntules silvestres la lignificació es limita discretament als vasos conductors de l'arrel i de la part aèria (Figura R4.21). Aquest patró és idèntic a l'observat en plàntules crescudes en medis suficients en Cu. En canvi, el mutant *copt5-2* presenta una increment en la lignificació a nivell de les arrels, en els feixos conductors de la part aèria i a les nervadures dels cotiledons (Figura R4.21). Per tant, tot i tractar-se d'un assaig de tipus qualitatiu i malgrat les diferències fenotípiques existents entre el mutant i la línia silvestre, d'aquest experiment es desprén que el mutant *copt5* sofreix un increment en la lignificació en condicions de dèficit extrem de Cu.

DISCUSSIÓ

En el present capítol, hem caracteritzat el transportador COPT5 com el primer membre de la família COPT d'ubicació intracel·lular. La proteïna de fusió COPT5::GFP complementa parcialment la soca de llevat *ctr1Δctr3Δ,* de la mateixa manera que COPT5, i es localitza majoritàriament a algun compartiment citosòlic del llevat (Figura R4.4B). Per tant, la complementació parcial de COPT5 s'explicaria en base a què part de la proteïna deu deslocalitzar-se envers la membrana plasmàtica del llevat.

COPT5 ha sigut identificat com una proteïna del tonoplast en un intent d'establir el proteoma de la membrana del vacuol en cultius cel·lulars d'*A. thaliana* (Jaquinod et al. 2007). Les estratègies bioquímiques i cel·lulars que hem dut a terme demostren que COPT5 és una proteïna de distribució intracel·lular. Ara bé, el fraccionament en gradient de sacarosa indica que COPT5::HA es distribueix al PVC i/o al vacuol (Figura R4.3), mentre que la localització subcel·lular de COPT5::GFP en protoplasts d'*A. thaliana* mostra un puntejat que colocalitza amb el marcador de PVC, $p24^{mut1}$::RFP (Figura R4.5). Atesa la localització intracel·lular de COPT5 i la topologia dels transportadors CTR, es postula que COPT5 estiga involucrat en la mobilització del Cu emmagatzemat en reservoris intracel·lulars, de la mateixa manera que ho fan Ctr2 i Ctr6 de *S. cerevisiae* i *S. pombe* (Bellemare et al. 2002; Rees et al. 2004). A més, la ubiqüitat del patró d'expressió tissular de *COPT5* suggereix que aquest transportador puga estar involucrat en la mobilització del micronutrient. De fet, la tinció histoquímica en plantes transgèniques *pCOPT5::GUS::NOS* revela que

COPT5 és un gen altament expressat a nivell d'arrels, on es concentra la major part del Cu de la planta, i especificament, a la proximitat dels feixos vasculars, des d'on facilitaria la mobilització i distribució del Cu quan ho requerira la planta (Figura R4.7).

Per tal d'aprofundir en la caracterització de la funció de COPT5 es va obtindre dues línies mutants per inserció de T-DNA incapaces d'expressar *COPT5*: *copt5-2* i *copt5-3* (Figura R4.9). Mentre que el mutant *copt1* antisentit exhibeix una reducció del 50% del Cu endogen en fulles, els mutants *copt5* no mostren diferències significatives en els nivells de Cu respecte de la línia sílvestre, tant en condicions de dèficit sever de Cu com en suficiència del metall (Figura R4.16). Aquests resultats suggereixen que COPT5 participe més aviat en la mobilització del Cu intracel·lular que no pas en el procés d'adquisició del metall. Per altra banda, els mutants *copt5* no mostren cap fenotip en crèixer en substrat o en plaques amb medis suficients o amb excés de Cu. Ara bé, els mutants *copt5* exhibeixen alta sensibilitat al dèficit sever de Cu (BCS 100 μM), de manera que COPT5 deu estar involucrat en el correcte creixement de l'arrel principal en *A. thaliana* (Figura R4.10). Prèviament, s'havia descrit que els mutants *copt1* antisentit eren sensibles a la limitació de Cu, tot i que aquesta resposta es produïa en medis suplementats amb BCS 10 μM (Sancenón et al. 2004). Conseqüentment, proposem que la funció de COPT1 és clau per a l'adquisició de Cu en medis lleugerament deficients en Cu, mentre que COPT5 és necessari perquè *A. thaliana* puga respondre adequadament a la limitació severa de Cu, probablement, a través de la mobilització del Cu emmagatzemat a un compartiment intracel·lular de les arrels. En *S.*

cerevisiae, els transportadors de Cu d'alta afinitat Crt1 i Ctr3 constitueixen la principal via d'entrada del metall en condicions de deficiència de Cu. Comsevulla que el complex per al transport de Fe d'alta afinitat, Ftr1-Fet3, és dependent de Cu, en cas que la limitació de Cu es perllongue els llevats esdevenen deficients en Fe. En aquesta situació, s'indueix l'expressió de les proteïnes del vacuol Ctr2 i de la reductasa Fro6 amb la finalitat de mobilitzar les reserves de Cu (Rees et al. 2004; Rees i Thiele, 2007). El fet que els fenotips dels mutants *copt5* es manifesten únicament sota condicions de dèficit sever implica l'existència d'un sistema similar en *A. thaliana*. Tanmateix, els nivells d'mRNA de *COPT5* no es veuen alterats en funció del Cu present al medi (Figura R4.8), tot i que no podem descartar que la regulació es produesca a nivell post-transcripcional.

Els mutants *copt5* crescuts en placa amb medis deficients en Cu exhibeixen una inhibició del creixement de l'arrel principal, una pèrdua de pes fresc i una disminució en el contingut en clorofil·les (Figura R4.11; R4.17). Degut a la clorosi presentada pels mutants *copt5* en assolir 25 dies en medis amb dèficit sever de Cu, es va avaluar l'estat de la cadena de transport d'electrons de la fotosíntesi. Els paràmetres de fluorescència de la clorofil·la indiquen que el Fv/Fm i Y_{PSII} de les plàntules *copt5* presenten una major alteració que les línies silvestres i que el mutant complementat, en condicions de dèficit sever (Figura R4.18). Fem palés que l'estat majoritàriament reduït de la Q_A en els mutants *copt5* crescuts en condicions de dèficit sever implica una alteració en la cadena de transport d'electrons posterior al PSII (Figura R4.19). Aquestes observacions, junt amb el patró d'expressió de *COPT5*, suggereix que sota condicions de dèficit extrem de

Cu, el Cu mobilitzat per COPT5 podria ser distribuït envers el cloroplast dels teixits fotosintèticament actius. Cal destacar que els mutants d'*A. thaliana* involucrats en la distribució del Cu a la PC, com ara *paa1* i *paa2*, manifesten fenotips similars als de *copt5* pel que fa als nivells de clorofil·les i alteracions en la cadena de transport d'electrons (Shikanai et al. 2003; Abdel-Ghany et al. 2005). Ara bé, els fenotips de *paa1* i *paa2* són més severs que els descrits per a *copt5*, probablement com a conseqüència de què PAA1 i PAA2 tinguen una funció més directa en el transport del Cu al cloroplast, mentre que COPT5 intervindria d'una manera més general en el procés de distribució. Els defectes en la distribució del Cu al cloroplast dels mutants *paa1* i *paa2* causen una reducció en el contingut en Cu dels tilacoides i en els nivells de PC (Shikanai et al. 2003; Abdel-Ghany et al. 2005). La determinació dels nivells de PC i el contingut de Cu en el cloroplast en els mutants *copt5* no mostra variacions respecte de les línies silvestres (Figura R4.20). Probablement *A. thaliana* requeresca de PAA1 i PAA2, però no de COPT5 per a la distribució al cloroplast, en condicions de suficiència o dèficit moderat de Cu. Malauradament, el fet que tan sols obtinguem fenotips per a *copt5* en sota condicions de dèficit extrem ens impedeix aïllar suficients cloroplasts per mesurar-ne el Cu endogen i escometre el nivells de PC a partir de plàntules.

