

Caracterización del sistema GCN en plantas mediante la utilización de mutantes de pérdida de función

La proteína quinasa GCN2 es una proteína conservada en todos los eucariotas implicada en el control de la traducción en condiciones de estrés. Está considerada un punto clave en el control de la homeostasis celular y un sensor de distintas condiciones de estrés. El estrés que inició su caracterización en levaduras y células animales es el ayuno de aminoácidos, pero recientemente se ha observado activación de este sistema ante multitud de estreses tanto bióticos como abióticos. El sistema GCN se ha descrito ampliamente en *Saccharomyces cerevisiae*: GCN2 se une a las proteínas GCN1 y GCN20, permitiendo la activación de la quinasa en situaciones de ayuno de aminoácidos. GCN2 se activa por tRNA no cargados, y posteriormente fosforila al factor de traducción eIF2 α , lo que conlleva una reducción de la síntesis global de proteínas, pero también una mayor traducción de mRNA específicos, como los que codifican a GCN4. Este factor de transcripción regulará la expresión de nuevos genes, lo que permite que la célula pueda iniciar una respuesta de adaptación al estrés.

En plantas se desconoce con detalle como el sistema GCN contribuye a mitigar el estrés y controlar la homeostasis. Las tres proteínas conocidas de este sistema tienen homólogos en *Arabidopsis*. Diversos estudios indican que el mecanismo de actuación de GCN2 en plantas presenta muchas incógnitas. Mientras que la quinasa GCN2 de plantas se activa bajo diferentes situaciones de estrés, la participación de los homólogos de GCN1 y GCN20 en estos procesos es controvertida, y recientemente se ha propuesto un nuevo papel para GCN1 en la traducción, independiente de GCN2.

El homólogo de GCN1 en plantas está implicado en la inmunidad innata y adquirida y sus líneas mutantes presentan fenotipos muy diferentes a los de las líneas mutantes en GCN2. La relación funcional entre estos dos genes sigue siendo difícil de definir en plantas. En esta tesis, demostramos que, aunque los genes GCN1 y GCN2 de *Arabidopsis* son necesarios para mediar la fosforilación de eIF2 α tras tratamientos con glifosato, inhibidor de la biosíntesis de aminoácidos aromáticos, los mutantes de pérdida de función de ambas líneas desarrollan distintos fenotipos de raíz y cloroplasto. Los experimentos de microscopía electrónica revelan que los mutantes en GCN1, pero no en GCN2, se ven afectados en la biogénesis de cloroplastos, lo que explica el fenotipo macroscópico observado previamente para estos mutantes. Los mutantes en GCN1 presentan una compleja reprogramación transcripcional que afecta, entre otros, a las respuestas relacionadas con los mecanismos de defensa, fotosíntesis y al correcto plegamiento de las proteínas. Los análisis de los dobles mutantes sugieren que GCN1 en plantas tiene otra función, que es independiente de la fosforilación de GCN2 y eIF2 α . Estos resultados indican que estos dos genes tienen funciones comunes, pero también distintas, en *Arabidopsis*.

Por otro lado, mostramos que ninguno de los cinco genes homólogos a GCN20 en *Arabidopsis* es necesario para la fosforilación de eIF2 α . Además, los fenotipos bajo estrés abiótico de plantas mutantes en los mismos, y el desarrollo de sus cloroplastos, sugiere que GCN20 está funcionalmente relacionado con GCN1, pero no con GCN2, algo

que se confirma ya que los mutantes *gcn1* y *gcn20* comparten una reprogramación transcripcional similar, afectando a la fotosíntesis y a las respuestas frente al estrés.

Identificamos la proteína quinasa GCN2 como un componente celular que fomenta la acción del glifosato en *Arabidopsis*. Los estudios comparativos que utilizan plántulas mutantes de pérdida de función de GCN2 muestran que el programa molecular que la planta despliega después del tratamiento con el herbicida no está teniendo lugar. Además, las plantas adultas *gcn2* muestran una menor inhibición de la fotosíntesis, y acumulan menos ácido siquímico que las de tipo silvestre después del tratamiento con glifosato. Algo similar ocurre tras el tratamiento con luz ultravioleta UV-B, donde mutantes de pérdida de función son más resistentes. La activación de GCN2 ante este estrés es independiente del fotorreceptor UV-B (UVR8) y de sus componentes de señalización aguas abajo y de la vía de señalización de estrés de las MAP quinasas.