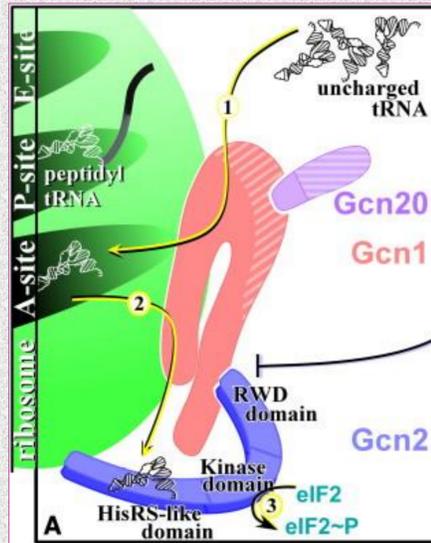


Isabel Faus, Ramón Serrano y José Gadea\*

<sup>1</sup>Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (IBMCP), Universitat Politècnica de València (UPV)-Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC). Ciudad Politécnica de la Innovación (CPI), Ed. 8E. C/ Ingeniero Fausto Elio s/n, Valencia, 46022, Spain

**Resumen:** La proteína quinasa GCN2 es un punto clave en el control de la homeostasis celular y es considerada un sensor general de estrés. Esta quinasa tiene como sustrato la subunidad  $\alpha$  del factor de iniciación de la traducción 2 (eIF2 $\alpha$ ). Su fosforilación conlleva una parada de la traducción en la célula. Hasta el momento se conoce que su activación se produce ante un ayuno de aminoácidos y la consecuente generación de tRNAs descargados. Sin embargo, también se ha demostrado su activación ante estreses que, en principio, no generan dichos tRNAs. En plantas se desconoce con detalle como el sistema GCN contribuye a mitigar el estrés y controlar la homeostasis. Diversos estudios indican que muchos de los componentes moleculares con los que está interaccionando GCN2 son aún desconocidos.

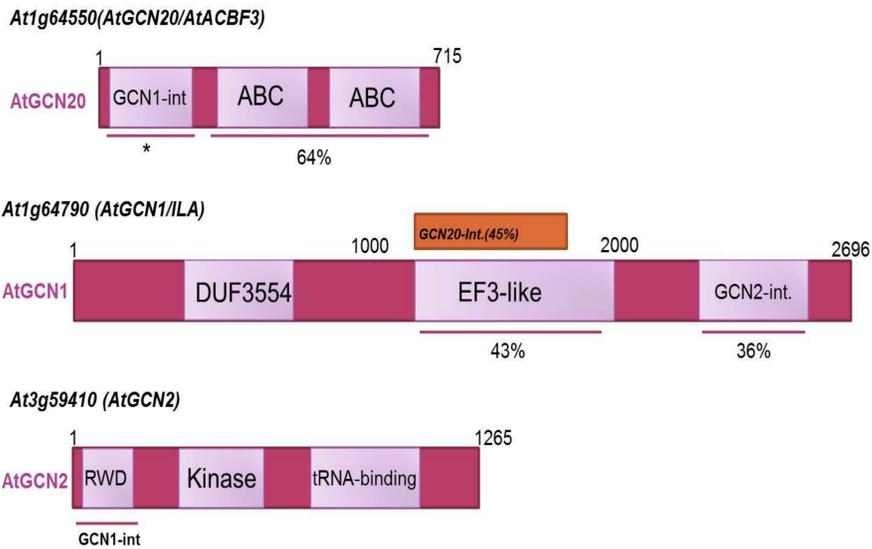
LEVADURA



**Modelo hipotético para el papel estimulador del complejo Gcn1p/Gcn20p en la activación de Gcn2p mediante tRNA descargados en el sitio A ribosomal.** Gcn2p se presenta como un dímero con el tRNA unido al dominio similar a HisRS y activando el dominio PK (Protein Kinase). Tanto el complejo Gcn1p/Gcn20p como el Gcn2p pueden unirse al ribosoma. En este caso se postula que el tRNA descargado actúa como ligando activador para la unión. Alternativamente, es posible Gcn1p sea una proteína andamio que posiciona a Gcn2p en el ribosoma de tal manera que los tRNA descargados puedan ser transferidos directamente desde el sitio A ribosomal a Gcn2p. (Hinnessbush,2005)

PLANTAS

**Representación esquemática de los genes a estudio: Gcn20, Gcn1 y Gcn2.** En *Arabidopsis Thaliana*, los genes homólogos a los de levadura, AtGcn20, AtGcn1 y AtGcn20, presentan los dominios de interacción conservados. Los porcentajes de homología obtenidos se representan bajo de los dominios de interacción en cada uno de los genes.



