

FC  
mología  
114  
.1

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**UNIVERSIDAD DE CHILE**



**LIBERACION DE CALCIO INDUCIDA POR COBRE Y SU  
ROL EN LA ACTIVACION DE GENES DE PROTEINAS  
ANTIOXIDANTES EN EL ALGA MARINA *ULVA COMPRESSA***

Seminario de Título entregado a la  
Universidad de Chile  
En cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de  
Ingeniero en Biotecnología Molecular

Susana Cabello Campos  
Julio 2009  
Santiago, Chile



Tutor de seminario de título Dra. Alejandra Moenne  
Co-tutor de seminario de título Dr. Bernardo Morales  
Profesor patrocinante Dr. Juan Bacigalupo

FACULTAD DE CIENCIAS - UNIVERSIDAD DE CHILE



**LIBERACION DE CALCIO INDUCIDA POR COBRE Y SU ROL  
EN LA ACTIVACION DE GENES DE PROTEINAS  
ANTIOXIDANTES EN EL ALGA MARINA *ULVA COMPRESSA***

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular

Susana Cabello Campos



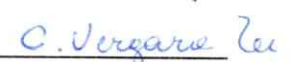
Dra. Alejandra Moenne  
Tutor de seminario de título

Dr. Bernardo Morales  
Co-tutor de seminario de título

Comisión de Evaluación seminario de Título

Dra. Claudia Stange  
Presidente Comisión

Dra. Cecilia Vergara  
Corrector

  
\_\_\_\_\_  
  
\_\_\_\_\_  
  
\_\_\_\_\_  
  
\_\_\_\_\_  


## Agradecimientos

En primer lugar me gustaría agradecer a mi familia, en especial a mis papas por todo en este caso quiero agradecer siempre motivarme a hacer más, por darme la oportunidad de estudiar y siempre apoyarme al hacerlo, también quiero agradecer a los Pochos por el constante apoyo en todos los ámbitos de mi vida y por que sin ellos otro gallo me cantaría.

Quiero agradecer a mis tutores por recibirme en su laboratorio y permitirme conocer otras cosas. Debo destacar por mi pasada por la USACH a Jeannette, Jorge, Alberto y Rodrigo, sin ustedes nada de esto hubiese sido igual, gracias por los ratos de ocio, por las tallas, las copuchas y bueno todo.

Agradezco también a las Liñas, Caro, Frani, Romi, Dinki y Pao, gracias por hacer de la vida universitaria una etapa tan linda, gracias por todo desde la esforzada pasada por todos los cursos y los estudios sin hora de termino, por los carretes y los salud por la amistad, y bueno gracias también a la secta misógina Charista y a todos sus integrantes, se lo que es el White charist! Me las pagaran, jajajaja.

No puedo dejar de mencionar a Toño y a su familia, gracias totales!

Finalmente quiero agradecer al lector de este seminario, gracias por el interés en mis primeros pasos en el exigiente pero hermoso camino de la ciencia.



## INDICE

Índice de tablas	5
Índice de figuras	5
Lista de abreviaciones	6
Resumen	8
Abstract	9
Introducción	10
1. Estrés oxidativo inducido por estrés biótico y abiótico en plantas	10
2. Estrés oxidativo y toxicidad por metales pesados	10
3. Sistema antioxidante enzimático y respuesta a metales pesados en plantas	12
4. Mecanismos de liberación de calcio intracelular	14
5. Transducción de señales en respuesta a calcio	15
6. Transducción de señales en respuesta a estrés oxidativo en plantas	16
7. El alga marina <i>Ulva compressa</i> y las respuestas al estrés por cobre	17
Hipótesis	19
Objetivos	19
1. Específico	19
2. Generales	19
Materiales y métodos	20
1. Obtención del alga y de agua de mar	20
2. Visualización de la liberación intracelular de calcio por microscopía	20



confocal	
3. Preparación de inhibidores para microscopía confocal y cultivos	21
4. Visualización de la liberación intracelular de calcio utilizando inhibidores	21
5. Determinación de la viabilidad del alga tratada con inhibidores	22
6. Cultivo <i>in vitro</i>	22
7. Obtención de RNA total del alga	23
8. Analisis del nivel de transcritos de los genes que codifican para AP, MET, ACT	
9. Analisis estadístico	25
<b>Resultados</b>	26
1. Visualización y cinética de la liberación de calcio por microscopía confocal	26
2. Visualización y cuantificación del efecto de inhibidores de los mecanismos de liberación de calcio	27
3. Viabilidad del alga tratada con inhibidores farmacológicos	31
4. Nivel de transcritos de los genes ap y met	32
5. Efecto de inhibidores en el nivel de transcritos de los genes met y ap en el alga tratada con cobre por 3 días	34
<b>Discusión</b>	37
<b>Conclusiones</b>	42
<b>Bibliografía</b>	43



## INDICE DE TABLAS

Tabla I. Secuencia y temperatura de disociación de los partidores	25
Tabla II. Intensidad y porcentaje de inhibición de fluorescencia.	28
Tabla III. Nivel relativo de transcritos de los genes <i>ap</i> y <i>met</i>	35

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Reacción de Fenton y de Haber-Weiss.	11
Figura 2. Mecanismo de activación de la expresión génica	17
Figura 3. Visualización de la liberación de calcio intracelular	26
Figura 4. Cinética de liberación de calcio intracelular	27
Figura 5. Liberación de calcio intracelular con inhibidores	29
Figura 6. Visualización de la liberación de calcio intracelular con inhibidores	30
Figura 7. Visualización de la viabilidad del alga con inhibidores	31
Figura 8. Cinética del nivel relativo de transcritos del gen <i>ap</i>	32
Figura 9. Cinética del nivel relativo de transcritos del gen <i>met</i>	33
Figura 10. Efecto de inhibidores en la expresión relativa de <i>ap</i>	34
Figura 11. Efecto de inhibidores en la expresión relativa de <i>met</i>	36
Figura 12. Temperatura de disociación del gen <i>met</i>	36



## LISTA DE ABREVIACIONES

- ACT: actina
- ABA: ácido abscísico
- AP: ascorbato peroxidasa
- ASC: ascorbato
- cADPR: ADP-ribosa cíclica
- Cam: calmodulina
- CAT: catalasa
- CDPK: proteínas quinasa dependientes de calcio
- DPI: difenileno-iodinium
- GR: glutatión reductasa
- GSH: glutatión
- IP<sub>3</sub>: inositol trifosfato
- LOX: lipoxigenasa
- MAPK: proteína quinasa activada por mitógenos
- MET: metalotioneína
- NAADP: adenina dinucleótido fosfato
- Ni: nifedipina
- PAL: fenilalanina amonía liasa
- ROS: especies reactivas del oxígeno
- Ry: ryanodina
- SOD: superóxido-dismutasa
- St: staurosporina
- Ver: verapamil

## RESUMEN

El alga marina *Ulva compressa* es una especie tolerante a cobre que crece en zonas costeras del norte de Chile contaminadas con este metal. Un estudio anterior mostró que las especies reactivas de oxígeno (ROS) actúan como señal y determinan la activación parcial de enzimas antioxidantes, pero no de enzimas de defensa. Estas evidencias sugieren la participación de otra señal que podría corresponder a la liberación de calcio desde depósitos intracelulares.

En este trabajo se evaluó la participación de la liberación de calcio inducida por cobre en la activación de genes que codifican para las proteínas antioxidantes ascorbato peroxidasa (AP) y metalotioneína (MET). Se utilizó microscopía confocal para detectar la liberación de calcio y la amplificación por RT-PCR en tiempo real para cuantificar el nivel de los transcritos de los genes de ascorbato peroxidasa (*ap*) y metalotioneína (*met*). Se analizó el efecto de inhibidores de canales de calcio de membrana, del canal de calcio sensible a calcio y a ryanodina, de calmodulinas y proteínas quinasas sobre el nivel de calcio intracelular y de transcritos. Los resultados muestran que el cobre induce la liberación de calcio intracelular y el aumento del nivel transcritos de *ap* y *met*. Asimismo, la liberación de calcio y el nivel de transcritos *ap* y *met* fue disminuída por inhibidores de canales de calcio, canal de calcio sensible a ryanodina calmodulinas y proteínas quinasas.

Por lo tanto, el estrés por cobre induce la liberación de calcio intracelular mediante la activación de canales de calcio de membrana y del canal de calcio sensible a ryanodina, la señal de calcio es transducida por calmodulinas y proteínas quinasas y participa en la activación parcial de los genes de las proteínas antioxidantes AP y MET en el alga *U. compressa*.

Financiado por Fondecyt 1085041 a A. Moenne



## ABSTRACT

The marine alga *Ulva compressa* is a copper-tolerant specie inhabiting copper-enriched coastal areas in northern Chile. A previous study showed that reactive oxygen species (ROS) act as a signal in the partial activation of genes encoding antioxidant enzymes but not defense enzymes. These results suggest the involvement of a second signal that may correspond to intracellular calcium release.

In this work, we analyze the involvement of copper-induced calcium release in the activation of genes encoding the antioxidant proteins ascorbate peroxidase (AP) and methallothionein (MET). Confocal microscopy was used to detect intracellular calcium release and real time RT-PCR to quantify *ap* and *met* transcript levels. The effect of inhibitors of membrane calcium channels, ryanodine-sensitive calcium channels, calmodulins and protein kinases on intracellular calcium release and *ap* and *met* transcript levels was also analyzed. Results showed that copper stress induce intracellular calcium release and the increase of the level of *ap* and *met* transcripts. In addition, intracellular calcium and *ap* and *met* transcript levels decreased in response to inhibitors of membrane calcium channels, ryanodine-sensitive calcium channels, calmodulins and protein kinases.

Therefore, copper stress induce intracellular calcium release through the activation of plasma membrane calcium channels and ryanodine-sensitive intracellular calcium channels. calcium signal is transduced by calmodulin and protein kinases and participate in the partial activation of genes encoding AP and MET in *U. compressa*.

Financed by Fondecyt 1085041 to A. Moenne

## INTRODUCCION

### Estrés oxidativo inducido por estrés biótico y abiótico en plantas

Las plantas son organismos sésiles que están expuestos constantemente a estrés biótico y abiótico. El estrés biótico corresponde a una infección por patógenos tales como bacterias, hongos y virus, en tanto que el estrés abiótico puede ser por calor, frío, desecación, salinidad, alta luminosidad, ozono y metales pesados. Ambos tipos de estrés producen un estallido oxidativo inicial a nivel local que ocurre luego a nivel sistémico (Alvarez y col. 1998; Fujita y col. 2006).

El estrés oxidativo se caracteriza por la acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS) tales como iones superóxido ( $\cdot O^{-2}$ ), peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) e iones hidroxilo ( $\cdot OH$ ). El estallido oxidativo inicial gatillado por estrés biótico y abiótico consiste en la acumulación transiente de peróxido de hidrógeno y puede presentarse como un pico monofásico o bifásico en respuesta a patógenos (Wojtazek, 1997; Baker y Orlandi, 1997) o en respuesta a ozono (Shraudner *et al.*, 1998; Mahalingam *et al.*, 2006), cadmio (Garnier *et al.*, 2006) y cobre (Vera y col. en preparación).

### Estrés oxidativo y toxicidad por metales pesados

Los metales pesados cobre, hierro, zinc, manganeso, cobalto y níquel son micronutrientes esenciales para procariontes y eucariontes ya que actúan como cofactores de numerosas proteínas y enzimas tales como el citocromo c, la citocromo c oxidasa, la enzima antioxidante SOD, entre otras. Por lo general, los iones de metales pesados se encuentran como complejos proteicos en las células ya que de forma libre son más tóxicos (Luna y col.

1994). Así, los metales pesados pueden causar daño por tres vías distintas, la generación de especies reactivas del oxígeno, el bloqueo por unión covalente de metales pesados a macromoléculas y la pérdida de actividad enzimática por cambio de metales esenciales.

