

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE VALENCIA
Máster en Biotecnología Molecular
y Celular de Plantas

**La quinasa Gcn2p como regulador
de la estabilidad genómica:
estudios en *Saccharomyces
cerevisiae* y *Arabidopsis thaliana*.**

TRABAJO FINAL DE MÁSTER
Presentado por:
Rafael Aparicio Sanchis
Dirigido por:
Dr. José Ramón Murguía Ibáñez
Dr. José Gadea Vacas

El Dr. **José Ramón Murguía**, profesor titular de la Universidad Politécnica de Valencia, y el Dr. **José Gadea Vacas**, profesor contratado doctor de la Universidad Politécnica de Valencia,

C E R T I F I C A N

Que **Rafael Aparicio Sanchis**, Ingeniero Agrónomo por la Universidad Politécnica de Valencia, ha realizado bajo su dirección el Trabajo Fin de Master que lleva por título "la quinasa Gcn2p como regulador de la estabilidad genómica: estudios en *Saccharomyces cerevisiae* y en *Arabidopsis thaliana*".

Y autorizan la presentación del Trabajo Fin de Master el cual se adecua a los requisitos formales, metodológicos y de contenido, de acuerdo con la normativa publicada por la Comisión Académica del Máster de Biotecnología Molecular y Celular de Plantas de la Universidad Politécnica de Valencia.


Y, para que conste a los efectos oportunos lo firman en Valencia a 5 de Septiembre de 2011

Director del TFM



Jose R. Murguia Ibañez

Director del TFM



Jose Gadea Vacas

ÍNDICE DE CONTENIDOS

I. INTRODUCCIÓN	1
1. EL CONTROL DE LA TRADUCCIÓN EN RESPUESTA A ESTRÉS.	3
2. LA RESPUESTA CELULAR A LESIONES EN EL ADN (DDR).	6
II. OBJETIVOS	9
III. MATERIALES Y MÉTODOS	13
1. CULTIVOS Y MANIPULACIÓN CÉLULAR.	15
1.1 Cepas de levaduras y medios utilizados.	15
1.2 Ensayos de crecimiento en medio líquido.	16
1.3 Ensayos de viabilidad.	16
2. MANIPULACIÓN Y CRECIMIENTO DE <i>Arabidopsis thaliana</i>	16
2.1 Material vegetal y medio de crecimiento.	16
2.2 Esterilización de semillas	17
2.3 Cultivo in Vitro en medio sólido.	17
2.4 Cultivo in Vitro en medio líquido.	17
2.5 Cultivo en invernadero.	17
2.6 Tratamientos a <i>Arabidopsis</i>	18
3. PREPARACIÓN DE DROGAS Y TRATAMIENTOS.	18
3.1 Preparación de drogas.	18
3.2 Preparación de herbicidas.	19
4. OBTENCIÓN DE EXTRACTOS PROTEICOS.	20
4.1 Extractos proteicos de levadura.	20
4.2 Extractos proteicos de <i>Arabidopsis thaliana</i>	20
5. ELECTROFORESIS Y TÉCNICAS DE DETECCIÓN DE PROTEÍNAS.	21
5.1 Electroforesis de proteínas.	21
5.2 Transferencia a membrana.	21
5.3 Tinción de membrana con “ <i>Direct Blue 71</i> ” (DB71).	22
5.4 Inmunodetección de proteínas transferidas a membrana.	22
IV. RESULTADOS	23
1. ACTIVACIÓN DE Gcn2p POR DIFERENTES LESIONANTES EN LEVADURA.	25
2. CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE MUTANTES DE LA RUTA GCN CON MMS.	26
3. DEPENDENCIA DE LAS PROTEÍNAS DE PUNTOS DE CONTROL DE CICLO O “CHECKPOINT” EN RESPUESTA A MMS.	30
4. ESTUDIO DE LA DEPENDENCIA DE PROTEÍNAS DE REPARACIÓN EN RESPUESTA A MMS.	31
5. ESTABLECIMIENTO DEL MODELO EN <i>Arabidopsis</i>	32
5.1 Obtención del mutante <i>AtGCN2Δ</i> y caracterización bioquímica.	32
5.2 Ensayos preliminares de caracterización de <i>AtGCN2</i> en estabilidad genómica.	33
V. DISCUSIÓN	37
VI. CONCLUSIONES	41
VII. BIBLIOGRAFÍA	45

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS.

Figura 1: Esquema de GCN2.	4
Figura 2: Modelo hipotético para el papel estimulador del complejo Gcn1p/Gcn20p en la activación de Gcn2p por ARNt descargados en el sitio A ribosomal. (Hinnebusch 2005)	5
Figura 3: Caracterización de la activación de Gcn2p por diferentes agentes genotóxicos.....	25
Figura 4: Lesionantes del ADN a distintas dosis activan Gcn2p.....	26
Figura 5: Caracterización mutante <i>gcn2Δ</i>	27
Figura 6: Caracterización mutante <i>gcn1Δ</i>	27
Figura 7: Caracterización mutante <i>gcn20Δ</i>	28
Figura 8: Caracterización mutante <i>gcn3Δ</i>	28
Figura 9: Caracterización mutante <i>gcn4Δ</i>	29
Figura 10: Curvas de crecimiento con MMS mutantes ruta GCN.....	29
Figura 11: Análisis de proteínas de <i>checkpoint</i> en respuesta a 0,02% de MMS.....	31
Figura 12: Análisis de proteínas de reparación en respuesta a 0,02% de MMS en relación a Gcn2p.....	32
Figura 13: Diagrama con sitios de inserción y orientación de elementos DS en el primer intrón de <i>AtGCN2Δ</i> , línea mutante por trampa de genes GT8359. (Zhang <i>et al.</i> 2008).....	33
Figura 14: Inmunodetección de AtelF2α fosforilado por tratamiento con glifosato.....	33
Figura 15: Caracterización fenotípica de <i>AtGCN2Δ</i>	34
Figura 16: Inmunodetección de fosforilación de AtelF2α por tratamiento con HU.....	35
Tabla 1: Lista de cepas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> utilizadas	15

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico
ARN: Ácido ribonucleico
ARNm: ARN mensajero
ARNt: ARN transferente
 β -lapachona: Beta-lapachona
BPS: Batofenantrolina disulfónato (*Batophenantroline disulphonate*)
BSA: Albúmina sérica bovina
Cis-P: Cis –platino
cPT: Camptotecina
DB71: *Direct Blue 71*
DMSO: Dimetil sulfóxido
DSB: Rotura de doble hebra en el ADN
DTT: Ditioneitol
EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético (*ethylene diaminetetraacetic acid*)
EGTA: Ácido etilenglicoltetraacético (*ethylene glycol tetraacetic acid*)
eIF: Factores eucarióticos de iniciación de la traducción
eIF2 α : Subunidad α del factor eucariótico de iniciación de la traducción 2
eIF2B: Factor eucariótico de iniciación de la traducción 2B
GCN: Control general de nutrientes.
GDP: Guanosina difosfato
GTP: Guanosina trifosfato
HU: Hidroxiurea
MMS: Metil-Metano Sulfonato
Noc: Nocodazol
PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida
PCR: Reacción en cadena de la polimerasa (*polymerase Chain reaction*)
Phleo: Pheomicina
PVDF: Polivinildenofluoruro
PVPP: Polivinilpirrodilona insoluble
SDS: Dodecil sulfato sódico
TBS: Tampón salino de Tris (hidroximetil aminometano)
TBS-T: TBS con Tween 20
YPD: Medio complejo de Extracto de Levadura, Peptona y Glucosa para levadura.
5-FU: 5-fluorouracilo

I. INTRODUCCIÓN

1. EL CONTROL DE LA TRADUCCIÓN EN RESPUESTA A ESTRÉS.

Las células tienen varios mecanismos reguladores, los cuales permiten adaptarse a condiciones fisiológicas y de estrés ambiental. El control traduccional y la traducción selectiva de ARNm son unos de estos mecanismos (Wek RC 2006). La traducción es el último paso del flujo de información genética. Por tanto, la regulación a este nivel proporciona una rápida respuesta celular a cambios en las condiciones fisiológicas.

La traducción de proteínas se divide en tres pasos: Iniciación, Elongación y terminación. Aunque las tres fases están sujetas a mecanismos de control, la iniciación es el paso regulado en la mayoría de los casos. Varios factores eucarióticos de iniciación (eIFs) participan en la iniciación de la traducción, entre ellos los factores eIF2B y eIF2 (Kimball *et al.* 1998; Kleijn *et al.* 1998). Un paso fundamental en la iniciación de la traducción es la transferencia por eIF2 del metionil-ARNt iniciador cargado (Met-ARNt) a la subunidad menor del ribosoma (Proud 2005). Una vez reconocido el codón de iniciación, la Guanosina 5'-trifosfato (GTP) unida a eIF2 se hidroliza y eIF2 se libera unido a Guanosina 5'-difosfato (GDP), que es su forma inactiva. Para unir otro Met-ARNt debe regenerarse más eIF2 activo, intercambiándose el GDP por GTP. Este intercambio se cataliza por eIF2B. El intercambio de GDP por GTP en eIF2 se requiere para cada ronda de iniciación de la traducción, de manera que la regulación de este paso puede controlar la síntesis global de proteínas en distintas condiciones (Hinnebusch 2005). La fosforilación de eIF2 en su subunidad alfa (eIF2 α) transforma a eIF2 α -GDP de sustrato a inhibidor competitivo de eIF2B (Hinnebusch 2005), lo que impide la formación del complejo ternario. Dado que la concentración de eIF2 normalmente excede a la de eIF2B y que la fosforilación de eIF2-GDP aumenta su afinidad por eIF2B, niveles muy modestos de fosforilación de eIF2 α pueden inhibir completamente la iniciación de la síntesis de proteínas, así como favorecer la traducción selectiva de determinados ARNm (Krishnamoorthy *et al.* 2001), permitiendo a las células conservar recursos para manejar efectivamente las condiciones de estrés.

La síntesis de proteínas se inhibe transitoriamente por las condiciones de estrés para evitar el mal plegamiento de las proteínas y comprometer la viabilidad celular. Esta respuesta forma parte de un mecanismo protector que se desencadena por distintos estímulos y se conoce como "respuesta integral al estrés" (Sonenberg and Hinnebusch 2007). La inhibición de la traducción se logra por modificaciones postraduccionales de eIF2 α (Sonenberg and Hinnebusch 2007). Muchos estreses activan proteína quinasas que fosforilan a eIF2 en la Serina51 de su subunidad alfa (P-eIF2 α). La forma fosforilada de eIF2 α se comporta como un inhibidor competitivo del intercambiador eIF2B (Hinnebusch 2005), bloqueando el reciclado de eIF2-GTP y selectivamente algunos ARNm.

En la levadura de gemación *Saccharomyces cerevisiae*, la fosforilación de eIF2 α controla un programa de expresión génica en respuesta a ayuno de nutrientes (Hinnebusch 2005). La única quinasa de eIF2 α existente en la levadura de gemación esta codificada por el gen *GCN2* (Krishnamoorthy *et al.*

2001; Wek RC 2006). La activación de Gcn2p necesita dimerización (Qiu *et al.* 2001; Narasimhan *et al.* 2004), lo cuál recae aproximadamente en los últimos 160 residuos del sitio CTD o dominio C-terminal de la proteína, la zona más potente de dimerización (Garcia-Barrio *et al.* 2000) (Figura 1). La activación de Gcn2p por ARNt descargados también requiere interacción directa con el complejo regulador Gcn1p/Gcn20p (Garcia-Barrio *et al.* 2000; Sattlegger and Hinnebusch 2005) (Figura 2). A través del dominio N-terminal de Gcn2p se une al dominio C-terminal de Gcn1p, y esta unión es ayudada por Gcn20p que se encuentra unida a Gcn1p por la porción N-terminal al dominio eEF3 de Gcn1p.(Kubota *et al.* 2001; Kubota *et al.* 2003).