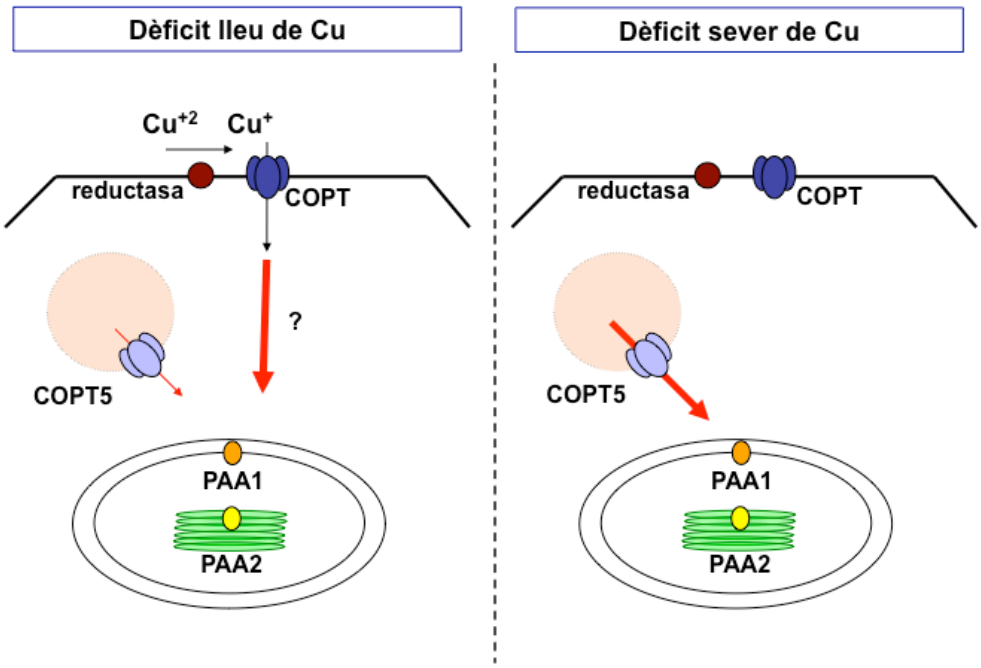


Figura R4.22: Model per a la distribució del Cu en funció de l'estat nutricional de Cu. En condicions de dèficit lleu de Cu, el Cu és adquirit a través dels transportadors COPT i distribuït a través d'intermediaris, entre d'altres, al cloroplast. Aquesta via esdevé la principal per a la mobilització del Cu, tot i que, paral·lelament, COPT5 mobilitza el reservori de Cu emmagatzemat dins el PVC o vacuol i constitueix una ruta secundària (panell esquerre). En condicions de dèficit extrem de Cu, la baixa disponibilitat de Cu extracel·lular impedeix que la via dependent dels COPT de membrana plasmàtica abastesca el Cu, de manera que la via de COPT5 esdevé la prioritària per a la distribució del Cu (panell dret).

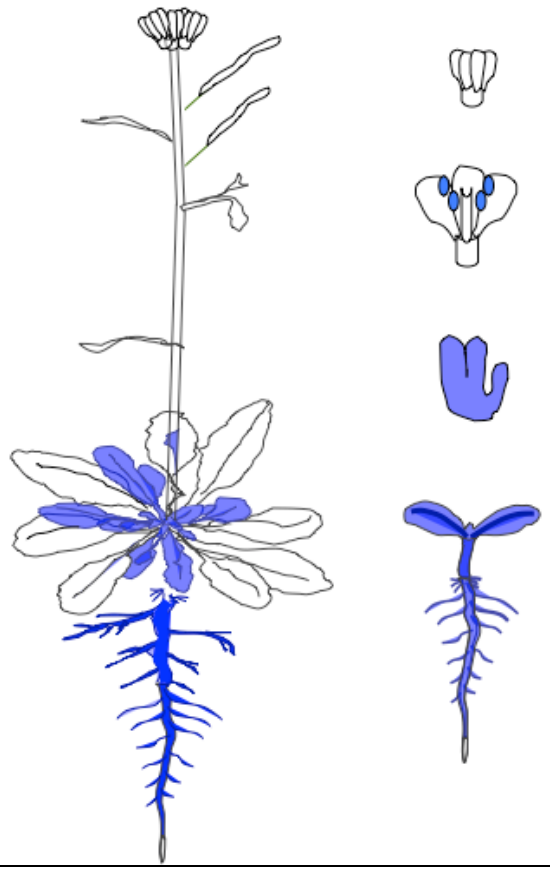
L'adquisició i distribució de Cu a través de la planta pot dur-se a terme a través de diferents vies en funció de l'estat nutricional de la planta. Si els nivells de Cu són suficients, els transportadors de Cu no s'expressen i el metall s'adquireix a través de transportadors de baixa afinitat i posteriorment és distribuït. En condicions de dèficit de Cu, l'expressió dels transportadors COPT en arrels permet incorporar el Cu present al medi i la posterior distribució a través d'algun intermediari (Figura R4.22).

Tanmateix, en cas de perllongar el dèficit de Cu, la distribució del Cu depén de la mobilització dels reservoris. COPT5 podria participar decisivament en la resposta d'*A. thaliana* al dèficit sever de Cu, probablement facilitant el Cu emmagatzemat cap a les cèl·lules amb requeriment del metall, com ara els teixits fotosintètics (Figura R4.22).

Els resultats presentats en aquest capítol s'esquematitzen a l'atles 3 (p. 205).

ATLES

ATLES 1



COPT2 (At3g46900)

Tamany gen: 474 pb (no presenta introns)

Tamany proteïna: 17057.8 Da (158 aa)

Trets estructurals:
- Met conservades
- 3 segments transmembrana
- 2 motius Met en aminoterminal

Localització subcel·lular: membrana plasmàtica

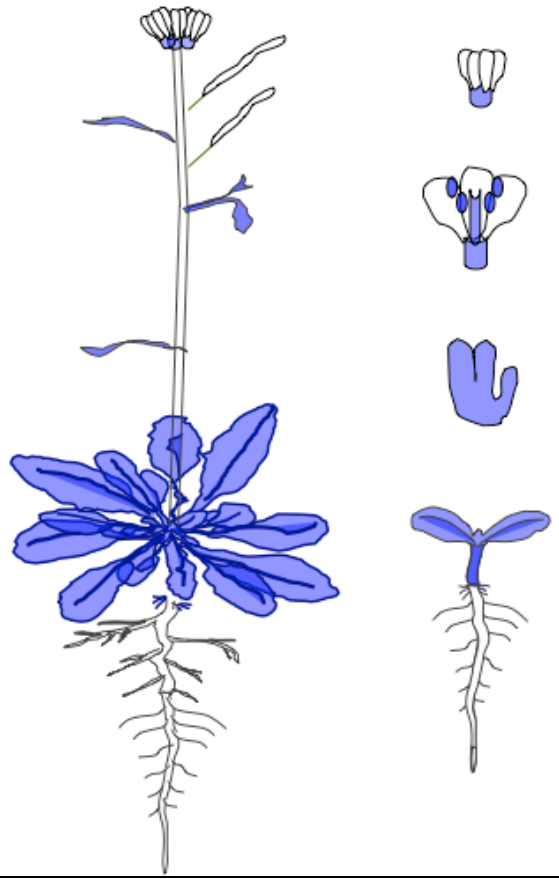
Patró d'expressió:
- Plàntula: arrel primària i secundària (excepte àpex terminal) en un patró no solapant amb el de COPT1; cotiledons i nervadures, meristema apical, fulles vertaderes, tricomes
- Cos vegetatiu: fulles emergents i tricomes
- Part reproductora: anteres (gra de pol·len)
- Embrió