Algunos metales pesados como  $\text{Fe}^{12}$  y  $\text{Cu}^{12}$  reaccionan con el peróxido de hidrógeno llevando a la formación de anión superóxido  $\cdot\text{O}_2^-$  lo cual deriva en la formación de  $\text{H}_2\text{O}_2$  y  $\text{OH}\cdot$  vía reacción de Fenton y Haber-Weiss (Wojtazek, 1997; Fig. 1). Estos radicales libres son altamente oxidantes y dañan las macromoléculas biológicas. Además, metales y metaloides sin actividad redox como el cadmio, arsénico, mercurio y plomo pueden causar daño ya que generan estrés oxidativo vía activación de la NADPH oxidasa y otros (Garnier y col 2006).

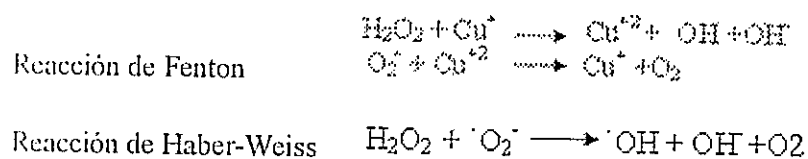


Figura 1. Producción de ROS inducida por hierro y cobre mediante reacción de Fenton y de Haber-Weiss.

Otra vía de toxicidad por metales pesados es su capacidad de oxidar al oxígeno, nitrógeno y azufre pudiendo inactivar enzimas que contiene residuos de cisteína, serina, arginina, etc.

### Sistema antioxidante enzimático y respuesta a metales pesados en plantas

En la naturaleza existen plantas acumuladoras de metales pesados las cuales son naturalmente tolerantes a niveles mayores de los esenciales y en las cuales se ha analizado la respuesta del sistema antioxidante (Sharma y Dietz 2009). Se observó un aumento de la actividad súper oxido dismutasa (SOD) y catalasa (CAT), en una variedad de arveja tolerante a  $\text{Cu}^{2+}$ , en la planta acumuladora de  $\text{Ni}^{+2}$ , *Allysum bertholonii*, y en la planta acumuladora de  $\text{Cd}^{2+}$ , *Thlaspi caerulescens*, (Palma y col. 1987; Boominathan y Doran, 2002; Boominathan y Doran 2003). Además, la planta acumuladora de  $\text{Zn}^{+2}$  y  $\text{Cd}^{+2}$ , *Arabidopsis halleri*, mostro un aumento en la actividad de ascorbato peroxidasa (AP) y peroxidasa de tipo III comparado con la planta no tolerante *A. thaliana* (Chiang y col. 2006).

Lo anterior indica una correlación entre la capacidad acumular metales pesados y de tolerar este tipo de estrés está ligado a un aumento de actividad del sistema antioxidante, principalmente a nivel de las enzimas SOD, CAT y AP.

### Sistema antioxidante no enzimático y respuesta a metales pesados en plantas

Dentro de los compuestos antioxidantes se puede nombrar glutatión (GSH) y ascorbato (ASC), también se cuentan los compuestos fenólicos hidrosolubles como tocoferoles y carotenoides liposolubles. Además, en plantas existen péptidos formados por condensación de 2 a 6 unidades de GSH denominados fitoquelatinas las cuales secuestran metales pesados, principalmente cadmio y arsénico (Cobbett, 2000).

Por otro lado, existen también pequeñas proteínas ricas en cisteína denominadas metalotioneínas (MET) que pueden unir iones metálicos tales como cobre, cadmio y zinc. En

plantas, la expresión de genes que codifican para MET es activada por cadmio, cobre y zinc (Zhou y Golsbrough, 1994; Moenne 2001; Cobbett y Golsbrough 2002). Se ha demostrado que las metalotioneinas no sólo secuestran metales y disminuyen así su toxicidad sino que tienen un efecto antioxidante directo en plantas y protegen contra el estrés biótico (Xue y col. 2008)

### Liberación de calcio en respuesta a estrés en plantas y algas

El calcio es uno de los elementos más importantes de señalización en plantas, el cual actúa como segundo mensajero en la mayoría de los sistemas de transducción de señales conocidos (Medvedev, 2005). En el citoplasma, el calcio se encuentra a una concentración mucho menor que en el retículo endoplásmico, vacuolas y organelos (Bush, 1995; Trewavas y Malhó 1998).

Para estudiar la liberación intracelular de calcio se han utilizado distintos modelos de plantas tales como tabaco, maíz y *Arabidopsis* y algunos modelos de algas tales como el de la microalga verde *Eremosphaera viridis* y el cigoto de la macroalga marina *Fucus serratus*. En estos modelos se ha utilizado la proteína aequorina, la cual es luminiscente al unir calcio, y los compuestos verde dextrano y Fluo-3AM que fluorescen al unir calcio, dependiendo de las características del indicador se puede estimar la cantidad de calcio liberado y analizar la cinética de liberación de este ión (Bauer y col. 1998; Gomez y col, 2004; Coelho y col. 2002; Inoue y col. 2005, Hu y col. 2007).

Se ha observado que frente a distintos tipos de estrés se produce un aumento de la concentración citosólica de calcio libre en plantas y algas ( $[Ca^{+2}]_{cyt}$ ). El estrés por patógenos y elicitores aumenta el calcio citosólico en plantas (Knight y col. 1991; Grant y col 2001).

También la fitohormona sintetizada en respuesta a estrés biótico y herida, ácido jasmónico produce un incremento de  $[Ca^{+2}]_{cyt}$  (Walter y col. 2007). El estrés abiótico por desecación, salinidad, frío, calor, anoxia y ozono inducen el aumento del calcio citosólico en plantas (Knight y col. 1997; Pauly y col. 2001; Knight y col. 1996; Van der Luit y col. 1999; Gong y col. 2004; Sedbrook y col. 1996; Clayton y col. 1999), mientras el estrés osmolar induce la liberación de calcio en el cigoto de *Fucus* (Coehlo y col. 2002).

En el caso de estrés por metales pesados como el cobre y el cadmio se ha observado que se produce un rápido aumento del calcio citosólico en células de tabaco (Inoue y col. 2005; Garnier y col. 2006) y que el estrés por estroncio lleva a la activación de canales de calcio que induce la liberación de calcio a nivel citosólico en la microalga verde *E. viridis* (Bauer y col. 1998)

### Mecanismos de liberación de calcio intracelular

El rápido aumento de  $[Ca^{+2}]_{cyt}$  puede ocurrir por un mecanismo denominado "liberación de calcio inducida por calcio", en que la activación de canales de calcio ubicados en la membrana plasmática permite la entrada de calcio al citoplasma lo que activa un canal de calcio sensible a calcio RyR (que puede ser inhibido por ryanodina) ubicado en el retículo endoplásmico, vacuola, mitocondria y núcleo (Kadota y cols., 2004). Además, la liberación de calcio desde reservorios celulares puede ser mediada por otros segundos mensajeros como inositol trifosfato (IP3).

Algunos ligandos tales como factores de crecimiento y hormonas se unen a un receptor específico lo que activa una proteína G la cual activa la fosfolipasa C que libera IP3 desde fosfolípidos de la membrana plasmática y éste último activa un canal de calcio sensible a IP3

(que puede ser inhibido por xestospongina C) ubicado en el retículo endoplásmico, vacuola y núcleo (Lanteri y col. 2006). Asimismo, otros ligandos se unen a un receptor específico de membrana y activan una enzima que sintetiza ADP-ribosa cíclica (cADPR) a partir de NAD o una enzima que genera ácido nicotínico adenina dinucleótido fosfato (NAADP) a partir de NADP. Se determinó que la cADPR se une a una proteína citosólica y activa el canal de calcio sensible a ryanodina del RE y que el NAADP se une a una proteína citosólica y puede actuar sobre el canal sensible a ryanodina del RE, o a un canal TPC de lisosomas (Fliegert y col. 2007, Calcraft y col. 2009).

#### Transducción de señales en respuesta a calcio

El aumento de la  $[Ca^{+2}]_{cyt}$  es transducido por distintos sensores de calcio, como proteínas quinasas, calmodulinas y calreticulinas, que unen calcio y sufren un cambio conformacional que les permite unirse a otras proteínas que regulan la expresión génica

Las calmodulinas son los sensores de calcio mejor caracterizados en eucariontes. Esta proteína no tiene actividad enzimática propia pero al unir calcio (Ca-CaM) puede unirse y activar distintas proteínas blanco (Hu y cols. 2007).

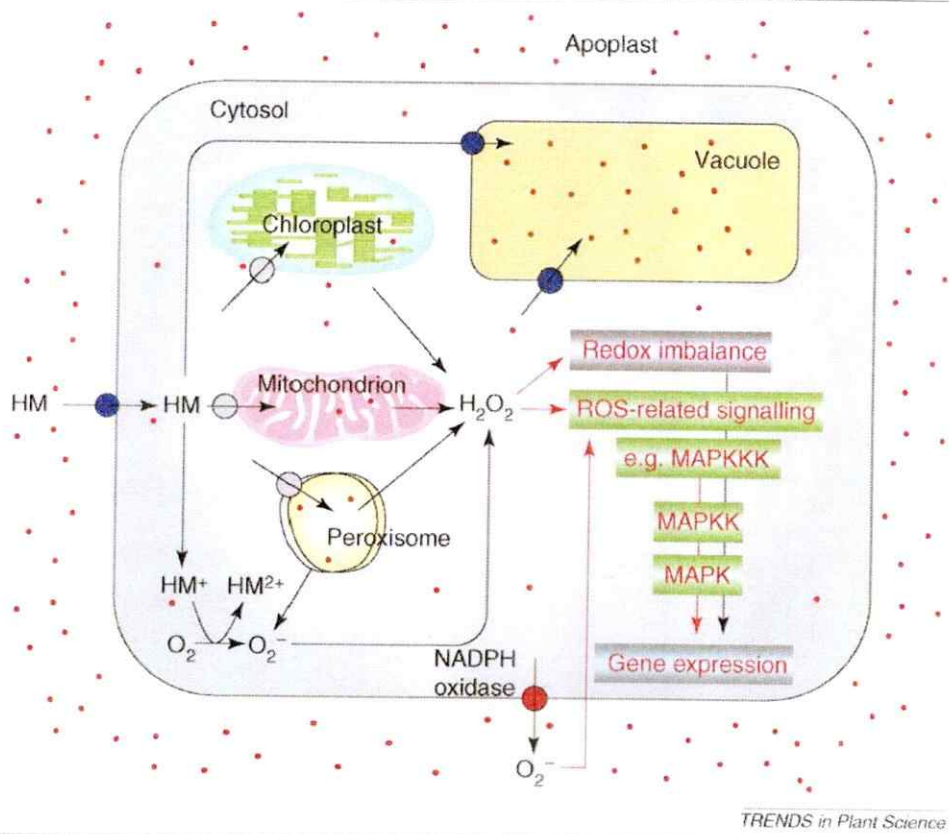
En *Arabidopsis* se ha visto que el estrés por calor, ABA y salinidad genera la liberación de calcio intracelular y la activación de calmodulinas y proteínas quinasas. (Larkindale y Knight, 2002; Zhi y col., 2008). En el caso de células de tabaco el estrés por cadmio activa canales calcio e induce la liberación de calcio intracelular lo que activa calmodulinas y proteínas quinasas (Olmos y col., 2003; Garnier y col. 2006). En maíz, se requiere Ca-CaM para activar la defensa antioxidante en respuesta a ácido abscísico (ABA) (Hu y col. 2006). Recientemente, se determinó que el estrés por cadmio, cobre y plomo en

plantas induce la activación de proteínas quinasa dependientes de calcio lo que induce un aumento de actividad MAPK (Yeh y col. 2007; Huang y Huang, 2007).