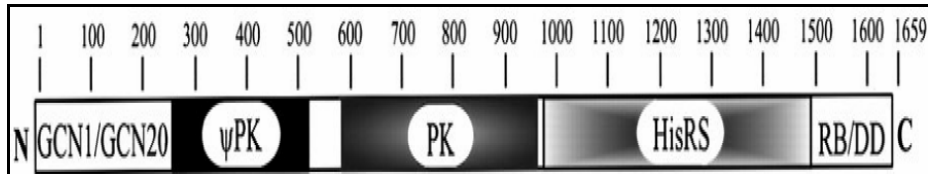


Figura 1: Esquema de GCN2. Polipéptido GCN2 de 1659 residuos [numeradas en la parte superior de extremo amino (N) a extremo carboxilo (C) terminal] se representa de forma esquemática como cajas rectangulares subdivididas en las siguientes áreas funcionales: la región conservadas N-terminal que requiere de la interacción con complejo Gcn1p/Gcn20p (GCN1/GCN20) (Garcia-Barrio *et al.* 2000); un dominio degenerado de la proteína quinasa o pseudo quinasa (psiPK), el dominio de la proteína quinasa (PK), una región relacionada con histidil-ARNt-sintetasa (HisRS), y un C-terminal región requerida para la unión de los ribosomas y la dimerización por GCN2 (RB / DD). Modificado a partir de (Qiu *et al.* 2001).

Gcn2p regula la traducción selectiva del factor de transcripción Gcn4p. Esta regulación es ejecutada por cuatro pautas de lectura localizadas en la región 5' no traducida del ARNm de *GCN4* (uORFs, de *untranslated Open Reading Frame*), que lo hacen hipersensibles a los niveles de eIF2 (Hinnebusch 2005). Cuando no hay limitación de nutrientes, los niveles de eIF2 activo son altos y los uORFs impiden la traducción del ARNm de *GCN4*. En células sometidas a ayuno de aminoácidos se produce un acumulo de ARNt descargados que estimulan la actividad quinasa de Gcn2p (Figura 2). La fosforilación de eIF2 en su subunidad α , provoca la disminución de niveles de eIF2 activo que alivian la inhibición por los uORFs, favoreciendo la traducción de *GCN4* a la vez que se produce un bloqueo general de la traducción (Hinnebusch 2005). El aumento en los niveles de la proteína Gcn4p activan la expresión de genes que codifican proteínas implicadas en las rutas de biosíntesis de aminoácidos (Natarajan *et al.* 2001).

En mamíferos, la fosforilación de eIF2 α es controlada por cuatro proteínas quinasas (Dever 2007). Las quinasas son la quinasa dependiente de ARN de doble cadena (*PKR* de *double-stranded RNA-dependent kinase*), el inhibidor controlado por grupos Hemo (*HRI* de *Haem-regulated inhibitor*), la quinasa de eIF2 α pancreática o proteína quinasa del retículo endoplasmático similar a PKR (*PER/PERK* de *pancreatic eIF2 α /PKR-endoplasmic reticulum (ER)-related kinase*) y la quinasa del control general de nutrientes o control general no desreprimible (*GCN2* de *general control nonderepressible-2*), cada una de las cuales se activa por distintos estreses que disminuyen la síntesis de proteínas. (PKR por presencia de ARN de doble cadena después de la infección por virus (Meurs *et al.* 1990; Icely *et al.* 1991; Mellor *et al.* 1994b), HRI en deficiencia de

grupos hemo (Chen *et al.* 1991; Mellor *et al.* 1994a), PEK/PERK activado por proteínas mal plegadas en el retículo (Harding *et al.* 2000) y GCN2 activado por limitación de nutrientes (Yang and Hinnebusch 1996; Hinnebusch 1997) y irradiación con rayos ultravioleta. GCN2 es la única quinasa de eIF2 α conservada en la evolución desde levaduras hasta mamíferos (Sood *et al.* 2000; Costa-Mattioli *et al.* 2009). Llama la atención, que GCN2 de mamíferos parece regular la memoria (Costa-Mattioli *et al.* 2007) y la conducta (Hao *et al.* 2005) a través del mismo mecanismo traduccional que señala la disponibilidad de aminoácidos en levadura, e.g., en respuesta a ARNt descargados. Al ser una de las vías principales que regula la proliferación celular además de el control de la traducción, la fosforilación de eIF2 α está involucrada casualmente en el desarrollo de patologías humanas como el cáncer, enfermedades cardiovasculares, envejecimiento y diabetes (Sonenberg and Hinnebusch 2007). Queda por determinar cómo la fosforilación de eIF2 α contribuye a las condiciones de estas enfermedades.

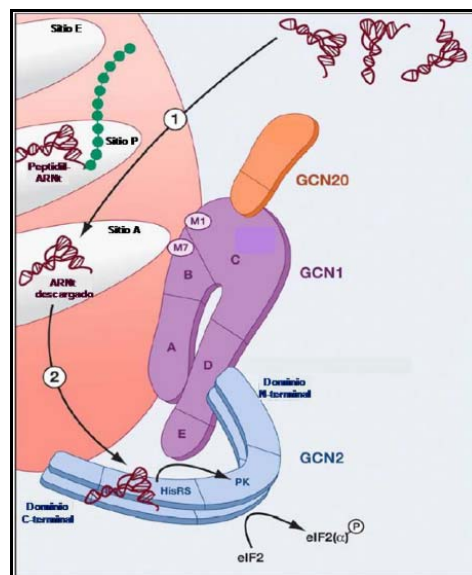


Figura 2: Modelo hipotético para el papel estimulador del complejo Gcn1p/Gcn20p en la activación de Gcn2p por ARNt descargados en el sitio A ribosomal. (Hinnebusch 2005)

En plantas, la baja constante de disociación de eIF2 comparada con la de levadura y mamíferos ha llevado desde hace varios años a asumir que las plantas no usaban la fosforilación de eIF2 α como un medio para regular la traducción. (Shaikhin *et al.* 1992). Además, la observación de que el ayuno de aminoácidos ramificados y aromáticos no desencadena una respuesta general había sugerido también que, en contraste con levadura, tal respuesta general a aminoácidos no existe en plantas. Más recientemente una enzima similar a GCN2 (*AtGCN2*) fue identificada en *Arabidopsis thaliana*, mostrando que restaura el crecimiento en el mutante *gcn2Δ* de levadura en presencia de un inhibidor de la biosíntesis de aminoácidos (Zhang *et al.* 2003). Se ha descrito también que *AtGCN2* se activa en plantas y fosforila eIF2 α por condiciones de privación de aminoácidos y purina, irradiación con luz ultravioleta, choque por frío y herida (Lageix *et al.* 2008; Zhang *et al.* 2008). Curiosamente, la actividad de *AtGCN2* correlaciona a una fuerte reducción de la síntesis global de

proteínas (Lageix *et al.* 2008). Aunque, se desconoce la importancia fisiológica de la fosforilación de eIF2 α en plantas, la activación de AtGCN2 tras una herida o la exposición a metil-jasmonato, ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) y ácido salicílico sugiere que esta enzima puede representar un papel clave, pero todavía no caracterizado, en la respuesta a estreses bióticos y abióticos (Lageix *et al.* 2008).

En *S. cerevisiae*, Gcn2p es activado por otros factores de estrés distintos a ayuno de aminoácidos por lo que se asemeja a GCN2 de mamíferos y plantas. Ayuno de purinas, limitación de glucosa, estrés salino y daño al ADN además de inhibir la traducción de modo dependiente de Gcn2p (Rolfes and Hinnebusch 1993; Natarajan *et al.* 2001). Es remarcable que el daño al ADN activa a Gcn2p, como los experimentos que se realizaron en condiciones de no ocurrencia de ayuno de aminoácidos y acumulación de ARNt descargados fue improbable (Natarajan *et al.* 2001).

2. LA RESPUESTA CELULAR A LESIONES EN EL ADN (DDR).

El daño al ADN desencadena rutas de control o *checkpoints*, las cuales retrasan la progresión del ciclo celular y activan programas de expresión génica, favoreciendo así la reparación del ADN. El daño al ADN no reparado produce inestabilidad genómica, apoptosis o senescencia, lo cual afecta enormemente al desarrollo de los organismos y procesos de envejecimiento. En humanos, la pérdida de la integridad genómica predispone a inmunodeficiencia, desordenes neuronales y cáncer. Estudios de respuestas celulares a agentes que dañan al ADN desde levaduras a humanos han revelado que muchas de las mismas proteínas clave se emplean para reparar el daño al ADN en todo el reino eucariota. El mejor ejemplo para ello lo constituye la familia de genes que codifica proteínas quinasas conocidas como PIKK (proteínas quinasas similares a fosfatidil-inositol (PI) 3-quinasa) la cual incluye a ATM (mamíferos y plantas), ATR (mamíferos y plantas), *rad3⁺* (*Schizosaccharomyces pombe*), TEL1 (*Saccharomyces cerevisiae*) y MEC1 (*S. cerevisiae*) (Zhou and Elledge 2000). Los miembros de esta familia están repartidos en dos grupos: Tel1p es homólogo de ATM mientras que Mec1p está relacionado con ATR y *rad3⁺*. ATM está principalmente involucrado en la detección y respuesta a roturas de doble cadena (DSB de *double strand-break*), mientras que ATR responde a una amplia variedad de lesiones del ADN en especial durante la replicación del ADN.

En *Saccharomyces cerevisiae* el regulador central de las vías de control es Mec1p. Mec1p forma parte de un complejo multiproteico con Lcd1/Dcd1, el cual se recluta en las lesiones al ADN y es esencial para los *checkpoint* de daño y replicación de ADN (Paciotti *et al.* 1998). Adicionalmente, Mec1p muestra un papel redundante con Tel1p tras el daño al ADN (Morrow *et al.* 1995).

La quinasa Rad53p desempeña también un papel clave en los *checkpoint* de daño y replicación del ADN. La función de Rad53p está por debajo de Mec1p y Tel1p y se fosforila cuando hay daño al ADN de forma dependiente de Mec1p (Sanchez *et al.* 1996; Zhou and Elledge 2000). La señal de detección del daño al ADN se transmite a los efectores de daño a través de la fosforilación de

Rad9p de forma dependiente de Mec1p. Rad9p fosforilada interactúa con Rad53p y desencadena la liberación de Rad53p activa (Sanchez *et al.* 1996). Por lo tanto, Mec1p tienen ambas funciones de detección y transductor de la señal de daño al ADN.