Regulació: Cu, Fe i ritme circadià

Mutants *copt2*: cap fenotip ni diferència en Cu endogen

Consideracions de futur treball:
- Encreuar *copt2* amb *copt1*
- Estudiar la regulació de *COPT2* i el comportament dels mutants *copt2* en deficiència d'altres metalls (Fe)
- Seguiment de l'oscil·lació circadiana de *pCOPT2::LUC+*

ATLES 2



COPT6 (At2g26975)

Tamany gen: 435 pb (no presenta introns)

Tamany proteïna: 15805.5 Da (145 aa)

Trets estructurals:
- Met conservades
- 3 segments transmembrana
- 2 motius Met en aminoterminal
- Manca del motiu CxC en carboxiterminal

Localització subcel·lular: membrana plasmàtica

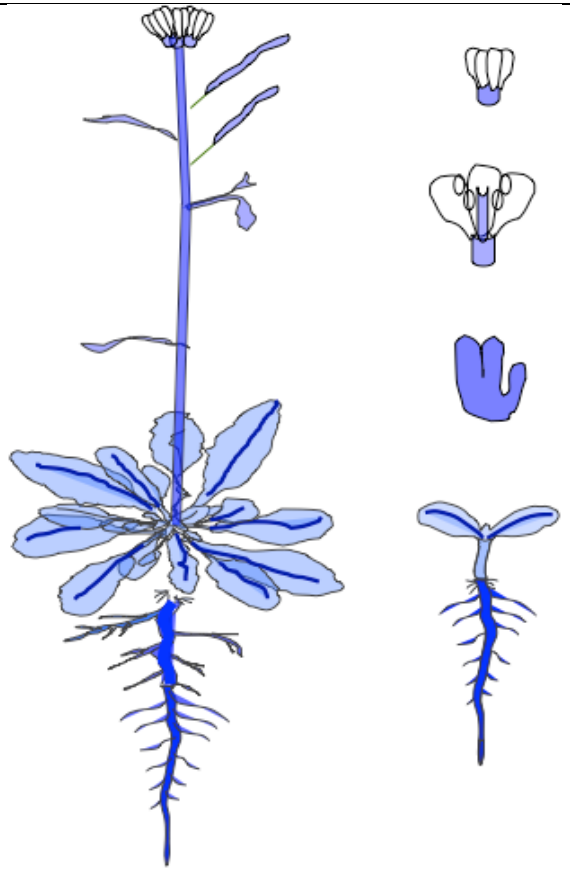
Patró d'expressió:
- Plàntula: cotiledons i nervadures, meristema apical, fulles vertaderes, tricomes
- Cos vegetatiu: fulles i nervadures
- Part reproductora: flors en pre i postantesi: pístil (oòcits) i anteres (gra de pol·len)
- Embrió

Regulació: no es detecta regulació per Cu

Mutants *copt6*: cap fenotip ni diferència en Cu endogen

Consideracions de futur treball:
- Encreuar *copt6* amb *copt1, copt2 i copt5*
- Estudi de *copt6* en cultius hidropònics: producció de llavors
- Resposta de *copt6* al dèficit altres metalls

ATLES 3



COPT5 (At5g20650)

Tamany gen: 438 pb (no presenta introns)

Tamany proteïna: 15784.1 Da (146 aa)

Trets estructurals:
- Met conservades
- 3 segments transmembrana
- 1 motiu Met en aminoterminal

Localització subcel·lular: intracel·lular

Patró d'expressió:
- Plàntula: arrel primària i secundària, cotiledons i nervadures, meristema apical, fulles vertaderes, tricomes
- Cos vegetatiu: fulles, tiges, fulles caulinars i tricomes
- Part reproductora: flors en pre i postantesi excepte pol·len
- Embrió

Regulació: no es detecta regulació per Cu

Mutants *copt5*:
- Sensibilitat al dèficit extrem de Cu: reducció arrel primària, pèrdua de pes fresc, reducció tamany hipocòtils, increment lignificació, clorosi, pèrdua d'eficiència en paràmetres fotosintètics
- Cap diferència en Cu endogen

Consideracions de futur treball:
- Encreuar *copt5* amb *copt1*
- Estudi de *copt5* al dèficit d'altres metalls

CONCLUSIONS

CONCLUSIONS

1. L'estat nutricional de suficiència de Cu (5-20 μg/g pes sec) per a plàntules de 7 dies crescudes en placa s'assoleix en medis ½ MS suplementats amb un rang de concentració de $CuSO_4$ entre 0.3 i 3 μM.

2. El gen *COPT2* esdevé un marcador molecular sensible per a detectar el contingut mínim en Cu, ja que presenta el 50% d'inducció per a concentracions de 0.06 μM $CuSO_4$ en el medi de cultiu.

3. El medi ½ MS comercial *Sigma* és deficient en Cu, ja que el contingut en Cu endogen de les plàntules que hi creixen és inferior a 5 μg/g pes sec i l'expressió de gens marcadors de deficiència de Cu, com ara *COPT2*, és alta.

4. El gen *COPT6* és un nou membre de la família COPT, ja que complementa els problemes de creixement de la soca mutant de *S. cerevisiae ctr1Δ ctr3Δ* en medis amb fonts de carboni no fermentables de la mateixa manera que *COPT1 i COPT2.*

5. Les proteïnes de fusió COPT2::GFP i COPT6::GFP es localitzen a la membrana plasmàtica en protoplasts d'*A. thaliana*, mentre que COPT5::GFP presenta un patró de localització intracel·lular que coincideix amb un marcador del compartiment prevacuolar. De la mateixa manera, el fraccionament d'un extracte de proteïnes totals de fulles de plantes COPT5::HA en gradient de sacarosa detecta

COPT5::HA en la mateixa fracció que els marcadors de tonoplast i del compartiment prevacuolar. Per tant, COPT2 i COPT6 constitueixen, junt amb COPT1, els transportadors de membrana plasmàtica i COPT5 forma part dels transportadors intracel·lulars.

6. El gen *COPT2* s'expressa a la major part de l'arrel principal a excepció de l'àpex, amb un patró diferent i no solapant al de *COPT1*. Tanmateix, *COPT2* també s'expressa a nivell de cotiledons, fulles emergents, meristema apical caulinar, tricomes, embrió i gra de pol·len. Els nivells d'mRNA de *COPT2* s'incrementen en condicions de deficiència de Cu en tots els teixits on s'expressa.