#### Transducción de señales en respuesta a estrés oxidativo en plantas

El estrés oxidativo inducido por estímulos biótico y abiótico es transducido por la activación de MAPK (proteína quinasa activada por mitógenos) las cuales fosforilan factores de regulación de la transcripción y llevan a una modulación de la expresión de genes de enzimas antioxidantes y de defensa. La captura y distribución a los organelos de metales pesados por transportadores es seguida por la generación de ROS, estimulada por la actividad redox del metal o por los efectos en el metabolismo celular, también contribuye en la generación de ROS la activación dependiente de metales pesados de la NADPH oxidasa localizada en la membrana plasmática. El exceso de ROS causa un desequilibrio redox que altera las vías de señalización como las MAPK. (Sharma y Dietz 2009; ver Fig. 2) En *Arabidopsis* se detectó que el peróxido de hidrógeno activa una MAPK vía una MAPKKK (Kovtun y col. 1997). También se detectó que en raíces de arroz el Pb induce estrés oxidativo y el inhibidor de la NADPH oxidasa, difeniliodomium (DPI), inhibe la producción de ROS y la actividad de MAPKs (Huang y Huang 2007).





TRENDS in Plant Science

**Fig. 2** Mecanismo de activación de la expresión génica mediado a en respuesta al estrés oxidativo en plantas (Sharma y Dietz 2009)

**El alga marina *Ulva compressa* y las respuestas al estrés por cobre**

Nuestro grupo de investigación se ha dedicado desde hace algunos años al estudio de los mecanismos de tolerancia a cobre en macroalgas marinas, en particular en algas que acumulan cobre tales como *Ulva compressa* (Chlorophyceae) y *Scytosiphon lomentaria* (Phaeophyceae).

El alga verde *U. compressa* de sitios contaminados con cobre del norte de Chile presentó un aumento de la actividad AP, una disminución de la cantidad de GSH y compuestos fenólicos hidrosolubles y un aumento de la cantidad de ASC comparado con algas de sitios controles no contaminados (Ratkevicius y col. 2003).

Se analizó la actividad de las enzimas antioxidantes AP y glutatión reductasa (GR) y de las enzimas de defensa fenilalanina amonio liasa (PAL) y lipoxigenasa (LOX) en *U. compressa* cultivada *in vitro* en agua de mar sin cobre y con cobre (Vera y col en preparación). La actividad de las enzimas antioxidantes AP y GR aumenta sostenidamente hasta el día 7 así como la actividad PAL. La enzima de defensa LOX presenta un peak a las 12 h pero luego su actividad cae hasta un nivel cercano al del control. DPI inhibe parcialmente la actividad AP y GR, por otra parte no inhibe la actividad PAL ni el peak de la actividad LOX.

Esto indica que los ROS son parcialmente responsables del aumento de la actividad de las enzimas antioxidantes AP y GR y que no son una señal de activación para las enzimas de defensa PAL y LOX. Por lo tanto, en este último caso es posible suponer que el gatillo podría ser el aumento de calcio intracelular.

En este trabajo se decidió analizar si el cobre induce la liberación de calcio intracelular mediante el mecanismo de liberación de calcio inducido por calcio y si el aumento de calcio intracelular actúa como señal de activación de las proteínas antioxidantes AP y metalotioneina (MET) en el alga marina *U. compressa*.

## HIPOTESIS

“El estrés por cobre induce la liberación de calcio intracelular, y este participa en la respuesta antioxidante en el alga marina *Ulva compressa*”

## OBJETIVOS

### 1. General

Determinar si el estrés por cobre induce la liberación de calcio intracelular, y si esta participa en la activación de la expresión de genes de las proteínas antioxidantes AP y MET en el alga marina *U. compressa*.

### 2. Específicos

- 2.1 Visualizar y determinar la cinética de la liberación intracelular de calcio en el alga marina *U. compressa* tratada con cobre
- 2.2. Visualizar el efecto de inhibidores de canales de calcio, calmodulinas, proteínas quinasas y del canal iónico sensible a ryanodina en la liberación de calcio intracelular y determinar la viabilidad del alga.
- 2.3 Determinar la expresión relativa de los transcritos de *met* y *ap* por RT-PCR cuantitativo en tiempo real en el alga cultivada con cobre
- 2.4. Analizar el efecto de la inhibición de canales de calcio, calmodulinas, proteínas quinasas y el canal iónico sensible a ryanodina, en el nivel relativo de transcrito de los genes *ap* y *met* por RT-PCR cuantitativo en tiempo real en el alga

## MATERIALES Y METODOS

### Obtención de alga y agua de mar

El agua de mar fue obtenida de Quintay, un sitio sin contaminación de Chile central (33° 12'S). El agua fue filtrada utilizando filtros de acetato de celulosa, el primero con poro de 0.15  $\mu\text{m}$  y el segundo con poro de 0.2  $\mu\text{m}$  y guardada a 4° C en oscuridad. El alga *Ulva compressa* fue colectada en Cachagua, un sitio sin contaminación de Chile central (32° 34'S). El alga fue transportada en agua de mar sobre hielo al laboratorio, lavada tres veces con agua de mar filtrada, limpiada manualmente para eliminar restos de otras algas y pequeños organismos marinos macroscópicos y sonicada 3 veces por un minuto usando el baño ultrasonico Branson 3200 (Danbury, CT,USA) para eliminar las bacteria adheridas a la superficie.

### Visualización de la liberación intracelular de calcio por microscopía confocal

El alga fue incubada con Fluo-3AM 20  $\mu\text{M}$ , el que al unir  $\text{Ca}^{+2}$  fluoresce a 488 nm, (Molecular Probes, Invitrogen, USA) por 40 minutos luego se realizaron 2 lavados con agua de mar y se agregó  $\text{CuCl}_2$  10  $\mu\text{M}$  (Merck, Darmstadt, Alemania). Se observó una lámina del alga utilizando un microscopio confocal Carl Zeiss modelo LSM 510 con un haz de luz incidente de longitud de onda 488 nm y se detectó la emisión de fluorescencia a 515 nm. La intensidad de fluorescencia fue cuantificada en un área de 1336  $\mu\text{m}^2$  utilizando el software del microscopio Browser V 4.2. Cada experimento se realizó en triplicado.

### Preparación de inhibidores para microscopía confocal y cultivos

Los inhibidores nifendipina (Sigma, St. Louis, USA), staurosporina (Sigma, St. Louis, USA), W-7 (Sigma, St. Louis, USA), xestospongina C (Sigma, St. Louis, USA) fueron solubilizados en DMSO a una concentración final de 50 a 100 mM. Los inhibidores verapamil (Sigma, St. Louis, USA) y ryanodina (Alexis Biochemicals, San Diego, USA) fueron solubilizados en metanol a una concentración final de 50 y 100 mM, respectivamente. Los inhibidores queleritrina (Sigma, St. Louis, USA) y flufenazina (Sigma, St. Louis, USA) fueron solubilizados en agua destilada a una concentración final de 50 mM.

### Visualización de la liberación intracelular de calcio utilizando inhibidores

El alga fue incubada por 40 minutos con verapamil, nifendipina, W-7, flufenazina, queleritrina, staurosporina o ryanodina a una concentración desde 0 a 100  $\mu$ M, o con xestospongina C a una concentración de 0 a 20  $\mu$ M o con EGTA a una concentración de 0 y 1 mM. Luego fue incubada con Fluo-3AM 20  $\mu$ M por 40 minutos y entonces con cobre 10  $\mu$ M por 50 minutos. Se observó una lámina del alga utilizando un microscopio confocal Zeiss modelo LSM510 con un haz de luz incidente de longitud de onda 488 nm y se detectó la emisión de fluorescencia a 515 nm. La intensidad de fluorescencia fue cuantificada en un área de 1.336  $\mu$ m<sup>2</sup> utilizando el software del microscopio Browser V 4.2.

### Determinación de la viabilidad del alga tratada con inhibidores

Se determinó la viabilidad del alga *U. compressa* tratada con inhibidores y cultivada sin y con cobre incubado con el fluoróforo Syto-13 0.5  $\mu\text{M}$  por 40 min después de 5 días de cultivo. Para esto se preincubo el alga con los inhibidores nifendipina 100  $\mu\text{M}$ , staurosporina 100  $\mu\text{M}$ , W-7 100  $\mu\text{M}$  y ryanodina 100  $\mu\text{M}$  por 40 min y luego se cultivado sin y con cobre 10  $\mu\text{M}$  por 5 días. Una lámina del alga fue visualizada en el microscopio confocal Carl Zeiss LSM510 utilizando luz incidente de 488nm y detectando a 515nm.

#### Cultivo *in vitro*

*U. compressa* (6 g) fue incubada en 16 mL de agua de mar suplementada con 100  $\mu\text{M}$  nifendipina, 10  $\mu\text{M}$  W-7, 100  $\mu\text{M}$  staurosporina o 100  $\mu\text{M}$  ryanodina y para los controles se cultivaron 12 g de alga en 32 mL de agua de mar sin inhibidores por 45 min. El alga tratada con inhibidores (6 g) fue transferida a 2 L de agua de mar filtrada suplementada con 10  $\mu\text{M}$  cobre ( $635\mu\text{g L}^{-1}$ ). De los 12 g de alga control 6 g de alga fueron cultivados en agua de mar sin cobre (control negativo) y 6 g de alga en agua de mar con 10  $\mu\text{M}$  cobre (control positivo) por 0, 1, 3 y 5 días. Los cultivos se mantuvieron a 15°C con un fotoperiodo de 12:12 h, 40-50  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  de irradiación, con aireación constante durante el tiempo de cultivo y el medio fue cambiado cada 48 horas. El alga fue lavada tres veces con una solución de Tris-HCl 100 mM-EDTA 10 mM, se separó para triplicados independientes y se guardó a -80 °C.

#### Obtención de RNA total del alga

El alga (0.2 g) fue cubierta con nitrógeno líquido y se homogenizó con un pistilo en un mortero de cerámica hasta obtener un polvo fino. Se agregaron 0.9 mL de tampón de

extracción del kit de extracción de RNA (Favorgen, Michigan, USA) y se continuó con la homogenización. El homogenizado fue filtrado por papel Miracloth (Calbiochem, San Diego, USA). El RNA total fue extraído utilizando el kit Favorgen de acuerdo a las instrucciones del fabricante. El RNA total fue cuantificado inicialmente agregando 10  $\mu\text{L}$  a 490  $\mu\text{L}$  de buffer Tris-HCl pH 7,5 y determinando la absorbancia a 260 nm en un espectrofotómetro Spectronic, Genesys 5. Se midió también la absorbancia a 280 nm para determinar la pureza del RNA total (relación 260/280 de 1,8 a 2,1). El RNA total fue analizado por electroforesis en gel de agarosa al 1,2 % (p/v) a 90V por 40 minutos en tampón MOPS (200mM MOPS, 50 mM acetato de sodio, 10 mM EDTA PH 7.0); El RNA total fue visualizado por tinción de bromuro de etidio 1  $\mu\text{g mL}^{-1}$  para comprobar su integridad.

El RNA total (10  $\mu\text{g}$ ) fue tratado con 1 U de DNAsa I libre de RNAsa (Biolabs, MA, USA) en un volumen final del 10  $\mu\text{L}$  por 15 minutos a 37°C. La DNAsa I fue inactivada agregando 1  $\mu\text{L}$  de EDTA 25 mM e incubando a 75°C por 10 min. El RNA total fue cuantificado utilizando el kit Quant-it Ribogreen (Invitrogen, CA, USA) de acuerdo a las instrucciones del fabricante y la cuantificación de la fluorescencia se realizó en el termociclador Rotor Gene 6000 (Corbett, Sidney, Australia). El RNA fue alicuotado y guardado a -80 °C.

#### **Análisis del nivel de transcritos de los genes que codifican para AP, MET y ACT**

Para la amplificación por RT-PCR en tiempo real de los transcritos de los genes que codifican para AP, MET y actina (ACT) se utilizó el kit Sensi Mix One Step (Quantace, Londres, UK) y el termociclador de tiempo real Rotor Gene 6000 (Corbett, Sidney, Australia). La reacción de RT-PCR se realizó en un volumen final 25  $\mu\text{L}$  que contenía 3 ng RNA total.