Una de las dianas de las quinasas Mec1p y Tel1p es el complejo MRN (*MRE11/RAD50/XRS2*), un complejo proteico muy conservado involucrado en replicación del ADN, reparación del ADN, mantenimiento de los telómeros y señalización en el control de ciclo celular (Czornak *et al.* 2008). El complejo MRN está formado por 2 miembros muy conservados, Mre11p y Rad50p, y una tercera proteína, Xrs2p en levadura de gemación y Nbs1p en mamíferos y plantas (Czornak *et al.* 2008). Este complejo regula dos mecanismos distintos de reparación de roturas de doble cadena: Recombinación homóloga (HR de "*homologous recombination*") y recombinación no homóloga o unión de extremos no homólogos (NHEJ de "*Non-homologous End-Joining*"). Además, el complejo MRN desempeña un papel crítico en el reconocimiento del daño al ADN, mecanismos de señalización y reparación, así como en el mantenimiento de la integridad cromosómica en la célula (Assenmacher and Hopfner 2004).

Aunque, varios de los principales mecanismos de respuesta a daño al ADN están claros, muchas más vías moleculares que conectan proteínas de *checkpoint* con eventos de progresión del ciclo celular y reparación de daño quedan por descubrir. Por lo tanto, el avance en el conocimiento de nuevas vías reguladoras de la estabilidad del genoma en eucariotas puede conducir a:

- 1- Un mejor entendimiento de cómo las células mantienen la integridad genómica.
- 2- Poder manipular estas vías para aumentar la supervivencia en condiciones de estrés ambiental en levaduras y plantas.

Recientemente hemos identificado un nuevo *checkpoint* de daño al ADN en levadura, que regula la transición G1-S tras la exposición al agente alquilante metil-metanosulfonato (MMS) (Menacho-Marquez *et al.* 2007). Este *checkpoint* depende completamente de la quinasa Gcn2p. Curiosamente, Gcn2p se requiere además para el *checkpoint* G1/S en respuesta a irradiación ultravioleta en la levadura de fisión *S. pombe*. Lo que apoya firmemente la idea que la función de *checkpoint* de Gcn2p está conservado a través de la evolución (Tvegard *et al.* 2007). Gcn2p parece regular la función de *checkpoint* mediante mecanismos dependiente e independientes de la traducción, lo que revela novedosos mecanismos de regulación para esta importante quinasa (Menacho-Marquez *et al.* 2007). Desconocemos como Gcn2p se activa por el daño al ADN y cuáles son los sustratos/efectores que median en el este papel de mantenimiento de la estabilidad genómica. Nosotros creemos firmemente que Gcn2p modula positivamente la función de la vía de *checkpoint*/reparación de daño al ADN mediante eventos de fosforilación/desfosforilación para preservar la integridad genómica. Por esta razón proponemos que la activación de Gcn2p podría incrementar la supervivencia celular a estrés genotóxico.

II. OBJETIVOS

El objetivo fundamental del presente TFM consistirá en caracterizar el papel de la quinasa Gcn2p en la respuesta celular a lesiones en el ADN. Para ello definimos como objetivos específicos los siguientes:

1. Identificar la lesión o lesiones que activan a Gcn2p.
2. Analizar el papel de las proteínas de *checkpoint* en la activación de Gcn2p.
3. Analizar el papel de las proteínas de reparación del ADN en la activación de Gcn2p.
4. Establecer un modelo en planta para validar estos hallazgos.

III. MATERIALES Y **MÉTODOS**

1. CULTIVOS Y MANIPULACIÓN CÉLULAR.

1.1 Cepas de levaduras y medios utilizados.

La relación de cepas de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* que se han utilizado en el presente trabajo final de máster se muestran en la tabla 1 siguiente:

Nombre	Genotipo	Referencia
BY4741	MATa; <i>leu2</i> Δ0; <i>his3</i> Δ0; <i>met15</i> Δ0; <i>ura3</i> Δ0	Euroscaf
<i>gcn1</i> Δ	BY4741, <i>gcn1</i> ::KANMX4	
<i>gcn2</i> Δ	BY4741, <i>gcn2</i> ::KANMX4	
<i>gcn3</i> Δ	BY4741, <i>gcn3</i> ::KANMX4	
<i>gcn4</i> Δ	BY4741, <i>gcn4</i> ::KANMX4	
<i>gcn20</i> Δ	BY4741, <i>gcn20</i> ::KANMX4	
<i>rad1</i> Δ	BY4741, <i>rad1</i> ::KANMX4	
<i>rad14</i> Δ	BY4741, <i>rad14</i> ::KANMX4	
<i>mlh1</i> Δ	BY4741, <i>mlh1</i> ::KANMX4	
<i>pms1</i> Δ	BY4741, <i>pms1</i> ::KANMX4	
<i>mag1</i> Δ	BY4741, <i>mag1</i> ::KANMX4	
<i>rev1</i> Δ	BY4741, <i>rev1</i> ::KANMX4	
<i>rev3</i> Δ	BY4741, <i>rev3</i> ::KANMX4	
<i>rad51</i> Δ	BY4741, <i>rad51</i> ::KANMX4	
<i>rad52</i> Δ	BY4741, <i>rad52</i> ::KANMX4	
<i>sgs1</i> Δ	BY4741, <i>sgs1</i> ::KANMX4	
W303.1a <i>sml1</i> Δ	MATa, <i>leu2-3,112 his3-11, ura3-1 ade2-1, trp1-1, can1-100, sml1-1</i>	D'Amours D and Jackson SP,2001
<i>mec1</i> Δ <i>sml1</i>	<i>sml1-1, mec1</i> ::TRP1	
<i>tel1</i> Δ <i>sml1</i>	<i>sml1-1, tel1</i> ::HIS3	
<i>mec1</i> Δ <i>tel1</i> Δ <i>sml1</i>	<i>sml1-1, mec1</i> ::TRP1 <i>tel1</i> ::HIS3	
<i>xrs2</i> Δ	W303.1a, <i>xrs2</i> ::LEU2	
<i>mre11</i> Δ	W303.1a, <i>mre11</i> ::HIS3	
<i>rad50</i> Δ	W303.1a, <i>rad50</i> ::TRP1	
<i>xmr</i> Δ	W303.1a, <i>xrs2</i> ::LEU2 <i>mre11</i> ::HIS3 <i>rad50</i> ::TRP1	
<i>xrs2</i> Δ <i>mec1</i> Δ <i>sml1</i>	<i>sml1-1, mec1</i> ::TRP1 <i>xrs2</i> ::LEU2	
<i>xrs2</i> Δ <i>tel1</i> Δ <i>sml1</i>	<i>sml1-1, tel1</i> ::HIS3 <i>xrs2</i> ::LEU2	
<i>xrs2</i> Δ <i>mec1</i> Δ		
<i>tel1</i> Δ <i>sml1</i>	<i>sml1-1, xrs2</i> ::LEU2 <i>mec1</i> ::TRP1 <i>tel1</i> ::HIS3	

Tabla 1: Lista de cepas de *Saccharomyces cerevisiae* utilizadas.

El cultivo y manipulación de levaduras se llevó a cabo siguiendo métodos estándar (Prinz 2003). El medio de cultivo utilizado es:

YPD (*Yeast extract-Peptide-Dextrose* - medio complejo):

Extracto de levadura al 1%, Glucosa (dextrosa) al 2%, Peptona al 2%

Cuando utilizamos medio sólido se añadió Bapto-Agar (Pronadisa) al 2%.

1.2 Ensayos de crecimiento en medio líquido.

La capacidad de crecimiento de cultivos de levadura en medio líquido se cuantificó a lo largo del tiempo midiendo la densidad óptica a 660 nm de dichos cultivos (Burke D. 2000).

Los cultivos se realizaron en microplacas especiales de 100 pocillos y se registraron mediante el analizador Bioscreen C (Thermo Labsystems). Con él medimos la densidad óptica con un filtro de banda ancha (420-580 nm) para reducir la contribución del medio a la lectura de absorbancia. La temperatura de crecimiento fue 28° C y los cultivos fueron sometidos a agitación vigorosa durante los 30 segundos previos a la lectura de absorbancia. La lectura se hizo cada 20 minutos durante las 72 horas que duró el experimento. Se utilizaron cultivos celulares saturados que fueron diluidos 1/200 en YPD con tratamientos de drogas a la concentración indicada en el experimento Como control se utilizó YPD con agua estéril, a igual volumen que el tratamiento de droga.

Para cultivos en general, se partió de precultivo inoculando células crecidas en placa en 2 ml de medio YPD líquido y se dejó crecer un día a 28° C en agitación continua hasta la saturación. Posteriormente se hizo una dilución en un volumen mayor de cultivo, y de ahí se inoculó cultivos para hacer tratamiento a la concentración deseada y en el volumen necesario para cada experimento. Normalmente los tratamientos se realizaron en cultivos a mitad de fase exponencial (absorbancia a 660nm entre 0,4 y 0,5), en medio rico YPD. Separamos el cultivo en diferentes matraces, para hacer los tratamientos con la droga y concentración indicada en cada ensayo, una vez pasado el tiempo indicado en cada ensayo se recogieron las células por centrifugación.

1.3 Ensayos de viabilidad.

Para determinar el porcentaje de células viables en un cultivo líquido de levaduras, se cuantificó la densidad celular mediante la absorbancia a 660 nm, realizamos diluciones seriadas hasta tener una densidad de 3000 células por ml y vertimos 0,1 ml en placas de YPD. Las placas se incubaron a en estufa de cultivo a 28° C hasta que aparecieron las colonias fueron visibles (2-3 días).

2. MANIPULACIÓN Y CRECIMIENTO DE *Arabidopsis thaliana*.

2.1 Material vegetal y medio de crecimiento.

Las líneas de *Arabidopsis thaliana* utilizadas en este trabajo son la línea silvestre o WT que se trata del ecotipo *Landsberg erecta* (Ler) y la línea obtenida por trampa de genes cuya accesión es GT8359 obtenida en Cold Spring Harbour Laboratory, New York (<http://genetrapp.cshl.org/>). A la que denominaremos *AtGCN2Δ*.

Utilizamos el medio Murashige and Skoog (MS) para el cultivo *in Vitro* de *Arabidopsis thaliana*. (Murashige and Skoog 1962) Con los siguientes componentes: sacarosa 1% (p/v), sales MS (SIGMA) al 0,4% (p/v) y 10mM de tampón MES (ácido 2-N-morfolino etanosulfónico) ajustado con Tris a pH 6. Para el medio sólido se le añade Bapto-agar (Pronadisa) al 1%. La línea mutante *AtGCN2Δ* se creció *in Vitro* en presencia del antibiótico Kanamicina en el medio a una concentración final de 5 µg/ml.

2.2 Esterilización de semillas.

Las semillas se esterilizaron en superficie mediante inmersión en solución de etanol al 70% (v/v) y Triton X-100 al 0,1% (v/v) y se pusieron en agitación durante 20 minutos. Se eliminó esta solución y las semillas se sumergieron en una solución de hipoclorito de Sodio 2,5% (v/v) y Triton X-100 al 0,05%(v/v) y se agita durante 10 minutos: Tras ese tiempo se eliminó la solución y se lavaron las semillas 2 veces con agua destilada estéril. La estratificación se realizó dejando las semillas sumergidas en agua estéril a 4° C, durante 5-7 días.

2.3 Cultivo in Vitro en medio sólido.

Para el cultivo *in Vitro* en medio sólido se utilizaron placas Petri de 9 cm de diámetro, utilizando 25 ml de medio por placa. Para crecimiento en vertical, se usaron placas cuadradas de 12 cm de lado y utilizando 50 ml de medio por placa. Una vez sembradas en condiciones de esterilidad se sellan con cinta porosa (Micropore) y se incubaron para su germinación y crecimiento en cámara de cultivo con condiciones controladas. Estas condiciones son una temperatura de 24° C, fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 de oscuridad, con una intensidad de luz de 100 µE m⁻² s⁻¹.