7. El gen *COPT6* és un gen d'expressió exclusiva a la part aèria. Concretament, *COPT6* s'expressa a nivell de cotiledons, fulles vertaderes, nervadures, tricomes, meristema apical caulinar, estomes i embrió. A nivell de teixits reproductius, *COPT6* s'expressa tant en el gra de pol·len, com en els oòcits. Els nivells de l'mRNA de *COPT6* no varien en funció dels nivells de Cu al medi en cap dels teixits on s'expressa.

8. El gen *COPT5* s'expressa per tot el cos d'*A. thaliana*, a excepció del gra de pol·len, i de manera més palesa a nivell d'arrels, feixos conductors i nervadures. A més, *COPT5* s'expressa en cotiledons, fulles vertaderes, tricomes, meristema apical caulinar, tija, filaments de les anteres, oòcits, síliqües, furuncles, embrió i plàntules etiolades. Nogensmenys, els

nivells d'mRNA i proteïna no es veuen afectats pels nivells de Cu presents al medi.

9. L'expressió de *COPT2* i *COPT6* en els mutants *copt2-3* i *copt6-2* és indetectable però no es tradueix en diferències fenotípiques observables, fisiològiques, moleculars, o en l'acumulació de Cu endogen, respecte de les línies silvestres.

10. La manca d'expressió de *COPT5* en els mutants *copt5-2* i *copt5-3* causa una major sensibilitat al dèficit sever de Cu que implica la inhibició del creixement de l'arrel principal i la pèrdua de pes fresc. Amb el temps s'hi aprecia un estat avançat de clorosi amb una pèrdua del 50% del contingut en clorofil·les i una disminució del rendiment dels principals paràmetres involucrats en el manteniment de la cadena de transport d'electrons de la fotosíntesi.

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

Abdel-Ghany, S. E., Burkhead, J. L., Gogolin, K. A., Andrés-Colás, N., Bodecker, J. R., Puig, S., Peñarrubia, L. i Pilon, M. 2005a. AtCCS is a functional homolog of the yeast copper chaperone Ccs1/Lys7. *FEBS Lett.* 579: 2307-2312.

Abdel-Ghany, S. E., Muller-Moule, P., Niyogi, K. K., Pilon, M. i Shikanai, T. 2005b. Two P-type ATPases are required for copper delivery in *Arabidopsis thaliana* chloroplasts. *Plant Cell* 17: 1233-1251.

Abe, H., Urao, T., Ito, T., Seki, M., Shinozaki, K. i Yamaguchi-Shinozaki, K. 2003. Arabidopsis AtMYC2 (bHLH) and AtMYB2 (MYB) function as transcriptional activators in abscisic acid signaling. *Plant Cell* 15: 63-78.

Agarwal, P., Agarwal, P. K., Nair, S., Sopory, S. K. i Reddy, M. K. 2007. Stress-inducible DREB2A transcription factor from *Pennisetum glaucum* is a phosphoprotein and its phosphorylation negatively regulates its DNA-binding activity. *Mol. Genet. Genomics* 277: 189-198.

Aller, S. G., Eng, E. T., De Feo, C. J. i Unger, V. M. 2004. Eukaryotic CTR copper uptake transporters require two faces of the third transmembrane domain for helix packing, oligomerization, and function. *J. Biol. Chem.* 279: 53435-53441.

Aller, S. G. i Unger, V. M. 2006. Projection structure of the human copper transporter CTR1 at 6-A resolution reveals a compact trimer with a novel channel-like architecture. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 103: 3627-3632.

Alloway, B. J. 2008 Micronutrient deficiencies in global crop production. *Springer*. Heidelberg. Alemanya.

Alonso, J. M., Stepanova, A. N., Leisse, T. J., Kim, C. J., Chen, H., Shinn, P., Stevenson, D. K., Zimmerman, J., Barajas, P., Cheuk, R., Gadrinab, C., Heller, C., Jeske, A., Koesema, E., Meyers, C. C., Parker, H., Prednis, L., Ansari, Y., Choy, N., Deen, H., Geralt, M., Hazari, N., Hom, E., Karnes, M., Mulholland, C., Ndubaku, R., Schmidt, I., Guzman, P., Aguilar-Henonin, L., Schmid, M., Weigel, D., Carter, D. E., Marchand, T., Risseeuw, E., Brogden, D., Zeko, A., Crosby, W. L., Berry, C. C. i Ecker, J. R. 2003. Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana. Science* 301: 653-657.

Andrés-Colás, N., Perea-Garcia, A., Puig, S. i Peñarrubia, L. 2010. Deregulated copper transport affects Arabidopsis development especially in the absence of environmental cycles. *Plant Physiol*. 153(1):170-84.

Andrés-Colás, N., Sancenón, V., Rodríguez-Navarro, S., Mayo, S., Thiele, D. J., Ecker, J. R., Puig, S. i 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.

Arnon, D. I. i Hoagland, D. R. 1939. A comparison of water culture and soil as media for crop production. *Science* 89: 512-514.

Balandin, T. i Castresana, C. 2002. AtCOX17, an Arabidopsis homolog of the yeast copper chaperone COX17. *Plant Physiol.* 129: 1852-1857.

Banci, L., Bertini, I., Cantini, F., Felli, I. C., Gonnelli, L., Hadjiliadis, N., Pierattelli, R., Rosato, A. i Voulgaris, P. 2006. The Atx1-Ccc2 complex is a metal-mediated protein-protein interaction. *Nat. Chem. Biol.* 2: 367-368.

Barhoom, S., Kupiec, M., Zhao, X., Xu, J. R. i Sharon, A. 2008. Functional characterization of CgCTR2, a putative vacuole copper transporter that is involved in germination and pathogenicity in *Colletotrichum gloeosporioides. Eukaryot.Cell* 7: 1098-1108.

Bate, N. i Twell, D. 1998. Functional architecture of a late pollen promoter: pollen-specific transcription is developmentally regulated by multiple stage-specific and co-dependent activator elements. *Plant Mol. Biol.* 37: 859-869.

Beauclair, L., Yu, A. i Bouche, N. 2010. microRNA-directed cleavage and translational repression of the copper chaperone for superoxide dismutase mRNA in Arabidopsis. *Plant J.* 62(3):454-62

Bellemare, D. R., Shaner, L., Morano, K. A., Beaudoin, J., Langlois, R. i Labbe, S. 2002. Ctr6, a vacuolar membrane copper transporter in *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Biol. Chem.* 277: 46676-46686.

Bernal, M., Roncel, M., Ortega, J. M., Picorel, R. i Yruela, I. 2004. Copper effect on cytochrome b of photosystem II under photoinhibitory conditions. *Physiol. Plant.* 120: 686-694.

Bernal, M., Ramiro, M.V., Cases, R, Picorel, R. i Yruela, I. 2006. Excess copper effect on growth, chloroplast ultrastructure, oxygen-evolution activity and chlorophyll fluorescence in *Glycine max* cell suspensions. *Physiol. Plant.* 127: 312-325.

Birkenbihl, R. P., Jach, G., Saedler, H. i Huijser, P. 2005. Functional dissection of the plant-specific SBP-domain: overlap of the DNA-binding and nuclear localization domains. *J. Mol. Biol.* 352: 585-596.

Bonnet, E., Wuyts, J., Rouze, P. i Van de, P. Y. 2004. Detection of 91 potential conserved plant microRNAs in *Arabidopsis thaliana* and *Oryza sativa* identifies important target genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 101: 11511-11516.

Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.

Brodersen, P., Sakvarelidze-Achard, L., Bruun-Rasmussen, M., Dunoyer, P., Yamamoto, Y. Y., Sieburth, L. i Voinnet, O. 2008. Widespread translational inhibition by plant miRNAs and siRNAs. *Science* 320: 1185-1190.

Burkhead, J. L., Reynolds, K. A., Abdel-Ghany, S. E., Cohu, C. M. i Pilon, M. 2009. Copper homeostasis. *New Phytol.* 182: 799-816.

Cassin, G., Mari, S., Curie, C., Briat, J. F. i Czernic, P. 2009. Increased sensitivity to iron deficiency in *Arabidopsis thaliana* overaccumulating nicotianamine. *J. Exp. Bot.* 60: 1249-1259.

Chan, C. S., Guo, L. i Shih, M. C. 2001. Promoter analysis of the nuclear gene encoding the chloroplast glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase B subunit of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.* 46: 131-141.

Chang, C. i Shockey, J. A. 1999. The ethylene-response pathway: signal perception to gene regulation. *Curr .Opin. Plant Biol.* 2: 352-358.

Chen, Y., Shi, J., Tian, G., Zheng, S. i Lina, Q. 2004. Fe deficency induces Cu uptake and accumulation in *Commelina communis*. *Plant Science* 166: 1371-1377.

Chu, C. C., Lee, W. C., Guo, W. Y., Pan, S. M., Chen, L. J., Li, H. M. i Jinn, T. L. 2005. A copper chaperone for superoxide dismutase that confers three types of copper/zinc superoxide dismutase activity in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 139: 425-436.

Clough, S. J. i Bent, A. F. 1998. Floral dip: a simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana. Plant J.* 16: 735-743.

Cobine, P. A., McKay, R. T., Zangger, K., Dameron, C. T. i Armitage, I. M. 2004. Solution structure of Cu6 metallothionein from the fungus *Neurospora crassa*. *Eur. J. Biochem.* 271: 4213-4221.

Cobine, P. A., Pierrel, F. i Winge, D. R. 2006. Copper trafficking to the mitochondrion and assembly of copper metalloenzymes. *Biochim. Biophys. Acta* 1763: 759-772.

Cohen, A., Nelson, H. i Nelson, N. 2000. The family of SMF metal ion transporters in yeast cells. *J. Biol. Chem.* 275: 33388-33394.

Cohu, C.M. i Pilon, M. 2007. Regulation of superoxide dismutase expression by copper avaibility. *Physiol. Plant.* 129: 747-755.

Colangelo, E.P., i Guerinot, M.L. 2004. The essential basic helix-loop-helix protein FIT1 is required for the iron deficiency response. *Plant Cell.* 16: 3400-12.

Culotta, V. C., Lin, S. J., Schmidt, P., Klomp, L. W., Casareno, R. L. i Gitlin, J. 1999. Intracellular pathways of copper trafficking in yeast and humans. *Adv. Exp. Med. Biol.* 448: 247-254.

Curie, C., Cassin, G., Couch, D., Divol, F., Higuchi, K., Le Jean, M., Misson, J., Schikora, A., Czernic, P. i Mari, S. 2009. Metal movement within the plant: contribution of nicotianamine and yellow stripe 1-like transporters. *Ann.Bot.* 103: 1-11.

Dancis, A., Roman, D. G., Anderson, G. J., Hinnebusch, A. G. i Klausner, R. D. 1992. Ferric reductase of *Saccharomyces cerevisiae*: molecular characterization, role in iron uptake, and transcriptional control by iron. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 89: 3869-3873.

Dancis, A., Yuan, D. S., Haile, D., Askwith, C., Eide, D., Moehle, C., Kaplan, J. i Klausner, R. D. 1994. Molecular characterization of a copper transport protein in *S. cerevisiae*: an unexpected role for copper in iron transport. *Cell* 76: 393-402.

de Boer, D., Cremers, F., Teertstra, R., Smits, L., Hille, J., Smeekens, S. i Weisbeek, P. 1988. In vivo import of plastocyanin and a fusion protein into developmentally different plastids of transgenic plants. *EMBO J.* 7: 2631-2635.

De Feo, C. J., Aller, S. G., Siluvai, G. S., Blackburn, N. J. i Unger, V. M. 2009. Three-dimensional structure of the human copper transporter hCTR1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 106: 4237-4242.

De Feo, C. J., Mootien, S. i Unger, V. M. 2010. Tryptophan scanning analysis of the membrane domain of CTR-copper transporters. *J.Membr.Biol.* 234: 113-123.

del Pozo, T., Cambiazo, V. i Gonzalez, M. 2010. Gene expression profiling analysis of copper homeostasis in *Arabidopsis thaliana*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 393: 248-252.

DiDonato, R. J., Jr., Roberts, L. A., Sanderson, T., Eisley, R. B. i Walker, E. L. 2004. Arabidopsis Yellow Stripe-Like2 (*YSL2*): a metal-regulated gene encoding a plasma membrane transporter of nicotianamine-metal complexes. *Plant J.* 39: 403-414.

Dong, J., Kim, S. T. i Lord, E. M. 2005. Plantacyanin plays a role in reproduction in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 138: 778-789.

Dugas, D. V. i Bartel, B. 2008. Sucrose induction of Arabidopsis miR398 represses two Cu/Zn superoxide dismutases. *Plant Mol. Biol.* 67: 403-417.

Eide D., Broderius M., Fett J., Guerinot M.L. 1996. A novel iron-regulated metal transporter from plants identified by functional expression in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93: 5624–5628.

Eide, D. J., Bridgham, J. T., Zhao, Z. i Mattoon, J. R. 1993. The vacuolar H(+)-ATPase of *Saccharomyces cerevisiae* is required for efficient copper detoxification, mitochondrial function, and iron metabolism. *Mol. Gen. Genet.* 241: 447-456.

Eisses, J. F. i Kaplan, J. H. 2005. The mechanism of copper uptake mediated by human CTR1: a mutational analysis. *J. Biol. Chem.* 280: 37159-37168.

Elmayan, T. i Tepfer, M. 1995. Evaluation in tobacco of the organ specificity and strength of the *rolD* promoter, domain A of the *CaMV(35S)* promoter and the *CaMV(35S)2* promoter. *Transgenic Res.* 4: 388-396.

Elortza, F., Nuhse, T. S., Foster, L. J., Stensballe, A., Peck, S. C. i Jensen, O. N. 2003. Proteomic analysis of glycosylphosphatidylinositol-anchored membrane proteins. *Mol. Cell Proteomics.* 2: 1261-1270.

Fernández, J.A. i Maldonado, J.M. 2000. Absorción y transporte de nutrientes minerales. Azcón-Bieto J., Talón M. (Eds.). Fundamentos de Fisiología Vegetal. McGraw-Hill Interamericana. p. 99-112

Filichkin, S. A., Leonard, J. M., Monteros, A., Liu, P. P. i Nonogaki, H. 2004. A novel endo-beta-mannanase gene in tomato *LeMAN5* is associated with anther and pollen development. *Plant Physiol.* 134: 1080-1087.

Gadsby, D. C. 2004. Ion transport: spot the difference. *Nature* 427: 795-797.