12.5 µL mezcla de reacción, 0.5 µl del fluoróforo Syber Green, 0,5 uL, inhibidor de RNasas y 3 mM MgCl<sub>2</sub>. La secuencia y temperatura de disociación de los partidores así como el tamaño del fragmento amplificado se muestra en la Tabla I. La etapa de transcripción reversa se realizó a 42 °C por 30 min y la transcriptasa reversa se inactivó incubando a 95°C por 10 min. La amplificación por PCR se realizó con 40 ciclos de 10 segundos a 95 °C para separar las hebras del DNA, 15-20 segundos para la hibridación de los partidores, 15-20 segundos a 72 °C para la elongación de los productos y una etapa final de 10 segundos a 78 °C para eliminar productos inespecíficos de la amplificación. La reacción de amplificación se realizó en triplicados independientes para cada muestra. El nivel de los transcritos de AP y MET se expresó como el valor  $2^{-\Delta\Delta CT}$  utilizando los transcritos del gen de actina como control interno.

Tabla I. Secuencia y temperatura de disociación de los partidores y tamaño del fragmento amplificado de los transcritos de genes que codifican para AP, MET y ACT. F: partidor sentido, R: partidor antisentido

Genes	Partidores	Tm (°C)	Segmento amplificado (pb)
Actina	F TGCTCCAGCTCATGTTCC	56.2	100
	R CGCTTCCTCGCCAACATAGG	56.4	
Ascorbato peroxidasa	F CCGACTATGCCACTTCAC	53.7	99
	R CTGCGATGCCACATTCC	53.4	
Metalotioneína	F CTAGGTGAGGTGCCATTTTCG	53	94
	R GTACGGTTACATACTTGGACAATG	55.6	

### Análisis estadístico

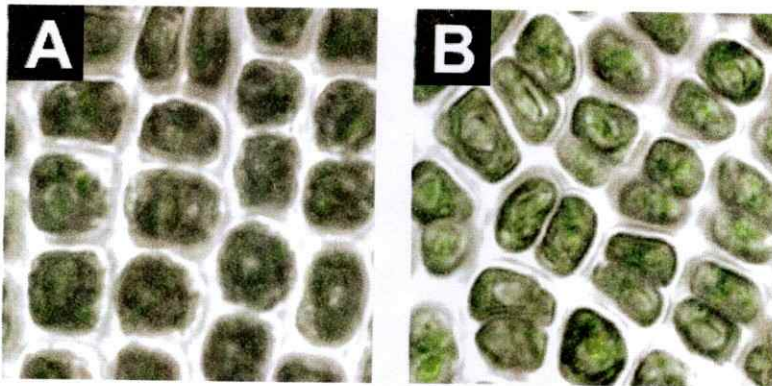
El análisis estadístico de la expresión relativa de los genes que codifican para AP y MET se hizo por el método de T-student.



## RESULTADOS

### Visualización y cinética de la liberación de calcio inducida por cobre en el alga

Se visualizó por microscopía confocal la liberación de calcio intracelular utilizando el fluoróforo Fluo3-AM e incubando el alga en agua de mar sin cobre y con cobre  $10\ \mu\text{M}$  por 50 min, se observa que el alga incubada en agua de mar sin cobre (A) presenta una fluorescencia base a los 50 minutos, mientras el alga incubada con cobre (B) presenta un notable aumento de la intensidad de fluorescencia detectada a  $515\text{nm}$  (Fig. 1).



**Fig. 3.** Visualización por microscopía confocal de la liberación de calcio intracelular en el alga incubada en agua de mar sin cobre (A) y con cobre  $10\ \mu\text{M}$  (B) por 50 min.

Entonces, se incubó el alga con cobre  $10\ \mu\text{M}$  por tiempos variables y se detectó la intensidad de fluorescencia observándose un aumento progresivo de 0 a 45 min y luego el nivel se mantuvo hasta los 70 minutos (Fig. 2). Esta cinética fue similar al ensayar concentraciones mayores de cobre (resultados no mostrados).

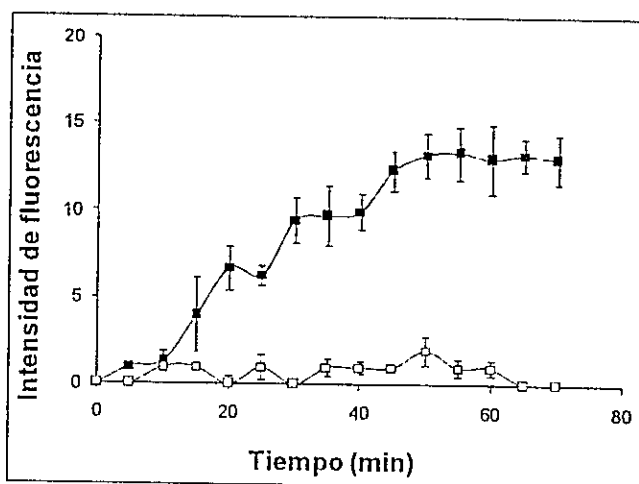


Fig. 4. Cinética de liberación de calcio intracelular en el alga incubada en agua de mar sin cobre (cuadrado blanco) y con 10  $\mu\text{M}$  de cobre (cuadrados negros) por tiempos variables.

#### Visualización y cuantificación del efecto de inhibidores de los mecanismos de liberación de calcio

En primer lugar, se visualizó la liberación de calcio intracelular en el alga tratada con 10  $\mu\text{M}$  cobre por 50 min y pre-tratada con distintas concentraciones de inhibidores por 40 min (Fig. 5). Los inhibidores utilizados fueron el quelante de calcio EDTA, los inhibidores de canales de calcio dependientes de voltaje de tipo-L verapamil y nifendipina, los inhibidores de proteínas quinasas staurosporina y queleritrina, los inhibidores de calmodulinas W-7 y flufenazina, el inhibidor del canal de calcio sensible a calcio ryanodina y el inhibidor del canal de calcio intracelular sensible a IP3 xestospongina C (Fig. 5). Se determinó la intensidad de fluorescencia en el alga tratada con cobre con y sin tratamiento con cada una de las concentraciones de los distintos inhibidores. Así, se determinó que efectivamente todos ellos inhiben la liberación de  $\text{Ca}^{+2}$  bloqueando el efecto que produce  $\text{Cu}^{+2}$  en el alga. También se determinó la concentración óptima inhibitoria para cada uno de los inhibidores las cuales fueron EDTA 0.5 mM, verapamil 100  $\mu\text{M}$ , nifendipina 100  $\mu\text{M}$ , staurosporina 100  $\mu\text{M}$ .

quelcitrina 5  $\mu\text{M}$ , W-7 100  $\mu\text{M}$ , flufenazina 50  $\mu\text{M}$ , ryanodina 100  $\mu\text{M}$  y xestospongina C 20  $\mu\text{M}$  (Fig. 5).

En segundo lugar, se visualizó la liberación de calcio intracelular en el alga tratada con 10  $\mu\text{M}$  cobre por 50 min y pre-tratada con las concentraciones óptimas de los inhibidores antes mencionados el quelante de calcio EDTA 0.5 mM, de los inhibidores de canales de calcio verapamil 100  $\mu\text{M}$  y nifedipina 100  $\mu\text{M}$ , de los inhibidores de proteínas quinasas staurosporina 100  $\mu\text{M}$  y quelcitrina 5  $\mu\text{M}$ , de los inhibidores de calmodulinas W-7 100  $\mu\text{M}$  y flufenazina 50  $\mu\text{M}$ , del inhibidor del canal de calcio sensible a calcio ryanodina 100  $\mu\text{M}$  y del inhibidor del canal de calcio intracelular sensible a IP3 xestospongina C 20  $\mu\text{M}$  por 40 min (Fig. 6). Se determinó la intensidad de fluorescencia para el control tratado con cobre y para cada uno de los inhibidores a su concentración óptima (Tabla II). Se observó una disminución de la de la intensidad de fluorescencia con todos los inhibidores.

Tabla II. Intensidad de fluorescencia y porcentaje de inhibición en el alga tratada con cobre 10  $\mu\text{M}$  y con inhibidores de los mecanismos de liberación de calcio

Inhibidor	Intensidad de Fluorescencia	% inhibición
Control positivo	12.6	0
EDTA 0.5 mM	4	68
Verapamil 100 $\mu\text{M}$	6.6	48
Nifedipina 100 $\mu\text{M}$	2.7	79
Staurosporina 100 $\mu\text{M}$	3.3	74
Quelcitrina 10 $\mu\text{M}$	6	52
W-7 10 $\mu\text{M}$	6.6	48
Flufenazina 50 $\mu\text{M}$	6.1	52
Ryanodina 100 $\mu\text{M}$	2.7	79
Xestospongina C 5 $\mu\text{M}$	6.3	50