## OBJETIVOS

GENERAL

Basándonos en los estudios previos realizados en levadura sobre el sistema GCN, se pretende caracterizar dicho sistema en plantas. Empleando para ello líneas mutantes de los genes homólogos de *Arabidopsis Thaliana*, AtGCN2, AtGCN1, AtGCN20.

ESPECÍFICOS

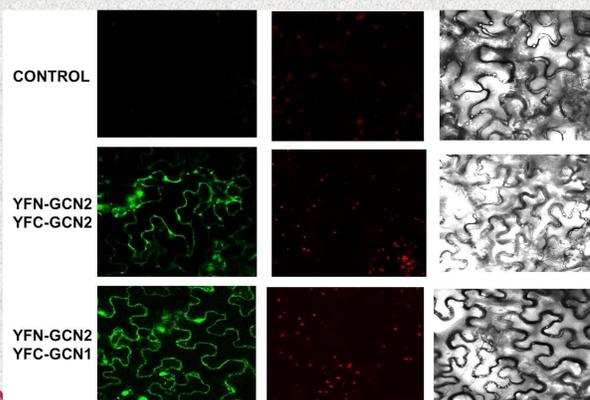
1. Caracterización fenotípica de las líneas mutantes. Determinación de mecanismos de resistencia a cationes tóxicos.
2. Clonación y caracterización de los genes a estudio en planta.
3. Búsqueda y caracterización de proteínas implicadas en el sistema GCN.

**Figura 1: Caracterización fenotípica de los mutantes a estudio en *Arabidopsis Thaliana*.** El fenotipo de amarilleamiento presente en los mutantes *gcn1* y *gcn20* se observó en condiciones de día largo en el invernadero, a 23°C de temperatura, con una humedad relativa del 70% y una intensidad lumínica de 130  $\mu$ E·m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>

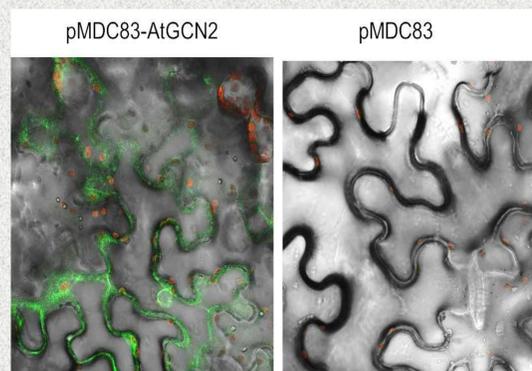


## RESULTADOS:

**Figura 3: Dimerización de AtGCN2. Interacción AtGCN1/AtGCN2 en *Arabidopsis Thaliana*.** Para ello se clonó AtGCN2 y la parte C-terminal de AtGCN1 en vectores BiFC. Posteriormente se agroinfiltraron plantas de *Nicotina Bentamiana* y se observaron sus células epidérmicas mediante microscopía confocal.



**Figura 4: Localización subcelular del gen AtGCN2 mediante microscopía confocal en células epidérmicas de *Nicotina Bentamiana*.** Para ello se clonó AtGCN2 en el vector binario pMDC83.



**Figura 2: Detección de eIF2 alpha fosforilado.** En *Arabidopsis Thaliana* los genes *Gcn1* y *Gcn2*, homólogos a ScGCN1 y ScGCN2 de levadura, son necesarios para la fosforilación de la subunidad  $\alpha$  del factor de iniciación de la traducción 2 (eIF2 $\alpha$ ). Mediante western-blot se comprobó que los mutantes *gcn1* y *gcn2* no fosforilan a eIF2 alpha tras un tratamiento con luz UV. Se emplearon como controles internos plantas Ler (wild-type) sometidas la mismo tratamiento.