Gowik, U., Burscheidt, J., Akyildiz, M., Schlue, U., Koczor, M., Streubel, M. i Westhoff, P. 2004. *cis*-Regulatory elements for mesophyll-specific gene expression in the C4 plant *Flaveria trinervia*, the promoter of the C4 phosphoenolpyruvate carboxylase gene. *Plant Cell* 16: 1077-1090.

Grotz, N., Fox, T., Connolly, E.L., Park, W., Guerinot, M.L., Eide, D. 1998. Identification of a family of zinc transporter genes from Arabidopsis that respond to zinc deficiency. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95: 7220–7224

Halliwell, B. i Gutteridge, J. M. 1984. Lipid peroxidation, oxygen radicals, cell damage, and antioxidant therapy. *Lancet* 1: 1396-1397.

Hartmann, U., Sagasser, M., Mehrtens, F., Stracke, R. i Weisshaar, B. 2005. Differential combinatorial interactions of cis-acting elements recognized by R2R3-MYB, bZIP, and bHLH factors control light-responsive and tissue-specific activation of phenylpropanoid biosynthesis genes. *Plant Mol. Biol.* 57: 155-171.

Hassett, R., Dix, D. R., Eide, D. J. i Kosman, D. J. 2000. The Fe(II) permease Fet4p functions as a low affinity copper transporter and supports normal copper trafficking in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. J.* 351: 477-484.

Hassett, R. i Kosman, D. J. 1995. Evidence for Cu(II) reduction as a component of copper uptake by *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 270: 128-134.

Hellman, N.E. i Gitlin, J.D. 2002. Ceruloplasmin metabolism and function. *Annu. Rev. Nutr.* 22: 439-458.

Himelblau, E., Mira, H., Lin, S. J., Culotta, V. C., Peñarrubia, L. i Amasino, R. M. 1998. Identification of a functional homolog of the yeast copper homeostasis gene ATX1 from Arabidopsis. *Plant Physiol.* 117: 1227-1234.

Hirayama, T., Kieber, J. J., Hirayama, N., Kogan, M., Guzman, P., Nourizadeh, S., Alonso, J. M., Dailey, W. P., Dancis, A. i Ecker, J. R. 1999. RESPONSIVE-TO-ANTAGONIST1, a Menkes/Wilson disease-related copper transporter, is required for ethylene signaling in Arabidopsis. *Cell* 97: 383-393.

Holzer, A. K., Samimi, G., Katano, K., Naerdemann, W., Lin, X., Safaei, R. i Howell, S. B. 2004. The copper influx transporter human copper transport protein 1 regulates the uptake of cisplatin in human ovarian carcinoma cells. *Mol. Pharmacol.* 66: 817-823.

Ishida, S., Lee, J., Thiele, D. J. i Herskowitz, I. 2002. Uptake of the anticancer drug cisplatin mediated by the copper transporter Ctr1 in yeast and mammals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 99: 14298-14302.

Jaquinod, M., Villiers, F., Kieffer-Jaquinod, S., Hugouvieux, V., Bruley, C., Garin, J. i Bourguignon, J. 2007. A proteomics dissection of *Arabidopsis thaliana* vacuoles isolated from cell culture. *Mol. Cell Proteomics.* 6: 394-412.

Jefferson, R. A., Kavanagh, T. A. i Bevan, M. W. 1987. GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J.* 6: 3901-3907.

Jiang, J., Nadas, I. A., Kim, M. A. i Franz, K. J. 2005. A Mets motif peptide found in copper transport proteins selectively binds Cu(I) with methionine-only coordination. *Inorg. Chem.* 44: 9787-9794.

Jones-Rhoades, M. W. i Bartel, D. P. 2004. Computational identification of plant microRNAs and their targets, including a stress-induced miRNA. *Mol. Cell* 14: 787-799.

Kagaya, Y., Ohmiya, K. i Hattori, T. 1999. RAV1, a novel DNA-binding protein, binds to bipartite recognition sequence through two distinct DNA-binding domains uniquely found in higher plants. *Nucleic Acids Res.* 27: 470-478.

Kampfenkel, K., Kushnir, S., Babiychuk, E., Inze, D. i Van Montagu, M. 1995. Molecular characterization of a putative *Arabidopsis thaliana* copper transporter and its yeast homologue. *J. Biol. Chem.* 270: 28479-28486.

Kim, S. Y., Chung, H. J. i Thomas, T. L. 1997. Isolation of a novel class of bZIP transcription factors that interact with ABA-responsive and embryo-specification elements in the Dc3 promoter using a modified yeast one-hybrid system. *Plant J.* 11: 1237-1251.

Klughammer, C. i Schreiber, U. 2008. Saturation pulse method for assessment of energy conversion in PS I. *PAM Application Notes* 1: 11-14

Korshunova, Y. O., Eide, D., Clark, G. W., Guerinot, M. L. i Pakras, H. B. 1999. The IRT1 protein from *Arabidopsis thaliana* is a metal transporter with abroad substrate range. *Plant Mol. Biol.* 40: 37–44.

Krämer, U. 2010. Metal hyperaccumulation in plants. *Annu Rev Plant Biol.* 61:517-34.

Kropat, J., Tottey, S., Birkenbihl, R. P., Depege, N., Huijser, P. i Merchant, S. 2005. A regulator of nutritional copper signaling in *Chlamydomonas* is an SBP domain protein that recognizes the GTAC core of copper response element. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 102: 18730-18735.

Kuper, J., Llamas, A., Hecht, H. J., Mendel, R. R. i Schwarz, G. 2004. Structure of the molybdopterin-bound Cnx1G domain links molybdenum and copper metabolism. *Nature* 430: 803-806.

Langhans, M., Marcote, M.J., Pimpl, P., Virgili-López, G., Robinson, D.G. i Aniento, F. 2008. Trafficking and localization of p24 proteins in plant cells. *Traffic* 5:770-85

Larson, C. A., Adams, P. L., Jandial, D. D., Blair, B. G., Safaei, R. i Howell, S. B. 2010. The role of the N-terminus of mammalian copper transporter 1 in the cellular accumulation of cisplatin. *Biochem. Pharmacol.* 80: 448-454.

Leary, S. C., Winge, D. R. i Cobine, P. A. 2009. "Pulling the plug" on cellular copper: the role of mitochondria in copper export. *Biochim. Biophys. Acta* 1793: 146-153.

Lee, J., Pena, M. M., Nose, Y. i Thiele, D. J. 2002. Biochemical characterization of the human copper transporter Ctr1. *J. Biol. Chem.* 277: 4380-4387.

Li, H., Theg, S, Bauerle, C., i Keegstra, K. 1990. Metal-ion-center assembly of ferredoxin and plastocyanin in isolated chloroplasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87:6748-6752.

Lidon, F.C. i Henriques, F.S 1999. Role of rice shoot vacuoles in copper toxicity regulation. *Environ Exp Bot.* 39 (3): 197-202.

López-Molina, L. i Chua, N. H. 2000. A null mutation in a bZIP factor confers ABA-insensitivity in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* 41: 541-547.

Märschner, H. 2002. Mineral nutrition in higher plants. *Academic Press*, London, UK

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

Mira, H., Vilar, M., Esteve, V., Martinell, M., Kogan, M. J., Giralt, E., Salom, D., Mingarro, I., Peñarrubia, L. i Pérez-Paya, E. 2004. Ionic self-complementarity induces amyloid-like fibril formation in an isolated domain of a plant copper metallochaperone protein. *BMC. Struct. Biol.* 4: 7.