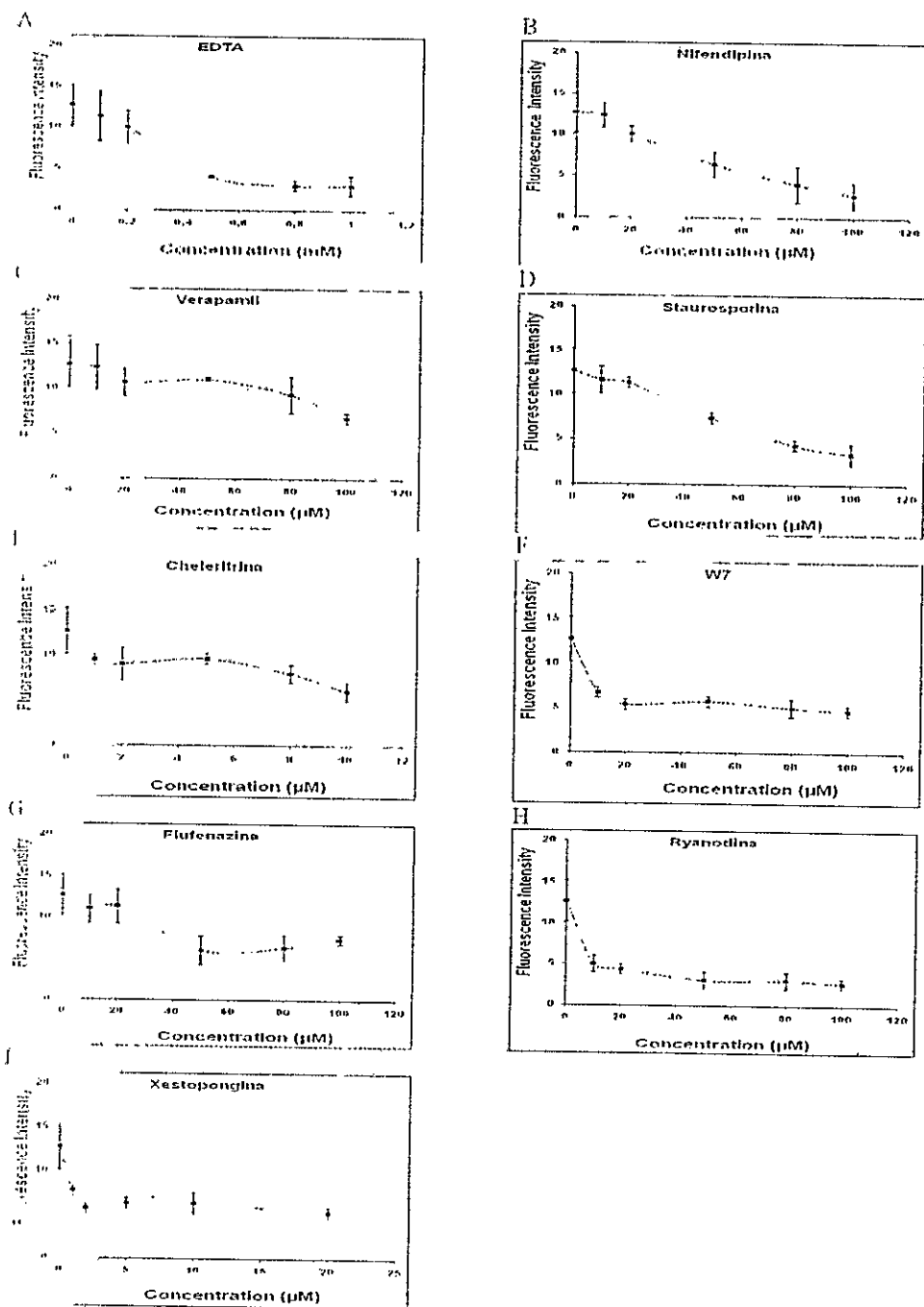
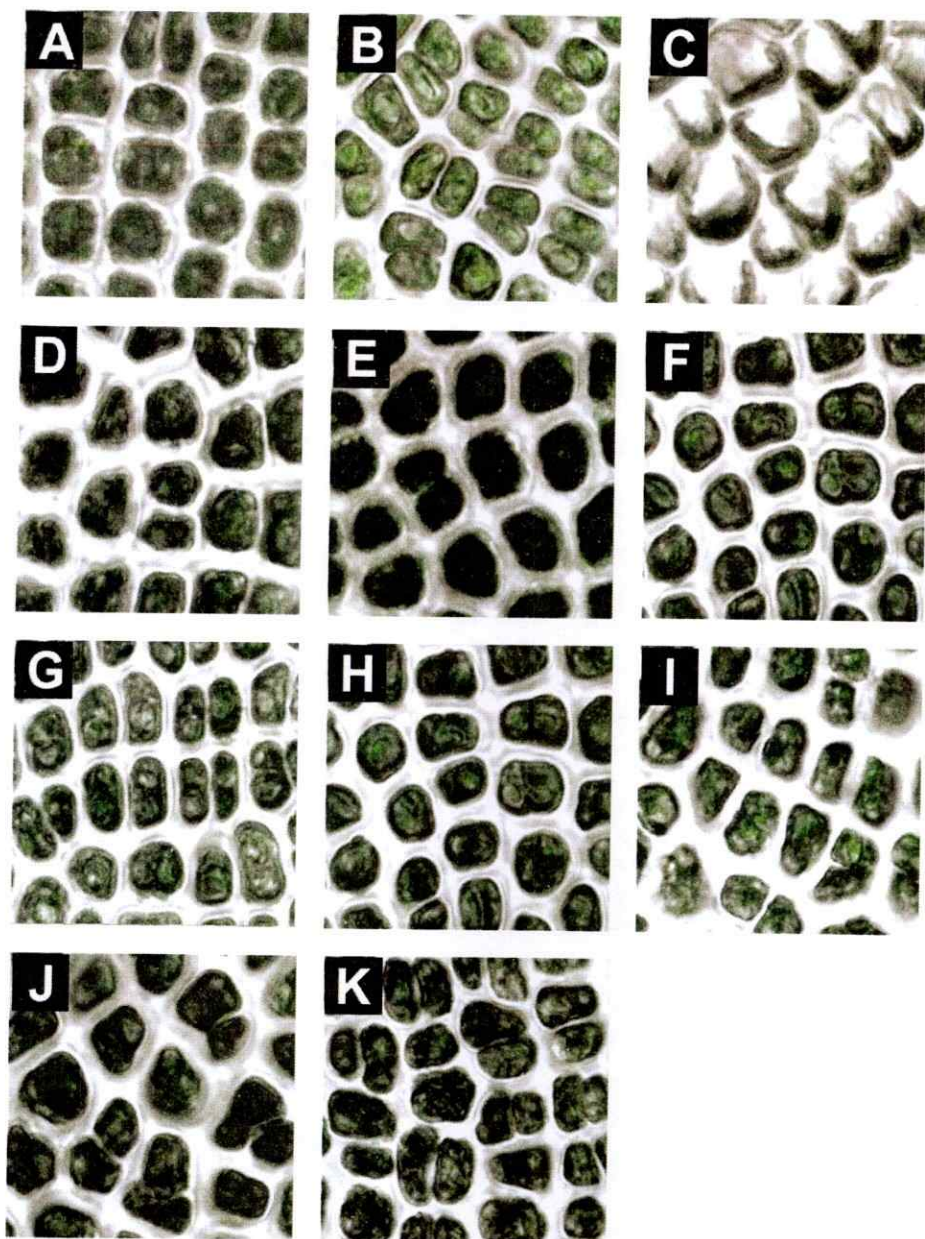


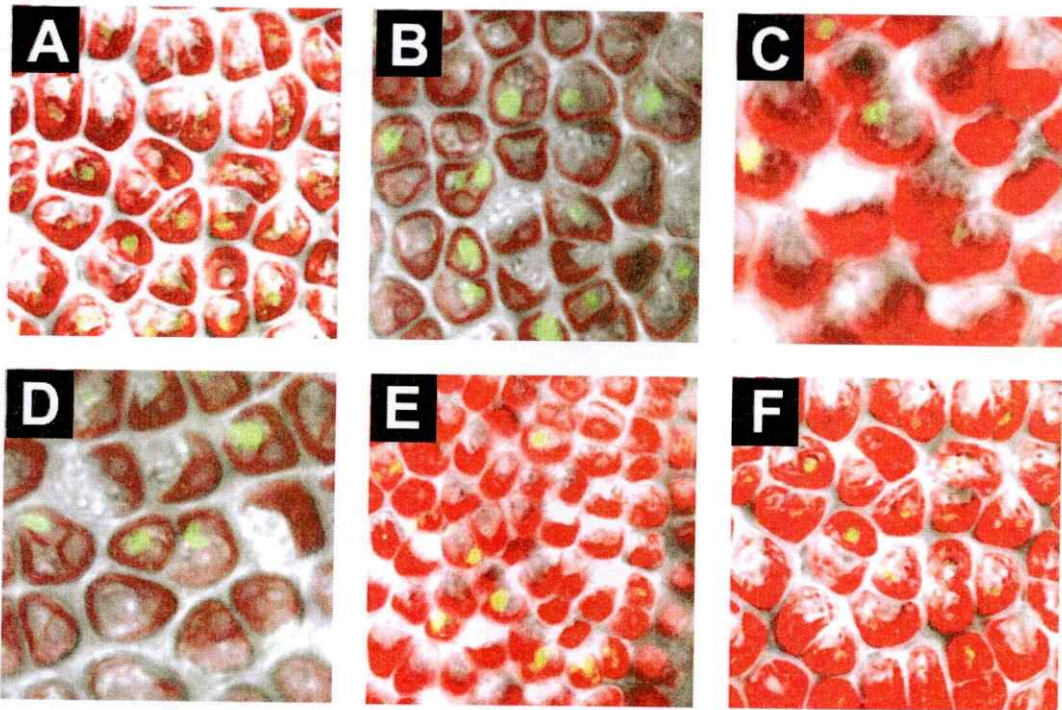
Fig.5. Liberación de calcio intracelular en el alga cultivada con cobre y con distintas concentraciones de inhibidores de los mecanismos de liberación de calcio. El alga fue incubada con distintas concentraciones de EDTA (A) nifendipina (B), verapamil (C) staurosporina (D), queleritrina (E), W-7 (F), flufenazina (G), ryanodina (H) y xestopongina (I) por 40 min y luego incubada con cobre 10 μM por 50 min. Se cuantificó la intensidad de fluorescencia del fluoróforo Fluo3.



**Fig. 6.** Visualización por microscopía confocal de la liberación de calcio intracelular en el alga tratada con cobre y con inhibidores de los mecanismos de liberación de calcio. El alga fue incubada en agua de mar sin cobre (A), con cobre 10  $\mu$ M (B) por 50 min. El alga tratada con cobre fue pretratada con los inhibidores EDTA 0.2 mM (C), nifendipina 100  $\mu$ M (D), verapamil 100  $\mu$ M (E), W-7 100  $\mu$ M (F), flufenazina 50  $\mu$ M (G), staurosporina 100  $\mu$ M (H), queleritrina 5  $\mu$ M (I), ryanodina 100  $\mu$ M (J) y xestospongina C 20  $\mu$ M (K) por 40 min.

### Viabilidad del alga tratada con inhibidores farmacológicos

El alga fue tratada con con nifendipina 100 $\mu$ M, staurosporina 100  $\mu$ M, W-7 10  $\mu$ M y ryanodina 100  $\mu$ M por 40 min y luego cultivada en agua de mar con cobre 10  $\mu$ M por 5 días. Se determinó la viabilidad del alga por microscopía confocal utilizando el fluoróforo Syto-13 que tiñe verde el núcleo en las células viables (Fig. 7). Así, se determinó que los inhibidores de la liberación de calcio no afectan la viabilidad del alga cultivada con cobre 10  $\mu$ M por 5 días.



**Fig. 7.** Visualización por microscopía confocal de viabilidad del alga tratada con inhibidores de los mecanismos de liberación de calcio y cultivada con cobre 10  $\mu$ M por 5 días. Las algas fueron cultivadas en agua de mar sin cobre (A) y con 10  $\mu$ M cobre (B) por 5 días. Las algas tratadas con cobre fueron preincubadas con los inhibidores nifendipina 100  $\mu$ M (C), staurosporina 100  $\mu$ M (E), W-7 100  $\mu$ M (D) y ryanodina 100  $\mu$ M (F). Se detectó la viabilidad incubando las lagas con el fluoróforo Syto-13 0.5  $\mu$ M por 40 min.

### Nivel de transcritos de los genes AP y MET en el alga cultivada con cobre

El nivel de los transcritos del gen *ap* que codifica para la enzima antioxidante AP fue cuantificado por RT-PCR en tiempo real en el alga cultivada sin cobre y con 10  $\mu\text{M}$  cobre por 0, 1, 3 y 5 días (Fig. 8A). Se utilizó el nivel de los transcritos del gen de actina (ACT) como control interno y los resultados fueron expresaron como  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ . Los transcritos de AP llegaron a un máximo al tercer día aumentando 3 veces y se mantuvieron así hasta el día 5. El fragmento amplificado de los transcritos de *ap* mostró una temperatura de disociación de 86  $^{\circ}\text{C}$  (Fig. 8B) lo que indica que es un producto de amplificación único. Y el Ct para este gen fue entre 23 y 25 (Fig. 8C)

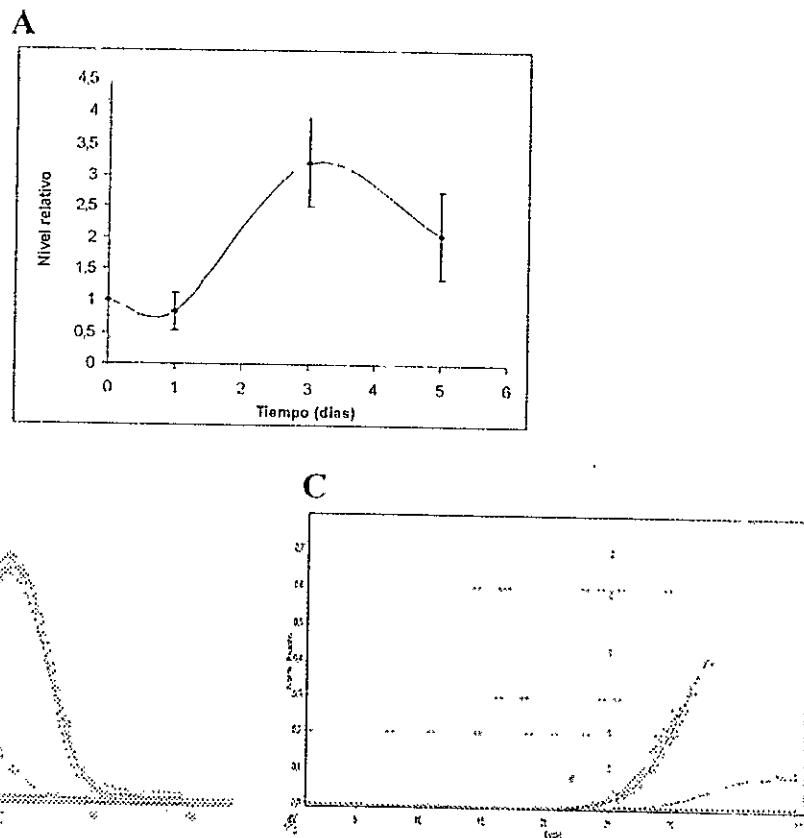
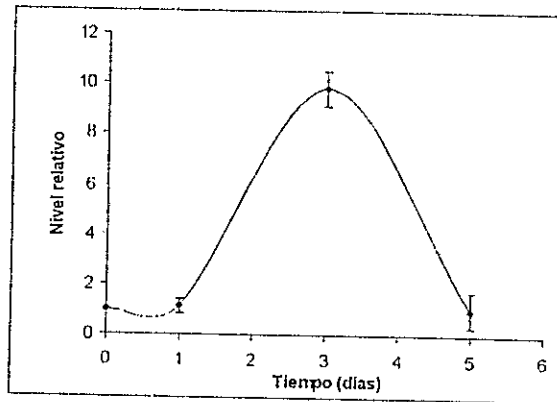