2.4 Cultivo in Vitro en medio líquido.

El cultivo de *Arabidopsis* en medio líquido se llevó a cabo en placas de cultivo en suspensión de 6 pocillos Cellstar (Greiner). A cada pocillo se le pusieron 7 ml de medio líquido y 3 plántulas de 15-20 días de edad, crecidas en placa Petri con medio MS sólido. Las placas se cultivan en agitación a 100-110 rpm en cámara de cultivo en las condiciones descritas anteriormente. Las plántulas se mantuvieron el tiempo necesario para obtener material vegetal suficiente (2-3 días), ya que más tiempo provocaba decaimiento y muerte de las plántulas debido a los tratamientos. Este material vegetal se recogió y se congeló inmediatamente en N líquido y se guardó a -80° C hasta su procesamiento y uso.

2.5 Cultivo en invernadero.

Las plantas de *Arabidopsis thaliana* fueron cultivadas en una mezcla 2:1 de turba (Biolan): vermiculita exfoliada (Asfaltex). Se transplantaron a macetas que se colocaron en invernadero en condiciones controladas, con fotoperiodo de día largo (16h/8h), temperatura de 23° C, e intensidad aproximada de luz blanca de 130 µE m⁻² s⁻¹. Se irrigan 2 veces a la semana.

2.6 Tratamientos a Arabidopsis.

Se han realizado diversos ensayos en busca de un fenotipo morfológico, para ello se realizaron ensayos de germinación en placa Petri y ensayos de crecimiento en placa vertical. En los ensayos de germinación se compararon el mutante frente a WT sin y con tratamiento en las placas, se calculó el índice de germinación en cada condición y línea.

El índice de germinación se calculó como la relación de número de cotiledones verdes frente a semillas totales sembradas expresadas como porcentaje. El índice se calculó en varios días tras la siembra y promediando al menos 3 placas por condición. Los distintos tratamientos fueron: Hidroxiurea (0,5-1-1,5-2-2,5-3-5 mM), 5FU (40-60-80-100 μ M) y MMS (0,005-0,01%). Estos compuestos se añadieron al medio MS cuando se encontraba a unos 50° C, tras el autoclavado del medio y previo vertido en la placa para su solidificación. También se realizaron ensayos sobre plántulas germinadas en medio MS y transferidas a los 7 días de edad (2-4 hojas) a placas con distintos tratamientos.

Los tratamientos con herbicidas se realizaron a plántulas de 12-14 días (4-8 hojas), crecidas en medio MS normal. Se extrajeron las plántulas y se sumergieron 1 minuto en 200 ml de solución herbicida con 200 μ M de glifosato (Sigma). Como control hicimos lo mismo pero en agua. Luego depositamos sobre placas frescas de MS y dejamos 6 horas, tras este tiempo se recogen las muestras y se congelan en N líquido y se guardan a -80° C. Para observar fenotipo se replantaron en placas frescas, MS y MS suplementada con aminoácidos Fenilalanina (Phe), Tirosina (Try) y Triptófano (Trp) a 0,5 mM, y se dejaron en cámara de crecimiento. Hicimos el mismo tratamiento con glifosato a planta adulta, estas plántulas fueron transplantadas a suelo a los 7 días de edad, y tras 7-10 días se hizo el tratamiento con herbicida (estado de roseta). Tras el mismo fueron replantadas durante 6 horas en suelo y posteriormente se congelaron las muestras en N líquido. Cuando se trataron con el herbicida bensulfuron-metil se sumergieron las plántulas de 12 días de edad en 100 ml de solución a 0,5 μ M de bensulfuron-metil en MS líquido, durante 1 minuto y fueron replantadas en placas con medio fresco y se dejó en cámara de cultivo. Se llevó un control sin tratamiento y además se utilizó placas MS suplementadas con aminoácidos Isoleucina (Ile), Leucina (Leu) y Valina (Val) a una concentración final 0,5 mM para mitigar el efecto del herbicida. Este ensayo se realizó siguiendo el protocolo usado en (Zhang *et al.* 2008).

3. PREPARACIÓN DE DROGAS Y TRATAMIENTOS.

3.1 Preparación de drogas.

Beta-lapachona (3,4-dihidro-2,2-dimetil-2H-nafto [1,2-b] pirano-5,6-diona, SIGMA): Es un agente antitumoral que produce roturas de doble banda en el ADN. El mecanismo por el cual la causa aún es desconocido. El fármaco se disolvió a una concentración de 2 mg/ml (100X) en DMSO. Posteriormente se distribuyó en alícuotas que se conservaron hasta su uso a -20° C. En los tratamientos esta solución de partida se diluyó en el medio de cultivo a la

concentración deseada que fue 2,5 µg/ml. La concentración final de DMSO nunca fue superior al 0,1%.

Camptotecina (SIGMA): Es un agente citotóxico que se une irreversiblemente al complejo ADN-topoisomerasa I, produciendo un complejo ternario que evita la religación del ADN. Causa daño al ADN y apoptosis, se usa como agente anticancerígeno. Este compuesto se diluyó en DMSO a la concentración 50mM y fue almacenado a -20° C hasta su utilización.

Cis-platino (cis-diaminoplatino (II) dicloruro, SIGMA): es un potente agente antineoplásico que induce aductos dentro de una hebra de ADN. Se preparó diluyendo en DMSO a una concentración de 50mM y se guardó a -20° C hasta su utilización.

Metil metano sulfonato o MMS (SIGMA): Es un agente alquilante del ADN que transfiere grupos metilo a las bases nitrogenadas (Chang *et al.* 2002). Este compuesto se diluyó en agua a una concentración 100 veces la deseada.

Phleomicina (de *Streptomyces verticillus*, SIGMA): Es un glicopéptido radiomimético, estructuralmente relacionado al antibiótico Bleomicina. La phleomicina bloquea la entrada en fase-S del ciclo celular y produce daño en el ADN (He *et al.* 1996) por rotura de doble cadena. Este compuesto se disolvió en agua a una concentración de 25 mg/ml y conservado a -20° C hasta su utilización.

Hidroxiurea (SIGMA): Es un inhibidor específico de la síntesis de ADN y un agente antineoplásico específico de fase-S (Szekeres *et al.* 1997). El mecanismo de acción de hidroxiurea involucra la inhibición de la enzima ribonucleótido reductasa, inhibiendo la síntesis de desoxirribonucleótidos a partir de ribonucleótidos. En todos los casos la cantidad de hidroxiurea necesaria se pesó y se disolvió directamente en el medio de cultivo.

Nocodazol (metil [5-(2-tienil-carbonil)-1H-benzimidazol-2-yl]]-carbamato, SIGMA): Es una agente antitumoral que interfiere con la función de los microtúbulos en la mitosis, probablemente porque su unión directa a tubulina causa cambios conformacionales con está prolina. El nocodazol se disolvió en DMSO a una concentración de 1 mg/ml y se almaceno a -20° C hasta su utilización.

5-Fluorouracilo (SIGMA): Es un antimetabolito que se une de forma irreversible a la enzima timidilato sintasa, esencial para la síntesis de nucleótidos de timina. Como consecuencia los niveles celulares de timina se agotan, inhibiendo la replicación y provocando la parada del ciclo celular. Se disolvió en DMSO a una concentración 100 veces a la que se deseó finalmente y se guardó a -20°C hasta su utilización.

3.2 Preparación de herbicidas.

Bensulfuron-metil.(SIGMA): Se trata de un herbicida que pertenece al grupo de sulfonilureas, caracterizados por ser inhibidores de la acetolactato sintetasa

(ALS). Este herbicida afecta a la síntesis de los aminoácidos de cadena ramificada como Isoleucina (Ile, I), Leucina (Leu, L) y Valina (Val, V), cambiando su conformación al inducir su precipitación o inhibir la enzima acetolactato sintetasa. Se disolvió en agua a una concentración de 60 mM y se guardaron en alícuotas a -20° C. Para su uso se diluyó en agua o MS líquido a la concentración final deseada.

Glifosato (SIGMA): El glifosato inhibe la enzima EPSPS o 5- enolpiruvil shikimato 3-fosfato sintetasa. Este enzima cataliza la formación de enolpiruvatoshikimato 3-fosfato a partir de fosfoenolpiruvato y shikimato 3-fosfato que es el penúltimo paso en la ruta del shikimato para producir chorismato, el cuál es requerido para la síntesis de diversos metabolitos aromáticos en plantas, entre ellos los aminoácidos Fenilalanina (Phe, F), Tirosina (Tyr, Y) y Triptófano (Trp, W). Se disolvió en agua pesando la cantidad necesaria para obtener la concentración final de tratamiento.

4. OBTENCIÓN DE EXTRACTOS PROTEICOS.

4.1 Extractos proteicos de levadura.

A partir de un precultivo en fase estacionaria se inoculó el cultivo celular con la dilución adecuada, en cada caso. Una vez se llegó a la mitad de la fase logarítmica (Absorbancia a 660 nm entre 0,4 y 0,5) se realizó el tratamiento correspondiente y tras el tiempo indicado (habitualmente 1 o 2 horas de tratamiento) recogimos 10 ml. de cultivos celulares. Concentramos las células por centrifugación de 3 minutos a 3000 rpm eliminando sobrenadante (Laemmli 1970). Posteriormente, resuspendimos el sedimento celular en 150µl de tampón de carga de proteínas 2X (diluido con agua a partir de 5X: 7.5 % SDS, 0,1M DTT, 10mM EDTA, 30% sacarosa, 0.01% de azul de bromofenol, 0.3M Tris llevado a pH 6.8 con HCl). Las muestras fueron sometidas a 95 ° C durante 10 minutos en bloque seco, para producir la lisis celular. Tras el hervido se centrifugaron y se almacenaron para su uso posterior a -80° C. Se cargaron en el gel de electroforesis cantidades iguales de proteína para cada muestra.

4.2 Extractos proteicos de *Arabidopsis thaliana*.

Las muestras de plántulas fueron congeladas inmediatamente en Nitrógeno líquido. Posteriormente se machacaron en Nitrógeno líquido y se resuspendió en tampón de extracción frío (25mM Tris-HCl pH 7,5, 75 mM NaCl, 5% glicerol, 0,05% Tritón X-100, 0,5 mM EDTA, 0,5 mM EGTA, 2 mM DTT, 2% PVPP, 1X Inhibidor de proteasas *coktail* tablets Complete (Roche) y 1X mezcla de inhibidor de fosfatasas) Los inhibidores se añaden justo antes de su uso, la mezcla de inhibidores de fosfatasas son: 20 mM β-glicerofosfato, 0,1 mM ortovanadato de sodio, 25 mM fluoruro de sodio, preparado 100X y guardado en alícuotas a -20° C. Este tampón de extracción es modificado a partir de (Zhang *et al.* 2008). Luego, centrifugamos el extracto en centrifuga fría (4° C) 15 minutos a 13000 rpm. Se recuperó el extracto proteico clarificado a un nuevo tubo Eppendorf. Se determinó la cantidad de proteína por el método Bradford (Bradford 1976), ya que se trata de un método rápido y sensible para

la cuantificación de microgramos de proteína utilizando el principio de “*protein-dye-binding*”. En este método se emplea un colorante hidrofóbico cuyas disoluciones acuosas en presencia de ácido fosfórico tienen un color pardo y que, al encontrarse en el entorno hidrofóbico del interior de una proteína, origina un color azul intenso que se puede medir fácilmente. BioRad vende un reactivo concentrado 5X (BioRad protein assay) por lo que para su utilización es necesario diluirlo en 4 volúmenes de agua. La cantidad aplicada en cada pocillo fue de 200 μ l. Para determinar la concentración de proteína total presente en una muestra se requiere la preparación de una curva de calibrado empleando una proteína patrón, que generalmente suele ser la albúmina sérica bovina (BSA). Se disolvieron 10 mg de albúmina bovina en 10 ml de agua destilada, con lo que se obtuvo una disolución madre con una concentración de 1 mg/ml. Se realizó la curva patrón con las concentraciones de 1, 5, 10 y 20 μ g/ml. Por último, se midió la absorbancia a una longitud de onda de 595 nm en un lector multipocillo multiSKAN (Thermo Scientific) y utilizando la curva patrón previamente realizada, se determinaron las concentraciones de proteína presentes en las muestras que se guardan a -80° C hasta su utilización. Se cargaron la misma cantidad de proteína para cada muestra (10 μ g).