Mira, H., Vilar, M., Pérez-Paya, E. i Peñarrubia, L. 2001b. Functional and conformational properties of the exclusive C-domain from the Arabidopsis copper chaperone (CCH). *Biochem. J.* 357: 545-549.

Miras, S., Salvi, D., Ferro, M., Grunwald, D., Garin, J., Joyard, J. i Rolland, N. 2002. Non-canonical transit peptide for import into the chloroplast. *J. Biol. Chem.* 277: 47770-47778.

Molina-Heredia, F. P., Wastl, J., Navarro, J. A., Bendall, D. S., Hervas, M., Howe, C. J. i De La Rosa, M. A. 2003. Photosynthesis: a new function for an old cytochrome? *Nature* 424: 33-34.

Mukherjee, I., Campbell, N. H., Ash, J. S. i Connolly, E. L. 2006. Expression profiling of the Arabidopsis ferric chelate reductase (FRO) gene family reveals differential regulation by iron and copper. *Planta* 223: 1178-1190.

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

Nagae, M., Nakata, M. i 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.

Nakamura, M., Tsunoda, T. i Obokata, J. 2002. Photosynthesis nuclear genes generally lack TATA-boxes: a tobacco photosystem I gene responds to light through an initiator. *Plant J.* 29: 1-10.

Nishiuchi, T., Shinshi, H. i Suzuki, K. 2004. Rapid and transient activation of transcription of the ERF3 gene by wounding in tobacco leaves: possible involvement of NtWRKYs and autorepression. *J. Biol. Chem.* 279: 55355-55361.

Nose, Y., Rees, E. M. i Thiele, D. J. 2006. Structure of the Ctr1 copper trans'PORE'ter reveals novel architecture. *Trends Biochem. Sci.* 31: 604-607.

Ochiai, E-I. 1995. Toxicity of heavy metals and biological defense. Principles and applications in bioinorganic chemistry. *J. Chem Educ.* 72: 479-484.

Pal, R. i Rai, J. P. N. 2009 Phytochelatins: Peptides involved in heavy metal detoxification. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 160 (3): 945-963.

Parsons, T. R. i Strickland, J. D. 1962. Oceanic detritus. *Science* 136: 313-314.

Pena, M. M., Puig, S. i Thiele, D. J. 2000. Characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* high affinity copper transporter Ctr3. *J. Biol. Chem.* 275: 33244-33251.

Pich, A. i Scholz, I. 1996. Translocation of copper and other micronutrients in tomato plants (*Lycopersicon esculentum* Mill.): nicotianamine-stimulated copper transport in the xylem. *J Exp Bot.* 47: 41-47.

Pich, A., Manteuffel, R., Hillmer, S., Scholz, G. i Schmidt, W. 2001. Fe homeostasis in plant cells: does nicotianamine play multiple roles in the regulation of cytoplasmic Fe concentration? *Planta* 213: 967-976.

Piechulla, B., Merforth, N. i Rudolph, B. 1998. Identification of tomato *Lhc* promoter regions necessary for circadian expression. *Plant Mol. Biol.* 38: 655-662.

Portnoy, M. E., Schmidt, P. J., Rogers, R. S. i Culotta, V. C. 2001. Metal transporters that contribute copper to metallochaperones in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Genet. Genomics* 265: 873-882.

Puig, S., Andrés-Colás, N., Garcia-Molina, A. i Peñarrubia, L. 2007a. Copper and iron homeostasis in Arabidopsis: responses to metal deficiencies, interactions and biotechnological applications. *Plant Cell Environ.* 30: 271-290.

Puig, S., Lee, J., Lau, M. i Thiele, D. J. 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., Mira, H., Dorcey, E., Sancenón, V., Andrés-Colás, N., Garcia-Molina, A., Burkhead, J. L., Gogolin, K. A., Abdel-Ghany, S. E., Thiele, D. J., Ecker, J. R., Pilon, M. i Peñarrubia, L. 2007b. Higher plants possess two different types of ATX1-like copper chaperones. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 354: 385-390.

Puig, S. i Thiele, D. J. 2002. Molecular mechanisms of copper uptake and distribution. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 6: 171-180.

Quinn, J. M., Barraco, P., Eriksson, M. i Merchant, S. 2000. Coordinate copper- and oxygen-responsive *Cyc6* and *Cpx1* expression in *Chlamydomonas* is mediated by the same element. *J. Biol. Chem.* 275: 6080-6089.

Quinn, J. M. i Merchant, S. 1995. Two copper-responsive elements associated with the *Chlamydomonas Cyc6* gene function as targets for transcriptional activators. *Plant Cell* 7: 623-628.

Quinn, J. M., Nakamoto, S. S. i Merchant, S. 1999. Induction of coproporphyrinogen oxidase in *Chlamydomonas* chloroplasts occurs via transcriptional regulation of Cpx1 mediated by copper response elements and increased translation from a copper deficiency-specific form of the transcript. *J. Biol. Chem.* 274: 14444-14454.

Rae, T. D., Schmidt, P. J., Pufahl, R. A., Culotta, V. C. i O'Halloran, T. V. 1999. Undetectable intracellular free copper: the requirement of a copper chaperone for superoxide dismutase. *Science* 284: 805-808.

Rees, E. M., Lee, J. i Thiele, D. J. 2004. Mobilization of intracellular copper stores by the ctr2 vacuolar copper transporter. *J. Biol. Chem.* 279: 54221-54229.

Rees, E. M. i Thiele, D. J. 2007. Identification of a vacuole-associated metalloreductase and its role in Ctr2-mediated intracellular copper mobilization. *J. Biol. Chem.* 282: 21629-21638.

Rensink, W.A, Pilon, M., Weisbeek, P. 1998 Domains of a transit sequence required for in vivo import in Arabidopsis chloroplasts. *Plant Physiol.* 118: 691-699.

Robinson, N. J. i Winge, D. R. 2010. Copper metallochaperones. *Annu. Rev. Biochem.* 9: 537-562.

Rodríguez, F. I., Esch, J. J., Hall, A. E., Binder, B. M., Schaller, G. E. i Bleecker, A. B. 1999. A copper cofactor for the ethylene receptor ETR1 from Arabidopsis. *Science* 283: 996-998.

Rogers, H. J., Bate, N., Combe, J., Sullivan, J., Sweetman, J., Swan, C., Lonsdale, D. M. i Twell, D. 2001. Functional analysis of cis-regulatory elements within the promoter of the tobacco late pollen gene g10. *Plant Mol. Biol.* 45: 577-585.

Rogers, L. A., Dubos, C., Surman, C., Willment, J., Cullis, I. F., Mansfield, S. D. i Campbell, M. M. 2005. Comparison of lignin deposition in three ectopic lignification mutants. *New Phytol.* 168: 123-140.

Rosenzweig, A. C., Huffman, D. L., Hou, M. Y., Wernimont, A. K., Pufahl, R. A. i O'Halloran, T. V. 1999. Crystal structure of the Atx1 metallochaperone protein at 1.02 A resolution. *Structure.* 7: 605-617.

Rosso, M. G., Li, Y., Strizhov, N., Reiss, B., Dekker, K. i Weisshaar, B. 2003. An *Arabidopsis thaliana* T-DNA mutagenized population (GABI-Kat) for flanking sequence tag-based reverse genetics. *Plant Mol. Biol.* 53: 247-259.