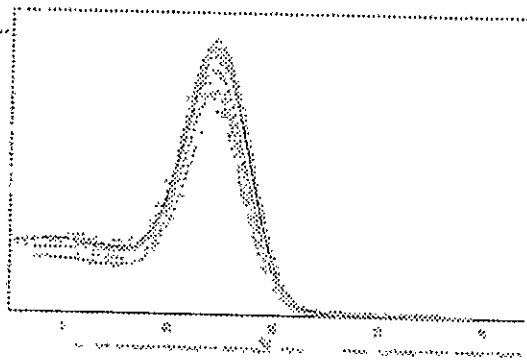
Fig. 8. Cinética del nivel relativo de transcritos del gen AP en el alga cultivada con 10  $\mu\text{M}$  cobre (A). El nivel relativo de los transcritos fue expresado como  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ . Gráficos de temperatura de disociación del fragmento amplificado por RT-PCR de los transcritos de AP (B). Gráfico de número de ciclos de amplificación (Ct) para los transcritos de AP (C)

El nivel de los transcritos del gen *met* que codifica para la proteína antioxidante y quelante de metales pesados MET fue cuantificado por RT-PCR en tiempo real en el alga cultivada sin cobre y con 10  $\mu\text{M}$  cobre por 0, 1, 3 y 5 días. El nivel relativo de los transcritos del gen *met* (Fig. 9) fue expresado como  $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$  utilizando los transcritos del gen *act* como control interno. Los transcritos de *met* llegaron a un máximo al tercer día, aumentando aprox. 10 veces, y disminuyeron a nivel del control el día 5. El fragmento de amplificación de *met* mostró una temperatura de disociación de 82.5  $^{\circ}\text{C}$  lo que indica que es un producto de amplificación único (Fig. 9B). Y el Ct para este gen fue entre 19 y 24 (Fig. 9C)

A



B



C

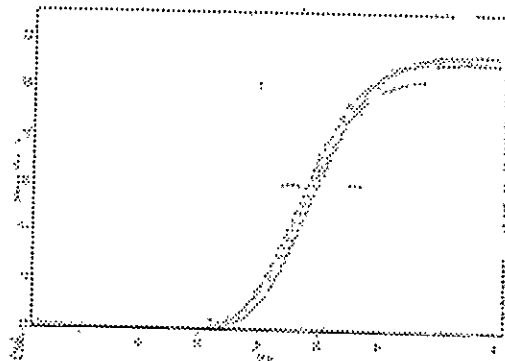


Fig. 9. Cinética del nivel relativo de transcritos del gen *met* en el alga cultivada con 10  $\mu\text{M}$  cobre. El nivel relativo de los transcritos fue expresado como  $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$  (A.). Gráfico de la temperatura de disociación del fragmento amplificado por RT-PCR de los transcritos del gen *met* (B) y gráfico de número de ciclos de amplificación (CT) de los transcritos del gen de *met* (C)



### Efecto de inhibidores en el nivel de transcritos de los genes AP y MET en el alga tratada con cobre por 3 días

Se determinó el nivel relativo de transcritos de *ap* en el alga tratada con cobre 10  $\mu\text{M}$  por 3 días y pre-tratada con el inhibidor de canales de calcio dependiente de voltaje de tipo L nifendipina 100  $\mu\text{M}$ , el inhibidor de calmodulinas W-7 100  $\mu\text{M}$ , el inhibidor de proteína quinasas staurosporina 100  $\mu\text{M}$  y el inhibidor del canal de calcio sensible a calcio ryanodina 100  $\mu\text{M}$  (Fig. 10). Los inhibidores nifendipina, W-7, staurosporina y ryanodina disminuyen el nivel relativo de transcritos de AP en 41, 68, 58 y 74%, respectivamente (Tabla III)

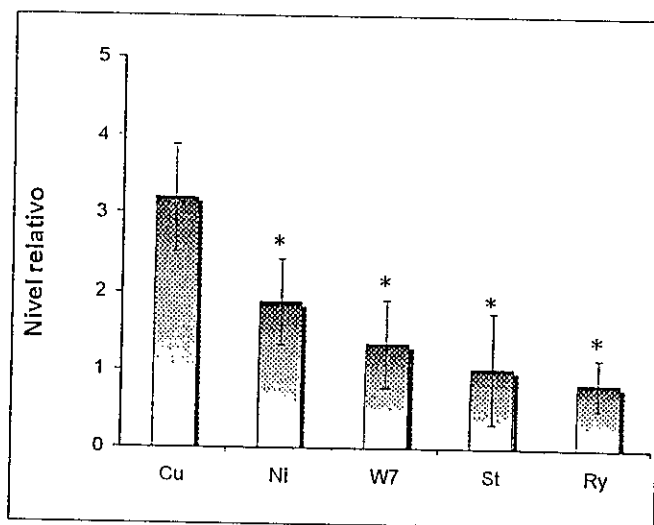


Fig. 10. Efecto de inhibidores en la cantidad relativa del transcrito del gen AP en el alga tratada con de cobre por 3 días. El alga fue preincubada con nifendipina 100  $\mu\text{M}$  (NI), W-7 100  $\mu\text{M}$ , staurosporina 100  $\mu\text{M}$  (St) y ryanodina 100  $\mu\text{M}$  (Ry) por 45 min y luego cultivada en agua de mar sin (C) y con cobre 10  $\mu\text{M}$  (Cu) por 3 días. El nivel relativo del transcrito fu expresado como  $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ .

Tabla III. Nivel relativo de transcritos de los genes *ap* y *met* en el alga *U. compressa* tratada con 10  $\mu$ M cobre y con inhibidores

	AP		MET	
	$2^{-\Delta\Delta CT}$	% inhibición	$2^{-\Delta\Delta CT}$	% inhibición
Control positivo	3,20	0	9,81	0
Nifedipina 100 $\mu$ M	1,88	41	5,10	48
Staurosporina 100 $\mu$ M	1,03	68	1,70	83
W-7 10 $\mu$ M	1,35	58	1,21	88
Ryanodina 100 $\mu$ M	0,85	74	17,3	-76

El mismo proceso fue realizado para gen *met* observando una reducción en el nivel de transcritos de *met* en 48, 83, 88 %, respectivamente (Fig. 9; Tabla III). Interesantemente, el inhibidor ryanodina mostró un aumento de la amplificación de transcritos *met* (Fig. 9) correspondiente a una disminución del nivel del transcrito detectado originalmente con temperatura de disociación de 82.5  $^{\circ}$ C y al aumento de la expresión un transcrito probablemente *met* pero con temperatura de disociación de 88  $^{\circ}$ C (Fig. 10).

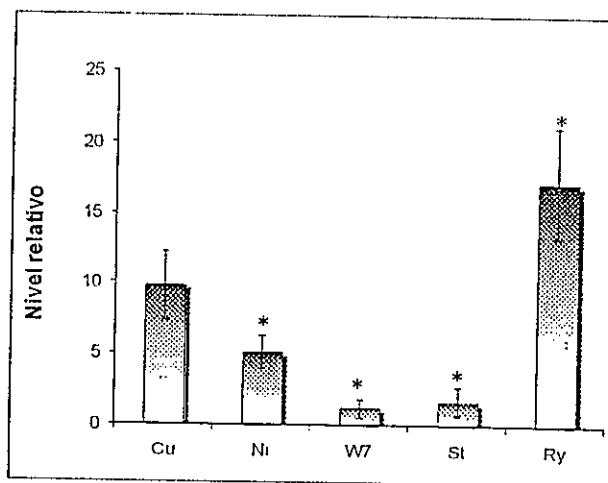


Fig. 11. Efecto de inhibidores en la cantidad relativa del transcrito del gen *met* en el tratada con nifendipina 100  $\mu$ M (Ni), W-7 100  $\mu$ M (W7), staurosporina 100  $\mu$ M (St) y ryanodina 100  $\mu$ M (Ry) por 45 min y luego cultivada en agua de mar con cobre 10  $\mu$ M o sólo con cobre (Cu) por 3 días. El nivel relativo del transcrito fue expresado como  $2^{-(\Delta\Delta CT)}$ .

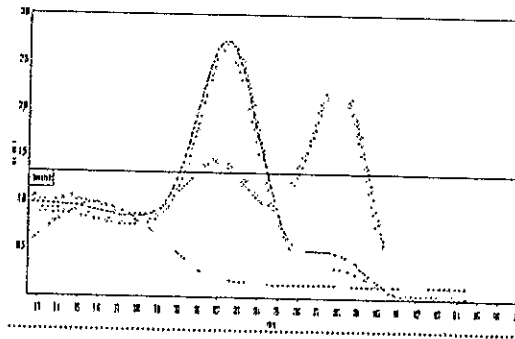


Fig.12. Temperatura de disociación del fragmento de DNA amplificado por RT-PCR de los transcritos del gen *met* en el alga tratada con el ryanodina 100  $\mu$ M por 40 min y con cobre 10  $\mu$ M cobre por 3 días.

## DISCUSION

En este trabajo se verificó en primer lugar que el estrés por cobre induce la liberación de calcio intracelular en el alga marina *U. compressa*. La concentración de cobre ensayada (10  $\mu\text{M}$ ), así como concentraciones mayores (no mostradas), mostró que la liberación de calcio intracelular es inducida por cobre en el alga. La liberación de calcio intracelular en respuesta a cobre sigue una cinética de aumento sostenido hasta los 45 min y el nivel máximo se mantiene hasta los 70 min.

Esta respuesta inducida por cobre es similar a la respuesta inducida por GSH 20 mM en hojas de tabaco que expresan aequorina en las cuales el calcio liberado alcanza un nivel máximo a la hora y se mantiene hasta las 2 horas (Gomez y col. 2004). Asimismo, la respuesta a cobre en el alga coincide con la respuesta inducida por ácido jasmónico 1 mM en células de tabaco en las cuales la concentración de calcio aumentó en el núcleo, y no en el citoplasma, hasta los 15 minutos y se mantuvo hasta los 80 min (Walters y col. 2007). Además, la respuesta a cobre en el alga es similar a la inducida por anoxia en plantas de *A. thaliana* que expresan aequorina en las cuales el aumento del calcio intracelular aumenta hasta los 10 minutos y se mantiene hasta los 50 minutos (Sedbrook y col. 1996) y a la respuesta a ácido abscísico (ABA) 10  $\mu\text{M}$  y peróxido de hidrógeno 1 mM en células de maíz donde la liberación de calcio citosólico comienza a los 4 min y se mantiene hasta los 20 min (Hu y col. 2007)

Sin embargo, la respuesta a cobre en el alga contrasta con la respuesta a cobre entre 100 a 10  $\mu\text{M}$  en células de tabaco que expresan aequorina en las cuales el cobre 100  $\mu\text{M}$  induce un aumento de calcio al minuto, lo que se mantiene hasta los 30 min pero el cobre 10  $\mu\text{M}$  no induce un aumento del calcio comparado con células controles (Inoue et al 2005). Asimismo, la respuesta a cobre del alga contrasta con la respuesta a cadmio 200  $\mu\text{M}$  en células

de tabaco que expresan aequorina en las cuales el calcio aumenta hasta los 6 min. se mantiene hasta los 15 min y luego baja lentamente (Garnier y col. 2006). La respuesta a estroncio en la microalga alga *E. viridis* es también diferente ya que se registran peaks de calcio que comienzan a los 10 min y se mantienen por al menos 2 horas (Bauer y col. 1998).