5. ELECTROFORESIS Y TÉCNICAS DE DETECCIÓN DE PROTEÍNAS.

5.1 Electroforesis de proteínas.

La separación de proteínas por electroforesis se llevó a cabo en condiciones desnaturalizantes en geles discontinuos de poliacrilamida y SDS (SDS-PAGE) utilizando el sistema MiniProtean tetracell (BioRad). Se utilizaron geles al 10% para levadura y al 12 % para *Arabidopsis*. Para la polimerización se utilizó como catalizador el ión persulfato ($S_2O_8^-$) que se añade en forma de persulfato amónico (APS, 50 μ l APS 10%) y como iniciador TEMED (N,N,N,N'-tetrametilnediamina) (5 μ l) . La electroforesis fue realizada a diferencia de potencial constante de 80 V en tampón de electroforesis SDS-PAGE (Glicina 192 mM, SDS 0.1% pH 8.3 con Tris Base). En todos los casos se utilizaron marcador preteñido de peso molecular: “*PageRuler™*” (11-170 kDa, de Fermentas).

5.2 Transferencia a membrana.

La transferencia a membrana de Polivinildenofluoruro (PVDF) se realizó mediante transferencia en semiseco con el equipo “*Trans-Blot semidry*” (BioRad). Para ello se montó el sándwich sobre el ánodo de platino, colocamos papel de filtro extra grueso (BioRad), sobre él la membrana, sobre ella el gel y finalmente otro papel de filtro. Todo se embebió posteriormente con tampón de transferencia semiseco (48mM Tris, 39mM glicina, 20% metanol, 10% SDS pH 9.2) antes de la colocación en el sistema de transferencia. Se transfirió a amperaje constante de 150mA (2,5 mA/cm²) durante 30 minutos.

5.3 Tinción de membrana con “*Direct Blue 71*” (DB71).

Dicha tinción se hizo siguiendo el protocolo publicado en (Walker *et al.* 2002). Una vez concluyó la transferencia sumergimos la membrana en 50ml de solución de trabajo (0,008% (p/v) de DB71) durante 5 minutos en agitación. Se retiró la solución. Hicimos lavados de la membrana 2 o 3 veces con la solución de lavado (40% etanol, 10 %ácido acético glacial, agua milliQ hasta 1l) durante unos minutos.

Tomamos una foto y desteñimos totalmente la membrana aplicando solución de desteñido (50% etanol absoluto, 15% bicarbonato sódico 1M, ajustando volumen agua milliQ a 1 l).

5.4 Inmunodetección de proteínas transferidas a membrana.

La membrana fue sumergida durante 1 h en agitación con leche en polvo desnatada (Sveltesse) al 1% en levadura o 1,5 h al 5% en *Arabidopsis* respectivamente, disuelta en tampón TBS (20mM Tris-HCl pH 7.6, 150 mM NaCl) con Tween 20 al 0.1% (TBS-T) para su bloqueo. La inmunodetección (Harlow 1988) comenzó con la incubación de la membrana con el anticuerpo primario durante toda la noche en agitación a 4° C. El anticuerpo primario utilizado es un antisuero de conejo que reconoce la serina 51 fosforilada de la subunidad α del factor eucariótico de iniciación 2 (anti-fosfo-eIF2 α o PeIF2 α) (Cell Signalling Technology). La dilución de trabajo fue 1:2000 en TBS-T. Para la inmunodetección de muestras de *Arabidopsis* se le añade 5% BSA. La membrana se sometió a 3 lavados de 5 minutos cada uno con TBS-T, en agitación a temperatura ambiente. Posteriormente se incubó con el anticuerpo secundario correspondiente 45-60 minutos a temperatura ambiente. (Anti-IgG de conejo, anticuerpo conjugado con peroxidasa, BioRad) diluido 1:10000 en TBS-T. Se elimina el exceso de anticuerpo con tres lavados de 5 minutos cada uno con TBS-T. La detección de proteínas se hizo mediante un sistema de quimioluminiscencia (“*ECL Plus Western Blotting Detection System, Amersham Biosciences*”) siguiendo protocolo del fabricante. La señal fue analizada utilizando películas de rayos X (Kodak).

IV. RESULTADOS

1. ACTIVACIÓN DE Gcn2p POR DIFERENTES LESIONANTES EN LEVADURA.

Evidencias previas muestran que la quinasa Gcn2p regula el *checkpoint* G1/S en respuesta a daño al ADN en levadura (Menacho-Marquez *et al.* 2007). Por ello decidimos evaluar el comportamiento de Gcn2p frente al daño al ADN mediante distintos agentes químicos que causan lesiones en el ADN. Tratamos cultivos de la cepa BY4741 (WT) en fase exponencial de crecimiento con las siguientes concentraciones de droga: 5-FU (40 μ M), Camptotecina (0,5 mM), MMS (0,01%), β -lapachona (20 μ g/ml), Hidroxiurea (0,2M), Phleomicina (2,5 μ g/ml) Cis-platino (0,5 mM) y Nocodazol (10 μ g/ml) durante 1 y 2 horas y se recogieron las células para obtener extractos de proteínas. Para verificar la activación de Gcn2p por estos agentes lesionantes analizamos el estado de fosforilación de eIF2 α , el cuál es el sustrato fisiológico de la quinasa Gcn2p, mediante ensayo de inmunodetección con un anticuerpo que reconoce la forma fosforilada de eIF2 α . Los lesionantes que indujeron la activación de Gcn2p son 5-FU, MMS, β -lapachona, Hidroxiurea, y Phleomicina (Figura 3). Obtuvimos resultados similares para 2 horas de tratamiento.

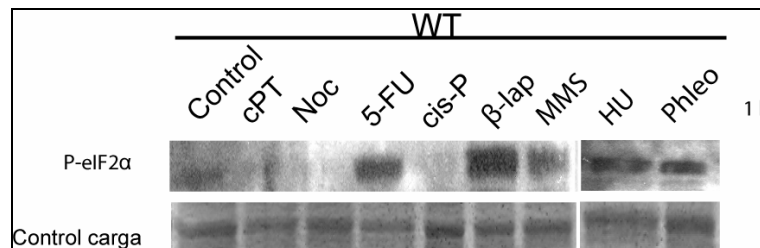


Figura 3: Caracterización de la activación de Gcn2p por diferentes agentes genotóxicos. Inmunodetección de fosforilación de eIF2 α en cultivos de células WT, tratadas durante una hora con: Camptotecina (cPT, 0,5 mM), Nocodazol (Noc, 10 μ g/ml), 5-FU (40 μ M), Cis-platino (Cis-p, 0,5 mM), β -lapachona (β -lap, 20 μ g/ml) MMS (0,01%), Hidroxiurea (HU, 0,2 M), Phleomicina (Phleo, 2,5 μ g/ml). Control de carga: Tinción de membrana con colorante *Direct Blue 71*.

Posteriormente caracterizamos la respuesta de Gcn2p a diferentes dosis de las drogas. En el caso de 5 FU se testaron 40, 60 y 80 μ M, mostrando activación a una hora de tratamiento en las tres concentraciones. (Figura 4). El tratamiento con MMS a distintas concentraciones, (0,025, 0,005, y 0,01%) indujo una activación muy clara de Gcn2p. En Hidroxiurea hay una leve activación en las tres concentraciones ensayadas (0,1 0,2 y 0,3M) pero más claramente en la de 0,2M. En camptotecina solo se distingue activación en 20 μ M, pero no a 10 y 40 μ M. En phleomicina no detectamos activación, en las concentraciones ensayadas. (Figura 4) Estos resultados nos indican que MMS es uno de los lesionantes de ADN que claramente activa a Gcn2p, estando este resultado de acuerdo con las evidencias descritas en la literatura (Natarajan *et al.* 2001). Por estas razones y para centrarnos en un solo agente realizamos la caracterización genética de los mutantes de la ruta GCN con dicho agente lesionante del ADN.

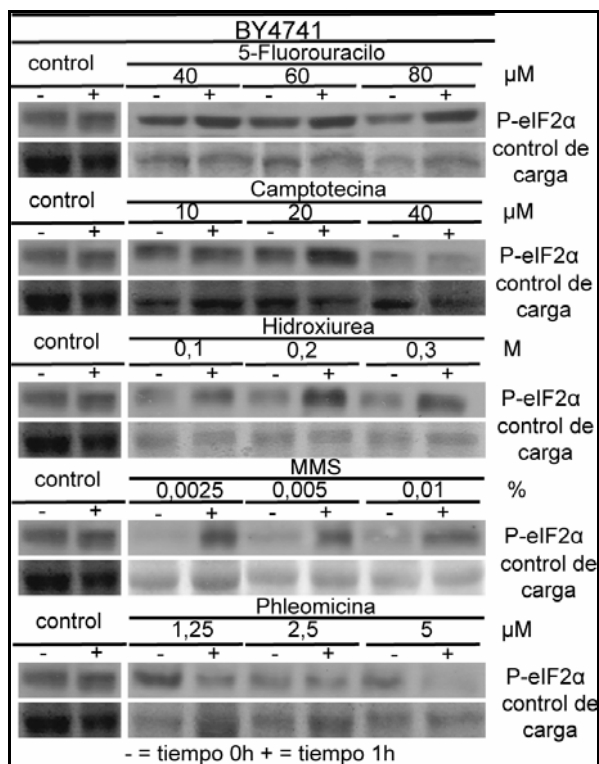


Figura 4: Lesionantes del ADN a distintas dosis activan Gcn2p. Inmunodetección de fosforilación de eIF2 α en cultivos celulares de WT, con tratamientos durante una hora de distintas dosis de Phleomicina, Hidroxiurea, 5-FU, MMS y Camptotecina.

2. CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE MUTANTES DE LA RUTA GCN CON MMS.

Con objeto de caracterizar con precisión la activación de Gcn2p por MMS, analizamos el estatus de fosforilación de eIF2 α y la viabilidad en los mutantes de la ruta GCN en comparación a la cepa WT. Para ello tratamos cultivos de células WT y del mutante *gcn2* Δ con MMS y analizamos el estado de fosforilación de Gcn2p tras el tratamiento. Realizamos un rango de dosis de 0,01%, 0,02%, 0,04% y 0,08% tratando las células durante 2 horas. Observamos que en WT hay una correlación positiva entre el incremento de fosforilación de eIF2 α y la dosis de MMS. (Figura 5A). En el mutante *gcn2* Δ no hay fosforilación. En los ensayos de viabilidad, llevados a cabo como se explica en el apartado 1.3 de materiales y métodos, muestran una disminución de la viabilidad con las dosis altas en ambas cepas. Solo se observan diferencias en 0,04% y 0,08%, donde el mutante es más sensible que WT. (Figura 5B). Estos datos, indican que Gcn2p se requiere para la supervivencia celular a dosis elevadas de MMS.