Rubino, J. T., Riggs-Gelasco, P. i Franz, K. J. 2010. Methionine motifs of copper transport proteins provide general and flexible thioether-only binding sites for Cu(I) and Ag(I). *J. Biol. Inorg. Chem.* 5:1033-49.

Rubio-Somoza, I., Martínez, M., Abraham, Z., Díaz, I. i Carbonero, P. 2006. Ternary complex formation between HvMYBS3 and other factors involved in transcriptional control in barley seeds. *Plant J.* 47: 269-281.

Rutherford, J. C. i Bird, A. J. 2004. Metal-responsive transcription factors that regulate iron, zinc, and copper homeostasis in eukaryotic cells. *Eukaryot. Cell* 3: 1-13.

Sancenón, V., Puig, S., Mateu-Andrés, I., Dorcey, E., Thiele, D. J. i 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, D. J. i Peñarrubia, L. 2003. Identification of a copper transporter family in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol.Biol.* 51: 577-587.

Scholl, R. L., May, S. T. i Ware, D. H. 2000. Seed and molecular resources for Arabidopsis. *Plant Physiol.* 124: 1477-1480.

Seigneurin-Berny, D., Gravot, A., Auroy, P., Mazard, C., Kraut, A., Finazzi, G., Grunwald, D., Rappaport, F., Vavasseur, A., Joyard, J., Richaud, P. i Rolland, N. 2006. HMA1, a new Cu-ATPase of the chloroplast envelope, is essential for growth under adverse light conditions. *J. Biol. Chem.* 281: 2882-2892.

Shikanai, T., Muller-Moule, P., Munekage, Y., Niyogi, K. K. i Pilon, M. 2003. PAA1, a P-type ATPase of Arabidopsis, functions in copper transport in chloroplasts. *Plant Cell* 15: 1333-1346.

Shirsat, A., Wilford, N., Croy, R. i Boulter, D. 1989. Sequences responsible for the tissue specific promoter activity of a *Pea legumin* gene in tobacco. *Mol. Gen. Genet.* 215: 326-331.

Simpson, S. D., Nakashima, K., Narusaka, Y., Seki, M., Shinozaki, K. i Yamaguchi-Shinozaki, K. 2003. Two different novel cis-acting elements of *erd1*, a *clpA* homologous Arabidopsis gene function in induction by dehydration stress and dark-induced senescence. *Plant J.* 33: 259-270.

Solano, R., Nieto, C., Avila, J., Cañas, L., Diaz, I. i Paz-Ares, J. 1995. Dual DNA binding specificity of a petal epidermis-specific MYB transcription factor from *Petunia hybrida*. *EMBO J.* 14: 1773-1784.

Stougaard, J., Jorgensen, J. E., Christensen, T., Kuhle, A. i Marcker, K. A. 1990. Interdependence and nodule specificity of cis-acting regulatory elements in the soybean leghemoglobin *lbc3* and *N23* gene promoters. *Mol. Gen. Genet.* 220: 353-360.

Szczypka, M. S., Zhu, Z., Silar, P. i Thiele, D. J. 1997. *Saccharomyces cerevisiae* mutants altered in vacuole function are defective in copper detoxification and iron-responsive gene transcription. *Yeast* 13: 1423-1435.

Tamagnone, L., Merida, A., Parr, A., Mackay, S., Culiañez-Macia, F. A., Roberts, K. i Martín, C. 1998. The *AmMYB308* and *AmMYB330* transcription factors from Antirrhinum regulate phenylpropanoid and lignin biosynthesis in transgenic tobacco. *Plant Cell* 10: 135-154.

Tanaka, K., Takio, S., Yamamoto, I. i Satoh, T. 1996. Purification of the cytosolic CuZn-superoxide dismutase (CuZn-SOD) of *Marchantia paleacea var. diptera* and its resemblance to CuZn-SOD from chloroplasts. *Plant Cell Physiol.* 37: 523-529.

Tang, S., Wilke, B.-M. i Huang, C. 1999 The uptake of copper by plants dominantly growing on copper mining spoils along the Yangtze River, the People's Republic of China. *Plant and soil* 209: 225-232.

Tang, G. i Zamore, P. D. 2004. Biochemical dissection of RNA silencing in plants. *Methods Mol. Biol.* 257: 223-244.

Waterhouse, P. M. i Helliwell, C. A. 2003. Exploring plant genomes by RNA-induced gene silencing. *Nat. Rev. Genet.* 4: 29-38.

Weigel, M., Varotto, C., Pesaresi, P., Finazzi, G., Rappaport, F., Salamini, F. i Leister, D. 2003. Plastocyanin is indispensable for photosynthetic electron flow in *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.* 278: 31286-31289.

Welch, R.M., Norvell, W.A., Schaefer, S.C., Sharff, J.E. i Kochian, L.V. 1993. Induction of iron(Ill) and copper(II) reduction in pea (*Pisum sativum L.*) roots by Fe and Cu status: Does the root-cell plasmalemma Fe(III)-chelate reductase perform a general role in regulating cation uptake? *Planta* 190: 551-561.

Wesley, S. V., Helliwell, C. A., Smith, N. A., Wang, M. B., Rouse, D. T., Liu, Q., Gooding, P. S., Singh, S. P., Abbott, D., Stoutjesdijk, P. A., Robinson, S. P., Gleave, A. P., Green, A. G. i Waterhouse, P. M. 2001. Construct design for efficient, effective and high-throughput gene silencing in plants. *Plant J.* 27: 581-590.

Wintz, H., Fox, T., Wu, Y.Y., Feng, V., Chen, W., Chang, H.S. , Zhu T. i Vulpe, C. 2003. Expression profiles of Arabidopsis thaliana in mineral deficiencies reveal novel transporters involved in metal homeostasis, *J. Biol. Chem*. 278: 47644–47653.

Wintz, H. i Vulpe, C. 2002. Plant copper chaperones. *Biochem. Soc. Trans.* 30: 732-735.

Wu, X., Sinani, D., Kim, H. i 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.

Yamahara, T., Shiono, T., Suzuki, T., Tanaka, K., Takio, S., Sato, K., Yamazaki, S. i Satoh, T. 1999. Isolation of a germin-like protein with manganese superoxide dismutase activity from cells of a moss, *Barbula unguiculata*. *J. Biol. Chem.* 274: 33274-33278.

Yamasaki, H., Abdel-Ghany, S. E., Cohu, C. M., Kobayashi, Y., Shikanai, T. i 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. i Shikanai, T. 2009. SQUAMOSA Promoter Binding Protein-Like7 is a central regulator for copper homeostasis in Arabidopsis. *Plant Cell* 21: 347-361.

Yanagisawa, S. 2000. Dof1 and Dof2 transcription factors are associated with expression of multiple genes involved in carbon metabolism in maize. *Plant J.* 21: 281-288.

Yanagisawa, S. i Schmidt, R. J. 1999. Diversity and similarity among recognition sequences of *Dof* transcription factors. *Plant J.* 17: 209-214.

Yen, M. R., Tseng, Y. H. i Saier, M. H., Jr. 2001. Maize Yellow Stripe1, an iron-phytosiderophore uptake transporter, is a member of the oligopeptide transporter (OPT) family. *Microbiology.* 147: 2881-2883.

Zhou, D. X. 1999. Regulatory mechanism of plant gene transcription by GT-elements and GT-factors. *Trends Plant Sci.* 4: 210-214.

FINIS CORONAT OPUS