En segundo lugar, se determinó que el cobre induce la liberación de calcio intracelular en alga *U. compressa* mediante un mecanismo que involucra la activación de canales de calcio dependientes de voltaje de tipo L sensibles a los inhibidores nifendipina y verapamil la activación de canales de calcio sensibles a calcio y al inhibidor ryanodina y a la activación de canales de calcio sensibles a IP3 y al inhibidor xestospongina C. Cabe mencionar que la inhibición de liberación de calcio intracelular fue mayor al utilizar nifendipina y ryanodina que cuando se utilizó xestospongina C lo que indica que el mecanismo principal es la liberación de calcio inducida por calcio (aunque también habría liberación de calcio mediada por IP3). Esto es similar a los resultados obtenidos en células de tabaco tratadas con cadmio en las cuales se observó que tanto inhibidores de canales de calcio, lantano y verapamil, así como los inhibidores de fosfolipasa C que libera IP3, sulfato de neomicina y U73122, inhiben la liberación intracelular de calcio. Esto indica que la liberación de calcio en respuesta a cadmio en células de tabaco involucra tanto a canales de calcio sensibles a calcio como a IP3 (Garnier y col. 2006). En el caso de células de tabaco tratadas con cobre se observó que una liberación de calcio intracelular que fue inhibida por lantano lo que indica que canales de calcio de la membrana plasmática están involucrados en la respuesta a cobre en tabaco (Inoue y col. 2005).

En el caso de la microalga verde *E. viridis* tratada con estroncio, los peaks de calcio fueron completamente inhibidos por ryanodina indicando que en este caso el mecanismo de aumento de calcio sería la liberación de calcio inducida por calcio (Bauer y col. 1998).

En tercer lugar, se detectó que calmodulinas y proteínas quinasas dependientes de calcio participan en la transducción de la señales inducida por cobre en el alga *U. compressa*. Esto se evidenció por el efecto de los inhibidores de calmodulinas, W-7 y flufenazina, y los inhibidores de proteínas quinasas, staurosporina y queleritrina, los cuales indujeron una disminución de la liberación de calcio intracelular en el alga. Esto concuerda con lo observado en células de tabaco en las cuales la liberación de calcio intracelular inducida por cadmio fue inhibida con W-7 y staurosporina indicando la participación de calmodulinas y proteínas quinasas en la respuesta a cadmio en tabaco (Olmos y col. 2003; Garnier y col. 2006). Asimismo, células de maíz tratadas con ABA y peróxido de hidrógeno presentan un aumento del calcio intracelular y un posterior aumento de la cantidad de transcritos de calmodulinas (Hui y col. 2007). Además, plantas de tabaco expuestas a viento y frío mostraron un aumento del nivel de transcritos de calmodulina posterior al incremento del calcio citosólico (Van der Lant y col. 1999).

Finalmente, se determinó que la liberación de calcio intracelular determina, al menos en parte, la activación de la expresión de los genes de las proteínas antioxidantes *AP* y *MET*. El efecto de los inhibidores de canales de calcio (nifendipina), del canal de calcio sensible a calcio (ryanodina), de calmodulina (W-7) y de proteínas quinasas (staurosporina) muestran que la liberación de calcio intracelular participa en la activación de calmodulinas y proteínas quinasas las cuales a su vez participan en la activación de la expresión de los genes *ap* y *met*.

La disminución del nivel relativo de expresión de *ap* dada por nifendipina muestra que probablemente la entrada inicial de calcio es secundaria en importancia al compararla con la liberación de calcio mediada por calcio y la acción de proteínas quinasas y calmodulinas, lo que se puede deber a la acción de MAPKs. Se ha demostrado que proteínas quinasas y calmodulinas estarían involucradas en la activación de MAPKs (Yeh y col. 2007).

Por otra parte la activación de *met* puede estar dada por un factor de transcripción de tipo MTF-1 o bien por una casacada de señales como MAPK. Se ha demostrado que  $\text{Cu}^{+2}$  tiene la capacidad de activar 3 tipos de MAPK distintas en la línea celular COS-7 y que el uso de staurosporina disminuye el nivel de transcritos de *met* por lo que las proteínas quinasas serían esenciales tanto para la transcripción por influencia directa del metal (factor de transcripción MTF-1) o bien por cascacada de señales producida por el estrés oxidativo (Mattie y Freddman, 2003)

Es importante mencionar que la inhibición del nivel de transcritos de AP y MET fue solo parcial lo que indica que debe existir otra señal que determina también la activación de estos genes, probablemente los ROS como se determinó en experimentos previos (ver introducción).

Un hecho sorprendente fue que, concomitante con la inhibición del transcrito detectado inicialmente por los partidores de *met*, y al inhibir la liberación de calcio intracelular con ryanodina, apareció un nuevo fragmento amplificado que probablemente debería corresponder a un nuevo gen *met* expresado al desaparecer la señal de calcio liberado por los canales de calcio sensibles a ryanodina. Esto sugiere que en *U. compressa* deben existir varios genes de metalotioneínas que responden tanto a calcio (liberado por el canal sensible a IP3) o a ROS producidos en respuesta al estrés por cobre en el alga.

Es importante mencionar que el efecto de los inhibidores sobre la expresión de los genes AP y MET no se debe a un colapso de las células ya que, como se observó utilizando un compuesto fluorescente que detecta viabilidad, el alga está viable después del tratamiento con inhibidores y cultivada con cobre 10  $\mu\text{M}$  por 5 días.

## CONCLUSIONES

- La exposición a 10  $\mu\text{M}$  de cobre por 50 minutos induce la liberación de calcio intracelular en el alga *U. compressa*
- El aumento de la concentración de calcio intracelular en respuesta a cobre en *U. compressa* presenta una cinética de aumento sostenido hasta los 45 min y el nivel máximo se mantiene hasta los 70 min.
- La liberación de calcio intracelular en respuesta a cobre en *U. compressa* está mediada por un mecanismo de liberación de calcio inducido por calcio además de un mecanismo mediado probablemente por IP3.
- La transducción de la señal de calcio involucra la activación de calmodulinas y proteínas quinasas
- La liberación de calcio intracelular y la activación de calmodulinas y proteínas quinasas determina, al menos en parte, la activación de la expresión de los genes de proteínas antioxidantes AP y MET



## BIBLIOGRAFIA

- Alvarez, A., Pennell, R., Meijer, P., Idhiwaka, A., Dixon, R., Lamb, C. 1998. Reactive oxygen intermediates mediate a systemic signal network in the establishment of plant immunity. *Cell* 92, 773-784
- Apel, K., Hirt, H. 2004. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu. Rev. Plant Biol.* 55, 373-99
- Asada, K. 2006. Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. *Plant Physiol.* 141, 391-396
- Baker, J., Orlandi, E. 1997. Active oxygen in plant pathogenesis. *Annu. Rev. Phytopathol.* 33, 299-321
- Basu, U., Good, A.G., Taylor, G.J. 2001. Transgenic *Brassica napus* plants overexpressing aluminium-induced mitochondrial manganese superoxide dismutase cDNA are resistant to aluminium. *Plant Cell Environ.* 24, 1269-1278
- Bauer, C., Plieth, C., Bethmann, B., Popescu, O., Hansen, U., Simonis, W., Schonknecht, G. 1998. Strontium-induced repetitive calcium spikes in a unicellular green alga. *Plant Physiol.* 117, 545-57.
- Bienert, G., Müller, A., Kristiansen, K., Schulz, A., Müller, I., Schjoerring, J., Jahn, T. 2007. Specific aquaporins facilitate the diffusion of hydrogen peroxide across membranes. *J Biol. Chem.* 282, 1183-92.
- Boominathan, R., Doran, P.M. 2002. Ni-induced oxidative stress in roots of Ni hyperaccumulator, *Alyssum bertolonii*. *New Phytol.* 156, 205-215
- Boominathan, R., Doran, P.M. 2003. Cadmium tolerance and antioxidative defenses in hairy roots of the cadmium hyperaccumulator, *Thlaspi caerulescens*. *Biotechnol. Bioeng.* 20, 158-67
- Briat, J., Lebrun, M. 1999. Plant responses to metal toxicity. *C. R. Acad. Sci. Paris* 322, 43-51
- Bush, D.S. 1995. Calcium regulation in plant cells and its role in signaling. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 46, 95-122.
- Calcraft, P.J., Ruas, M., Pan, Z., Cheng, X., Arredouani, A., Hao, X., Tang, J., Rietdorf, K., Teboul, L., Chuang, K.T., Lin, P., Xiao, R., Wang, C., Zhu, Y., Lin, Y., Wyatt, C.N., Parrington, J., Ma, J., Evans, A.M., Galione, A., Zhu, M.X. 2009. NAADP mobilizes calcium from acidic organelles through two-pore channels. *Nature* 459, 596-600

- Chen, P., Lee, K., Chi, W., Hirt, H., Chang, C., Huang, H. 2008. Possible involvement of MAP kinase pathways in acquired metal-tolerance induced by heat in plants. *Planta* 228, 499–509
- Chiang, H., Lo, J., Yeh, K. 2006. Genes associated with heavy metal tolerance and accumulation in Zn/Cd hyperaccumulator *Arabidopsis halleri*: a genomic survey with cDNA microarray. *Environ. Sci. Technol.* 40, 6792–6798
- Clayton, H., Knight, M.R., Knight, H., McAinsh, M.R., Hetherington, A.M. 1999. Dissection of the ozone-induced calcium signature. *Plant J.* 17, 575-9
- Cobbett, C.S. 2000. Phytochelatins and their roles in heavy metal detoxification. *Plant Physiol.* 123, 825-32
- Cobbett, C., Goldsbrough, P. 2002. Phytochelatins and metallothioneins: roles in heavy metal detoxification and homeostasis. *Annu. Rev. Plant. Biol.* 123, 825–832
- Coelho, S.M., Taylor, A.R., Ryan, K.P., Sousa-Pinto, I., Brown, M.T., Brownlee, C. 2002. Spatiotemporal patterning of reactive oxygen production and Ca<sup>2+</sup> wave propagation in *Fucus* rhizoid cells. *Plant Cell* 14, 2369-2381
- Contreras, L., Moenne, A., Correa, J. A. 2005. Antioxidant responses in *Scytosiphon lomentaria* (Phaeophyceae) inhabiting copper-enriched coastal environments. *J. Phycol.* 41, 1184-1195
- Darko, E. 2004. Aluminium toxicity, aluminium tolerance and oxidative stress in an Al-sensitive wheat genotype and in Al-tolerant lines developed by in vitro microspore selection. *Plant Sci.* 166, 583–591.
- Del Rio, L.A., Corpas F.J., Sandalio, L.M., Palma, J.M., Gómez, M., Barroso, J.B. 2002. Reactive oxygen species, antioxidant systems and nitric oxide in peroxisomes. *J. Exp. Bot.* 53, 1255-72
- Desikan, R., Horák, J., Chaban, C., Mira-Rodado, V., Witthöft, J., Elgass, K., Grefen, C., Cheung, M., Meixner, A., Hooley, R., Neill, S., Hancock, J., Harter, K. 2008. The histidine kinase AHK5 integrates endogenous and environmental signals in *Arabidopsis* guard cells. *Plos One* 18, 2491
- Flegert, R., Gasser, A., Guse A. H. 2007. Regulation of calcium signalling by adenine-based second messengers. *Biochem. Soc. Trans.* 35, 109-14
- Freeman, J., Persans, M., Nieman, K., Albrecht, C., Peer, W., Pickering, I., Salt, D. 2004. Increased glutathione biosynthesis plays a role in nickel tolerance in *Thlaspi* nickel hyperaccumulators. *Plant Cell* 16, 2176-91
- Fujita, M., Fujita, Y., Noutoshi, Y., Takahashi, F., Narusaka, Y., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K. 2006. Cross-talk between abiotic and biotic stress responses: a current view