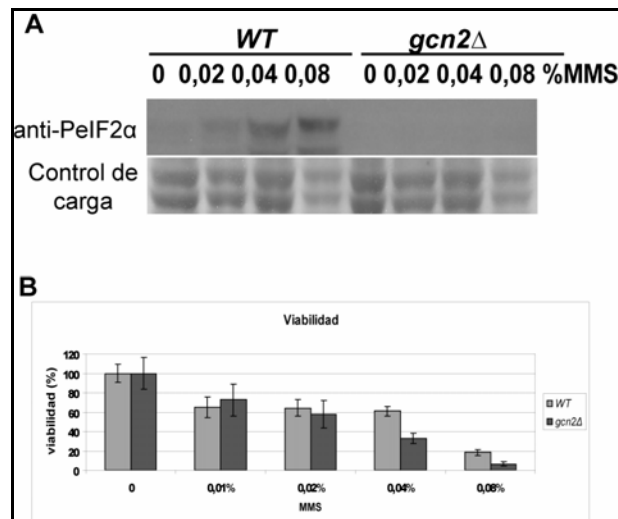


Figura 5: Caracterización mutante *gcn2Δ* **A.** Inmunodetección de eIF2α en cultivos celulares de WT y *gcn2Δ* tratados durante 2 horas con MMS a 0-0,02-0,04-0,08%. Control de carga: Tinción de membrana con colorante *Direct Blue 71*. **B.** Ensayo de viabilidad por crecimiento en placa YPD de células WT y *gcn2Δ*, tras dos horas de tratamiento con MMS. Los resultados se presentan como el porcentaje de crecimiento en presencia de MMS respecto al control sin tratar. (n=3, barras de error= desviación estándar)

Realizando el mismo experimento con el mutante *gcn1Δ* observamos el mismo patrón de fosforilación en WT, el cuál desaparece en el mutante (Figura 6A). Curiosamente, el mutante *gcn1Δ* mostró mayor tolerancia al tratamiento con MMS que el WT. En conjunto, estos datos indican que Gcn1p se requiere para la supervivencia en MMS y que Gcn1p está implicado en la activación de Gcn2p por MMS. Con el mutante *gcn20Δ* observamos una leve fosforilación a 0,08% de MMS. (Figura 7A). La sensibilidad a MMS fue similar a WT en todo el rango de dosis. (Figura 7B). Estos datos indican que Gcn20p está implicado en la activación de Gcn2p, pero es menos importante que Gcn1p.

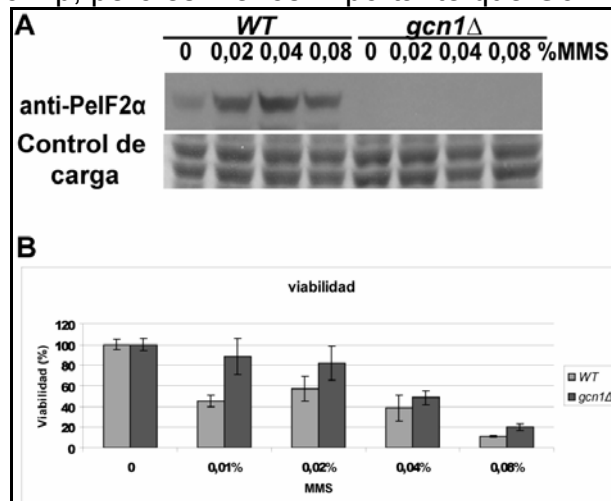


Figura 6: Caracterización mutante *gcn1Δ* : **A.** Inmunodetección de eIF2α en cultivos celulares de WT y *gcn1Δ* tratados durante 2 horas con MMS a 0-0,02-0,04-0,08%. Control de carga: Tinción de membrana con colorante *Direct Blue 71*. **B.** Ensayo de viabilidad por crecimiento en placa YPD de células WT y *gcn1Δ*, tras dos horas de tratamiento con MMS. Los resultados se presentan como el porcentaje de crecimiento en presencia de MMS respecto al control sin tratar. (n=3, barra error=desviación)

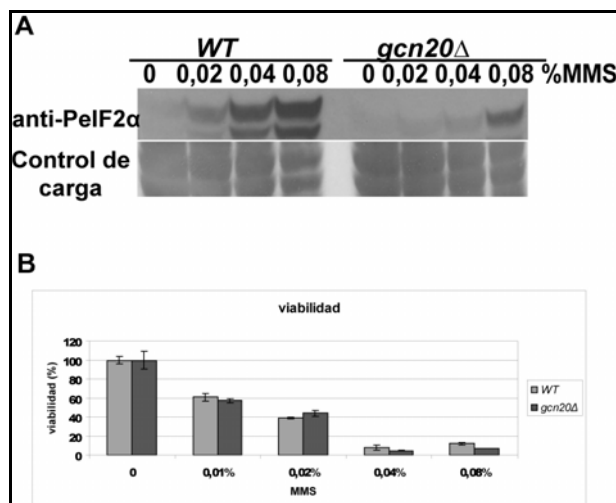


Figura 7: Caracterización mutante *gcn20Δ* : **A.** Inmunodetección de eIF2α en cultivos celulares de WT y *gcn20Δ* tratados durante 2 horas con MMS a 0-0,02-0,04-0,08%. Control de carga: Tinción de membrana con colorante *Direct Blue 71*. **B.** Ensayo de viabilidad por crecimiento en placa YPD de células WT y *gcn20Δ*, tras dos horas de tratamiento con MMS. Los resultados se presentan como el porcentaje de crecimiento en presencia de MMS respecto al control sin tratar. (n=3, barra error= desviación estándar)

Por otro lado el mutante *gcn3Δ* muestra un nivel de fosforilación similar a WT, (Figura 8A).Así como una sensibilidad a MMS similar a WT. (Figura 8B).

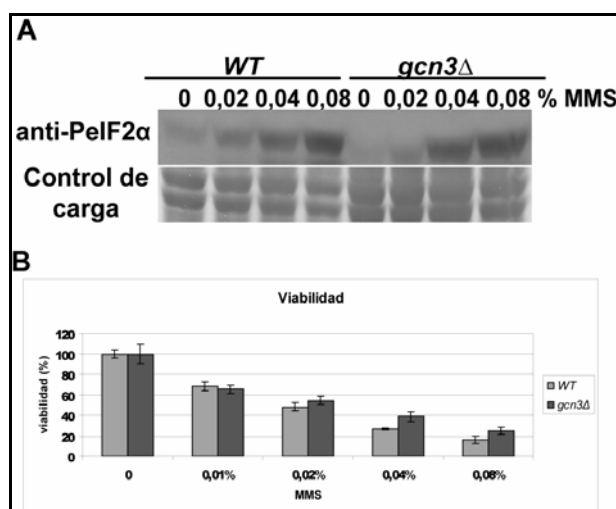


Figura 8: Caracterización mutante *gcn3Δ*: **A.** Inmunodetección de eIF2α en cultivos celulares de WT y *gcn3Δ* tratados durante 2 horas con MMS a 0-0,02-0,04-0,08%. Control de carga: Tinción de membrana con colorante Direct Blue 71. **B.** Ensayo de viabilidad por crecimiento en placa YPD de células WT y *gcn3Δ*, tras dos horas de tratamiento con MMS. Los resultados se presentan como el porcentaje de crecimiento en presencia de MMS respecto al control sin tratar. (n=3, barra error= desviación estándar)

En cuanto al mutante *gcn4Δ* muestra similar nivel de fosforilación de eIF2α que WT (Figura 9A) y misma supervivencia que WT. (Figura 9B). Estos fenotipos parece indicar que Gcn1p y Gcn20p están implicados en la activación de Gcn2p por el agente alquilante MMS.

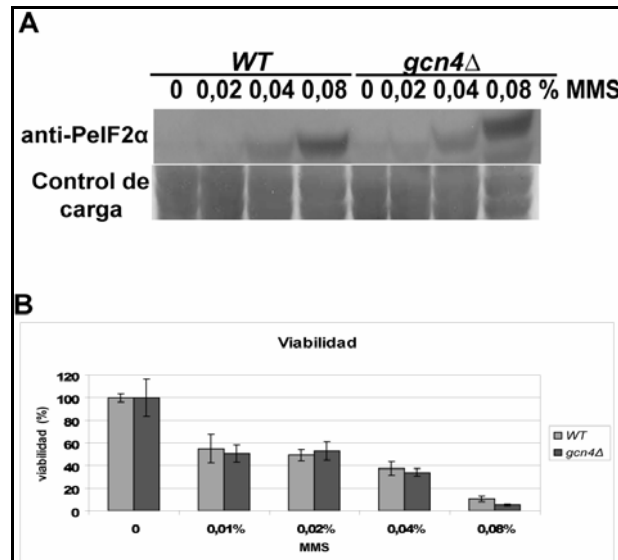


Figura 9: Caracterización mutante *gcn4Δ* : **A**. Inmunodetección de eIF2α en cultivos celulares de WT y *gcn4Δ* tratados durante 2 horas con MMS a 0-0,02-0,04-0,08%. Control de carga: Tinción de membrana con colorante *Direct Blue 71*. **B**. Ensayo de viabilidad por crecimiento en placa YPD de células WT y *gcn4Δ*, tras dos horas de tratamiento con MMS. Los resultados se presentan como el porcentaje de crecimiento en presencia de MMS respecto al control sin tratar. (n=3, barras de error= desviación estándar)

Para confirmar estos resultados realizamos un ensayo de crecimiento en medio líquido, midiendo absorbancia del cultivo o densidad óptica (OD). Estos cultivos se crecieron en microplaca tratándose con MMS a las mismas dosis que anteriormente. Todos los mutantes de la ruta GCN fueron sensibles a MMS de forma dependiente de la dosis similar a WT (Figura 10). Por lo tanto, la proliferación celular no se vio afectada en ninguno de los mutantes GCN.

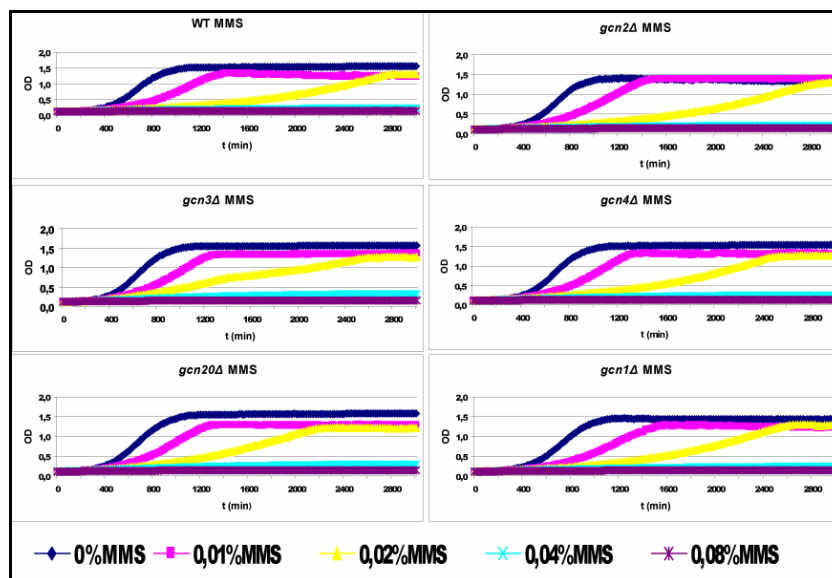


Figura 10: Curvas de crecimiento con MMS mutantes ruta GCN. Curvas de crecimiento de mutantes WT, *gcn1Δ*, *gcn2Δ*, *gcn3Δ*, *gcn4Δ*, *gcn20Δ* crecidos en medio líquido en microplaca de 100 pocillos con 0%, 0,01%, 0,02%, 0,04% y 0,08% de MMS en YPD, y analizado mediante Bioscreen.