- from the points of convergence in the stress signaling networks. *Curr. Opin. Plant Biol.* 9, 436-442
- Gadjev, I., Vanderauwera, S., Gechev, T., Laloi, C., Minkov, I., Shulaev, V., Apel, K., Inzé, D., Mittler, R., Van Breusegem, F. 2006. Transcriptomic footprints disclose specificity of reactive oxygen species signaling in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 141, 436-445
- Garnier, L., Simon-Plas, F., Thuleau, P., Agnel, J.P., Blein, J.P., Ranjeva, R., Montillet, J.L. 2006. Cadmium affects tobacco cells by a series of three waves of reactive oxygen species that contribute to cytotoxicity. *Plant Cell Environ.* 29, 1956-1969
- Gomez, L.D., Noctor, G., Knight, M.R., Foyer, C.H. 2004. Regulation of calcium signaling and gene expression by glutathione. *J. Exp. Bot.* 55, 1851-1859
- Gong, D., Guo, Y., Schumaker, K.S., Zhu, J.K. 2004. The SOS3 family of calcium sensors and SOS2 family of protein kinases in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 134, 919-926.
- Grant, S.K., Bansal, A., Mitra, A., Feighner, S.D., Dai, G., Kaczorowski, G.J., Middleton, R.E. 2001. Delay of intracellular calcium transients using a calcium chelator: application to high-throughput screening of the capsaicin receptor ion channel and G-protein-coupled receptors. *Anal. Biochem.* 29, 27-35
- Gupta, R., Luan, S. 2003. Redox control of protein tyrosine phosphatases and mitogen-activated protein kinases in plants. *Plant Physiol.* 132, 1149-52
- Hammond-Kosack, K.E., Jones, J. 1996. Resistance gene-dependent plant defense responses. *Plant Cell* 8, 1773-1791.
- Hartley-Whitaker, J., Ainsworth, G., Vooijs, R., Ten Bookum, W., Schat, H., Meharg, A.A. 2001. Phytochelatins are involved in differential arsenate tolerance in *Holcus lanatus*. *Plant Physiol.* 126, 299-306
- Hevno, E., Klose, C., Krieger-Liszkay, A. 2008. Origin of cadmium-induced reactive oxygen species production: mitochondrial electron transfer versus plasma membrane NADPH oxidase. *New Phytol.* 179, 687-699
- Houde, M., Diallo, A.O. 2008. Identification of genes and pathways associated with aluminum stress and tolerance using transcriptome profiling of wheat near-isogenic lines. *BMC Genomics.* 27, 400-413
- Hu, X., Jiang, M., Zhang, J., Zhang, A., Lin, F., Tan, M. 2007. Calcium-calmodulin is required for abscisic-acid induced antioxidant defense and functions upstream and downstream of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production in leaves of maize (*Zea mays*) plants. *New Phytol.* 173, 27-38
- Huang, T., Huang H. 2007. ROS and CDPK-like kinase-mediated activation of MAP kinase in rice roots exposed to lead. *Chemosphere* 71, 1377-1385

- Inoue, H., Kudo, T., Kamada, H., Kimura, M., Yamaguchi, I., Hamamoto, H. 2005. Copper elicits an increase in cytosolic free calcium in cultured tobacco cells. *Plant Physiol. Biochem.* 43, 1089-1094
- Kadota, Y., Furuichi, T., Ogasawara, Y., Goh, T., Higashi, K., Muto, S., Kuchitsu, K. 2004. Identification of putative voltage-dependent Ca<sup>2+</sup>-permeable channels involved in cryptogem-induced Ca<sup>2+</sup> transients and defense responses in tobacco BY-2 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 317, 823-830.
- Khan, S., Dyer, J., Michelangeli, F. 2001. Inhibition of the type 1 inositol 1,4,5-trisphosphate-sensitive Ca<sup>2+</sup> channel by calmodulin antagonists. *Cell Signal.* 13, 57-63.
- Knight, H., Trewavas, A.J., Knight, M.R. 1996. Cold calcium signaling in *Arabidopsis* involves two cellular pools and a change in calcium signature after acclimation. *Plant Cell* 8, 189-503
- Knight, H., Trewavas, A.J., Knight, M.R. 1997. Calcium signalling in *Arabidopsis thaliana* responding to drought and salinity. *Plant J.* 12, 1067-1078.
- Knight, M.R., Campbell, A.K., Smith, S.M., Trewavas, A.J. 1991. Transgenic plant aequorin reports the effects of touch and cold shock and elicitors on cytoplasmic calcium. *Nature* 352, 524-526
- Kovtun, Y., Chiu, L., Tena, G., Sheen, J. 1997. Functional analysis of oxidative stress activated mitogen-activated protein kinase cascade in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 2940-2945
- La Caméra, S., Gouzerh, G., Dhondt, S., Hoffmann, L., Fritig, B., Legrand, M., Hertz, T. 2004. Metabolic reprogramming in plant innate immunity: the contributions of phenylpropanoid and oxylipin pathways. *Immunol. Rev.* 198, 267-284
- Lanteri, M.L., Pagnussat, G.C., Lamattina, L. 2006. Calcium and calcium-dependent protein kinases are involved in nitric oxide- and auxin-induced adventitious root formation in cucumber. *J. Exp. Bot.* 57, 1341-51
- Markindale, J., Knight, M.R. 2002. Protection against heat stress-induced oxidative damage in *Arabidopsis* involves calcium, abscisic acid, ethylene, and salicylic acid. *Plant Physiol.* 128, 682-695
- Love, J., Brownlee, C., Trewavas, A.J. 1997. Ca<sup>2+</sup> and calmodulin dynamics during photopolarization in *Fucus serratus* zygotes. *Plant Physiol.* 115, 249-261
- Luna, C., Gonzalez, C., Trippi, V.S. 1994. Oxidative damage caused by an excess of copper in oat leaves. *Plant Cell Physiol.* 35, 11-15

- Mahalingam, R., Jambunathan, A., Gunjan, M., Faustin, E., Weng, H., Ayoubi, P. 2006. Analysis of oxidative signaling induced by ozone in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Environ.* 29, 1357-1371
- Mattie, M.D., Freedman, J.H. 2004. Copper-inducible transcription: regulation by metal- and oxidative stress-responsive pathways. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 286, 293-301
- Medvedev, S.S. 2005. Calcium signaling system in plants. *Russian J. Plant Physiol.* 52, 249-270
- Mittler, R., Vanderauwer, A.S., Gollery, M., Van Breusegem, F. 2004. Reactive oxygen gene network of plants. *Trends Plant Sci.* 9, 490-498
- Moenne, A. 2001. Eucaryotic metallothioneins: protein structure, gene regulation and copper homeostasis. *Ch. Biol. Mar.* 42, 125-135
- Murphy, M. 2009. How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem. J.* 417, 1-15
- Olmos, E., Martínez-Solano, J.R., Piqueras, A., Hellin, E. 2003. Early steps in the oxidative burst induced by cadmium in cultured tobacco cells (BY-2) line. *J. Exp. Bot.* 54, 291-301
- Palma, J.M., Gómez, M., Yáñez, J., Del Río, L.A., 1987. Increased levels of peroxisomal active oxygen-related enzymes in copper-tolerant pea plants. *Plant Physiol.* 85, 570-574
- Pauly, N., Graziana, A., Mazars, C., Ranjeva, R., Thuleau, P. 2001. Basis for the calcium specificity in the plant response to extracellular stimulation. *J. Soc. Biol.* 195, 303-308
- Ramos, J., Naya, L., Gay, M., Abián, J., Becana, M. 2008. Functional characterization of an unusual phytochelatin synthase, LjPCS3, of *Lotus japonicus*. *Plant Physiol.* 148, 536-545
- Ratkevicius, N., Correa, J., Moenne, A. 2003. Copper accumulation, synthesis of ascorbate and activation of ascorbate peroxidase in *Enteromorpha compressa* (L) Grév. (Chlorophyta) from heavy metal-enriched environments in northern Chile. *Plant Cell Environ.* 26, 1599-1608
- Raeymackers, T., Potters, G., Asard, H., Guisez, Y., Horemans, N. 2003. Copper-mediated oxidative burst in *Nicotiana tabacum* L. cv. Bright Yellow 2 cell suspension cultures. *Protoplasma* 221, 93-100
- Schützendübel, A., Polle, A. 2002. Plant responses to abiotic stresses: heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization. *J. Exp. Bot.* 53, 1351-1365.
- Schraudner, M., Moeder, W., Wiese, C., Van Camp, W., Inzé, D., Langebartels, C., Sandermann, H. 1998. Ozone-induced oxidative burst in the ozone biomonitor plant, tobacco Bel W3. *Plant J.* 16, 235-245

- Sedbrook, J.C., Kronebusch, P.J., Borisy, G.G., Trewavas, A.J., Masson, P.H. 1996. Transgenic aequorin reveals organ-specific cytosolic  $Ca^{2+}$  responses to anoxia and *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Plant Physiol.* 111, 243-257.
- Sharma, S., Dietz, K. 2009. The relationship between metal toxicity and cellular redox imbalance. *Trends Plant Sci.* 14, 43-50
- Sun, S.Q., He, M., Cao, T., Zhang, Y.C., Han, W. 2009. Response mechanisms of antioxidants in bryophyte (*Hypnum plumaeforme*) under the stress of single or combined Pb and/or Ni. *Environ. Monit. Assess.* 149, 291-302.
- Trewavas, A.J., Malho, R. 1998.  $Ca^{2+}$  signalling in plant cells: the big network. *Curr. Opin. Plant Biol.* 1, 428-433
- Tsujii, N., Hirayanagi, N., Okada, M., Miyasaka, H., Hirata, K., Zenk, M.H., Miyamoto, K. 2002. Enhancement of tolerance to heavy metals and oxidative stress in *Dunaliella tertiolecta* by Zn-induced phytochelatin synthesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 293: 653-659
- Upadhyay, S., Panda, S. 2009. Copper-induced growth inhibition, oxidative stress and ultrastructural alterations in freshly grown water lettuce (*Pistia stratiotes* L.). *C. R. Biol.* 332, 623-632.
- Van Der Luit, A.H., Olivari, C., Haley, A., Knight, M.R., Trewavas, A.J., 1999. Distinct calcium signaling pathways regulate calmodulin gene expression in tobacco. *Plant Physiol.* 121, 705-714
- Vera, J., González, A., Castro, J., Mellado, M., Dennett, G., Correa, J.A., Moenne, A. Organellar and NADPH oxidase ROS synthesis determines lipoperoxides production and partial activation of antioxidant enzymes but not defense enzymes. en preparación
- Walter, A., Mazars, C., Maitrejean, M., Hopke, J., Ranjeva, R., Boland, W., Mithöfer, A. 2007. Structural requirements of jasmonates and synthetic analogues as inducers of  $Ca^{2+}$  signals in the nucleus and the cytosol of plant cells. *Angew. Chem.* 46, 4783-4785
- Weast, R.C. 1984. *CRC Handbook of Chemistry and Physics* 64th Ed. Boca Raton, CRC Press.
- Wojtaszek, P. 1997. Oxidative burst: an early plant defense response to pathogen infection. *Biochem J.* 322, 681-669
- Yang, C., Oliver, D.J. 1998. Glutathione metabolic genes coordinately respond to heavy metals and jasmonic acid in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* 10, 1539-1550.
- Xue, T., Li, X., Zhu, W., Wu, C., Yang, G., Zheng, C. 2008. Cotton metallothionein GhMT3a, a reactive oxygen species scavenger, increased tolerance against abiotic stress in transgenic tobacco and yeast. *J. Exp. Bot.* 60, 339-349

Yeh, C., Chien, P., Huang, H. 2007. Distinct signalling pathways for induction of MAP kinase activities by cadmium and copper in rice roots. *J. Exp. Bot.* 58,659-671

Zhou, J. M., Goldsbrough, P. B. 1994. Functional homologs of animal and fungal metallothionein genes from Arabidopsis. *Plant Cell* 6, 875-884