3. DEPENDENCIA DE LAS PROTEÍNAS DE PUNTOS DE CONTROL DE CICLO O “CHECKPOINT” EN RESPUESTA A MMS.

Una vez caracterizado la implicación de la ruta GCN y en particular la quinasa Gcn2p en la respuesta a daño al ADN causado por el agente alquilante MMS, pasamos a explorar la dependencia de esta respuesta de las proteínas de *checkpoint*. Para ello disponemos de una serie de mutantes que son defectivos en genes que codifican proteínas implicadas en los *checkpoint* de daño al ADN. En concreto la cepa *WT* utilizada es defectiva en *SML1*, un inhibidor de la ribonucleótido reductasa. Se utiliza este fondo genético *sml1Δ* ya que la mutación en *SML1* suprime la letalidad de *mec1Δ* (Corda *et al.* 2005). Así, cultivos de cada cepa mutante en fase exponencial se distribuyeron en dos: tratándose uno con MMS, y al otro con el mismo volumen de agua estéril. Tras 2 horas se recogieron muestras para extractos proteicos y analizamos el estatus de fosforilación de eIF2 α mediante inmunodetección con el Anticuerpo anti P-eIF2 α . Como observamos en el *WT* existe una activación de Gcn2p por el tratamiento con MMS. Aunque Gcn2p también se activa en el mutante *xrs2Δ*, su grado de inducción es menor. Este ligero defecto de activación de Gcn2p también ocurre en el mutante *xmrΔ* (figura 12). Lo que sugiere, que de alguna forma Xrs2p estaría involucrado en la activación de Gcn2p. El complejo Mre11p-Rad50p-Xrs2p está involucrado en la reparación de roturas de doble banda del ADN mediante recombinación homóloga (Bressan *et al.* 1999). Por otro lado, la activación de Gcn2p se ve afectada en el mutante *tel1Δ*. Tel1p está implicado en la regulación de la longitud de los telómeros (Greenwell *et al.* 1995), y además está implicado en *checkpoint* de daño al ADN (Jackson 1996) siendo Tel1p una PIKK parcialmente redundante en su función con Mec1p (Nakada *et al.* 2003). En respuesta a daño al ADN, varias proteínas se fosforilan de un modo dependiente de Mec1p/Tel1p. En conjunto, estos datos indican que la activación de Gcn2p por MMS requiere de las proteínas Tel1p y Xrs2p. Aunque, reproducibles, debemos confirmar estos datos haciendo inmunodetección utilizando muestras de cultivos sincronizados en fase de ciclo.

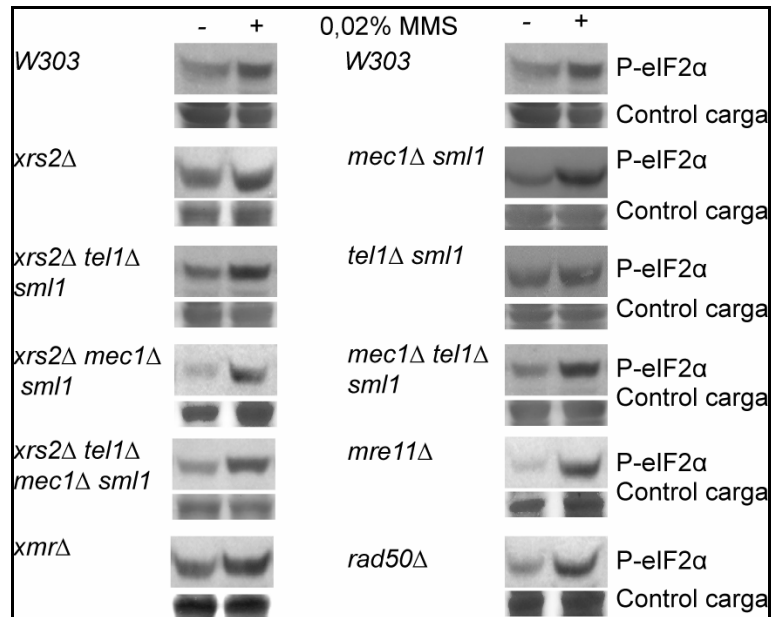


Figura 11: Análisis de proteínas de *checkpoint* en respuesta a 0,02% de MMS. Las distintas cepas fueron crecidas en cultivo líquido y tratadas a una OD (660nm)= 0,4-0,5. Siendo el – con agua y + con 0,02% MMS durante dos horas. Se obtuvieron extractos proteicos y se realizó inmunodetección con PeIF2 α (Ser51). Control de carga: Tinción de membrana con colorante *Direct Blue 71*. La figura muestra un experimento representativo de al menos 2 independientes cada uno en duplicado. Los resultados obtenidos fueron esencialmente similares.

4. ESTUDIO DE LA DEPENDENCIA DE PROTEÍNAS DE REPARACIÓN EN RESPUESTA A MMS.

Realizamos un análisis de la dependencia de distintas proteínas de reparación a la respuesta de daño al ADN por tratamiento con el agente alquilante MMS. Para ello utilizamos una serie de mutantes de proteínas de reparación en el fondo genético BY4741. Las distintas cepas y el control BY4741 fueron crecidas hasta la fase exponencial y tratadas durante 2 horas con MMS al 2% o con agua. Este rastreo mediante inmunodetección con el anticuerpo frente a PeIF2 α mostró que de todos los mutantes de reparación analizados, solo *mag1* Δ mostró una activación defectiva de Gcn2p por MMS de forma reproducible (figura 13). MAG1 codifica una ADN glicosilasa (necesaria para la reparación de lesiones por agentes alquilantes como MMS. Este resultado sugiere que la activación de Gcn2p por MMS depende de la proteína de reparación Mag1p.

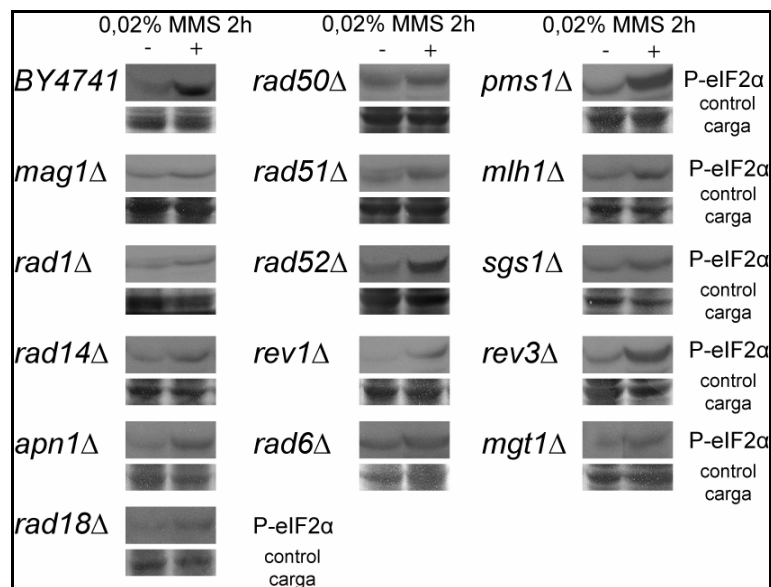


Figura 12: Análisis de proteínas de reparación en respuesta a 0,02% de MMS en relación a Gcn2p. Las distintas cepas fueron crecidas en cultivo líquido y tratadas a una OD(660nm)= 0,4-0,5. Siendo el – con agua y + con 0,02% MMS durante dos horas. Se obtuvieron extractos proteicos y se realizó inmunodetección con P-eIF2 α (Ser51). Control de carga: Tinción de membrana con colorante *Direct Blue 71*. La figura muestra un experimento representativo de al menos 2 independientes cada uno en duplicado. Los resultados obtenidos fueron esencialmente similares.

5. ESTABLECIMIENTO DEL MODELO EN *Arabidopsis*.

5.1 Obtención del mutante *AtGCN2Δ* y caracterización bioquímica.

Con el objetivo de establecer un modelo en plantas para validar los hallazgos encontrados en levadura obtuvimos la línea GT8385, mutante homocigoto para *AtGCN2* por pérdida de función como se describe en (Zhang *et al.* 2008). Ésta línea obtenida por trampa de genes lleva una inserción de elementos transponibles (Ds) en el fondo genético *Landsberg*. En la línea GT8385 (*AtGCN2Δ*) los elementos transponibles están insertados en el primer intrón del gen *AtGCN2* (Figura 13). La presencia del elemento transponible en la región génica correspondiente de *AtGCN2Δ* fue comprobada mediante amplificación de dos fragmentos por PCR. El primero, amplificado usando cebadores específicos para *AtGCN2* y el T-ADN, estuvo presente en la línea mutante pero no en el *WT*. El segundo fragmento, amplificado con cebadores específicos de *AtGCN2* en la zona de inserción, se amplificó en *WT* pero no en la línea mutante. Confirmando que la línea obtenida es homocigota y contiene un transposón interrumpiendo la secuencia del gen AT3G59410 (*AtGCN2*) (Datos no mostrados).

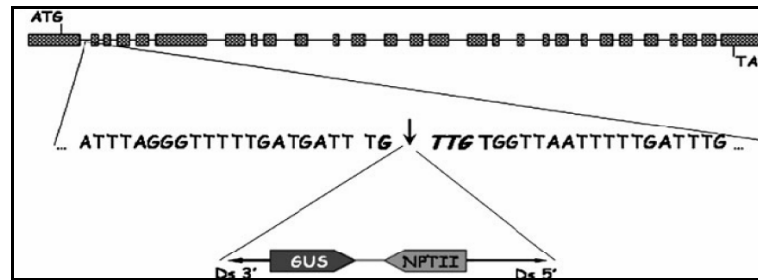


Figura 13: Diagrama con sitios de inserción y orientación de elementos DS en el primer intrón de *AtGCN2Δ*, línea mutante por trampa de genes GT8359. (Zhang *et al.* 2008).

Según se describe en (Zhang *et al.* 2008), el tratamiento de plántulas de *Arabidopsis thaliana* con el herbicida glifosato induce la activación de AtGcn2p, provocando la fosforilación de eIF2 α y pudiendo ser ésta detectada con un Anticuerpo frente a la forma fosforilada de eIF2 α . Ésta fosforilación es dependiente de AtGcn2 ya que la línea mutante GT8359 no consigue fosforilar eIF2 α (Zhang *et al.* 2008). Con objetivo de poner a punto el mismo ensayo bioquímico en nuestro laboratorio, y adaptarlo a la posible implicación de AtGcn2 en el control de la estabilidad genómica en *A. thaliana* realizamos inmunodetección de fosforilación de eIF2 α de *Arabidopsis* (AtelF2 α) por AtGcn2 en respuesta a tratamiento con herbicidas (Zhang *et al.* 2008). Analizamos mediante inmunodetección con anticuerpo anti P-eIF2 α la activación de AtGcn2p en muestras de plántulas de 14 días tratadas con 200 μ M de glifosato, así como muestras control sin tratar. Observamos una activación de AtGcn2p en WT (Ler) tratado con herbicida, dicha activación no apareció en las muestras de la línea mutante *AtGCN2Δ*. (Figura 14). Este resultado no lo pudimos detectar utilizando muestras de plantas adulta (estado de roseta).

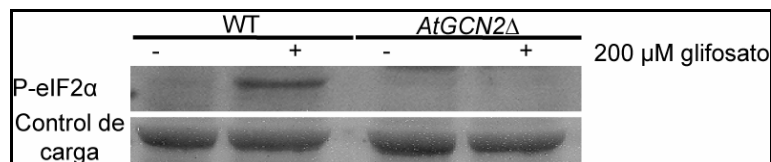


Figura 14: Inmunodetección de AtelF2 α fosforilado por tratamiento con glifosato. Inmunodetección de eIF2 α en muestras de plántulas de 14 días de edad tratadas por inmersión en 200 ml de solución de 200 μ M de glifosato en MS (+) o solo MS (-) depositadas después en placas MS durante 6 horas. Se cargaron 10 μ g de proteína por pocillo. Control de carga: Tinción de membrana con *Direct Blue 71*.

5.2 Ensayos preliminares de caracterización de *AtGCN2* en estabilidad genómica.

Para caracterizar la posible implicación *AtGCN2* en estabilidad genómica, llevamos a cabo ensayos de germinación con tratamientos de agentes lesionantes del ADN. Como control, caracterizamos el fenotipo de sensibilidad a herbicidas que afectan a la biosíntesis de aminoácidos (Zhang *et al.* 2008) como clorsulfuron o glifosato, y confirmar así los datos publicados. Las plántulas germinadas *in Vitro* de 12 días de edad se sumergieron en solución con herbicida (glifosato a 200 μ M y bensulfuron-metil a 0,5 μ M) durante 1 minuto y se replantaron en placas frescas suplementadas con aminoácidos

(Phe, Tyr y Trp, para glifosato y Ile, Leu, y Val para bensulfuron-metil) o sin suplementar. La línea mutante *AtGCN2Δ* mostró sensibilidad a bensulfuron-metil y este fenotipo fue revertido por la presencia en el medio de Isoleucina, Leucina y Valina (Figura 15) en comparación al control sin tratar. Resultados similares se observaron para el herbicida glifosato.

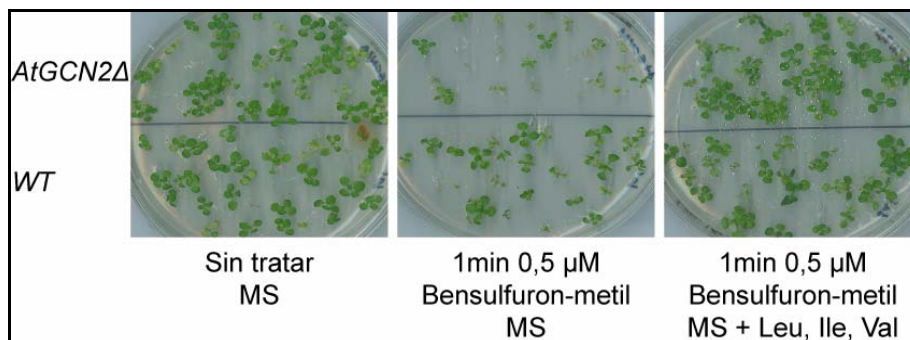


Figura 15: Caracterización fenotípica de *AtGCN2Δ*. Fenotipo de plántulas WT y *AtGCN2Δ* de 12 días sumergidas en 100 ml de solución 0,5 μM de Bensulfuron-metil en MS durante 1 minuto y replantada en placas frescas de MS y MS suplementadas con aminoácidos Leucina, Isoleucina y Valina. Como control se sumergieron en 100 ml de MS durante 1 minuto.

Paralelamente, hicimos ensayos de germinación con HU (0,5-1-1,5-2-2,5-3-5 mM), 5FU (40-60-80-100 μM) y MMS (0,01-0,02 y 0,05%). Estos ensayos se realizaron tanto en placa horizontal como en placa para crecimiento en vertical, para observar si existían diferencias en el desarrollo del sistema radicular.

No se observó fenotipo diferencial entre WT y mutante *AtGCN2Δ* en germinación, ni se vio diferencia en el desarrollo radicular, en ningún tratamiento (datos no mostrados). Sí existen diferencias entre las plántulas tratadas y los controles sin tratar, disminuyendo la germinación en las mismas, de manera similar entre ambas líneas.

A pesar de no encontrar fenotipo en respuesta a tratamiento con lesionantes, pensamos que sería posible que *AtGcn2p* estuviera activa por dichos tratamientos. Por ello se probó a realizar inmunodetección de *AtF2α* fosforilada en muestras tratadas con 5, 10 y 20mM Hidroxiurea. El tratamiento se realizó a plántulas de 15 días de edad dejando 2-3 días en cultivo *in Vitro* en medio líquido con y sin tratamiento. La inmunodetección mostró una activación de *AtGcn2p* en 5mM de hidroxiurea similar a la mostrada con tratamiento con glifosato (Figura 16). Pero a concentraciones mayores esta activación se perdió. Es posible que el tiempo de tratamiento y la dosis afecten a la activación, o bien porque se inhibe o bien porque es transitoria, de modo que habrá que realizar más ensayos acotando estos parámetros. Este resultado preliminar parece indicar que, al igual que ocurre en levadura, la proteína *Gcn2p* parece activarse en respuesta a lesionantes del ADN, y abre una nueva línea de investigación en nuestro laboratorio con objeto de explorar dicha respuesta en plantas.

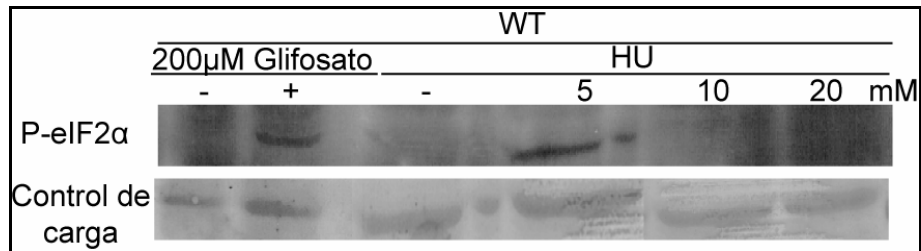


Figura 16: Inmunodetección de fosforilación de AtelF2α por tratamiento con HU. Inmunodetección con Anticuerpo frente a la forma fosforilada de fosforilación de AtelF2α en muestras de plántulas WT de 15 días cultivadas en medio líquido con 5, 10 y 20 mM de hidroxurea o medio MS (-) durante 3 días. Como control positivo utilizamos muestras de plántulas WT de 12 días de edad tratadas por inmersión en solución de glifosato 200μM (+) o solo agua (-) durante 1 minuto y dejadas 6 horas en placa. Se cargaron 10 μg de proteína por pocillo. Control de carga: Tinción de membrana con *Direct Blue 71*.

V. DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en este trabajo final de máster muestran una conexión funcional entre la quinasa Gcn2p y la estabilidad genómica. Así los datos obtenidos indican que diferentes lesionantes del ADN, tales como MMS, 5-FU, HU, Phleomicina y β -lapachona, inducen la activación de Gcn2p en levadura (Figura 3). La caracterización genética de los mutantes de la ruta GCN con MMS indica que Gcn2p se requiere para la supervivencia celular a elevadas dosis de MMS, y las proteínas Gcn1p y Gcn20p están implicadas en la activación de Gcn2p por MMS, como se desprende de los resultados de inmunodetección de P-eIF2 α . Posteriormente exploramos la implicación de las proteínas relacionadas con *checkpoint* de daño al ADN en la respuesta a MMS. Los resultados obtenidos indican que la activación de Gcn2p por MMS requiere de las proteínas Tel1p y Xrs2p (Figura 11). Por otro lado, el rastreo de proteínas de reparación del ADN sugiere que la activación de Gcn2p por MMS depende de la proteína de reparación Mag1, ya que solo *mag1* Δ mostró una activación defectiva de Gcn2p por MMS de forma reproducible (Figura 12). En cuanto al gen *AtGCN2* de *Arabidopsis thaliana* obtuvimos un fenotipo de sensibilidad en condiciones de privación de aminoácidos por tratamiento con el herbicida bensulfuron-metil (Figura 15). Estas condiciones de privación de aminoácidos activan a AtGcn2p como muestra nuestro resultado tras tratamiento con glifosato (Figura 14).

Diferentes lesionantes del ADN activan a Gcn2p, pero ¿cómo ocurre esto? Por un lado se conoce que el incremento de los niveles de eIF2 α fosforilados se debe a la estimulación de la función quinasa provocado por la unión de cualquier ARNt descargado (Lanker *et al.* 1992; Hinnebusch 1997; Hinnebusch 2005). Pero la presencia de ARNt descargados no es suficiente para la activación de Gcn2p, ya que la activación de Gcn2p por ARNt descargados también requiere interacción directa con el complejo regulador Gcn1p/Gcn20p (García-Barrio *et al.* 2000; Sattlegger and Hinnebusch 2005). Esto ocurre a través del dominio N-terminal de Gcn2p que se une al dominio C-terminal de Gcn1p, y esta unión es ayudada por Gcn20p que se encuentra unida a Gcn1p por la porción N-terminal al dominio eEF3 de Gcn1p. (Kubota *et al.* 2001; Kubota *et al.* 2003) (Figura 2). Estos hechos apoyan nuestro resultado de implicación de Gcn1/20p en la activación de Gcn2p. Aunque la acumulación de ARNt descargados no ha sido comprobada en estas condiciones, se sabe que MMS activa a Gcn2p en condiciones en las que no hay ayuno y de un modo dependiente de Gcn1/20p (Natarajan *et al.* 2001). La presencia de ARNt descargados se puede explicar mediante la inhibición de aminoacil-ARNt sintetasas por el tratamiento con MMS. En este sentido, recientemente se ha descrito que es uno de los mecanismos de activación de Gcn2p por estrés (Hueso *et al.* in press). Por lo tanto, los datos obtenidos de la implicación de Gcn1p y Gcn20p en la activación de Gcn2p por MMS son consistentes con esta hipótesis. Así que de alguna manera Gcn2p es un regulador clave de la respuesta a lesiones del ADN, más específicamente de aquellas que generan estrés replicativo. Curiosamente, el mutante *gcn1* Δ es tolerante a dosis bajas de MMS, la razón de esa tolerancia se desconoce, y se está investigando en este momento en el laboratorio.

En general, los datos de viabilidad muestran una correlación negativa. La activación Gcn2p por MMS parece ser dependiente de las proteínas Tel1p,

Xrs2p y Mag1p, ya que en todos los mutantes de dichas proteínas muestran un ligero defecto de activación de Gcn2p. La proteína Tel1p y Xrs2p están implicadas en la respuesta a daño al ADN, mediante una cascada de fosforilaciones que translucen la señal de daño hasta las moléculas efectoras. Tel1p es parcialmente redundante con el regulador central Mec1p, una vez Mec1p es reclutado en los sitios de daño. Xrs2p forma parte del complejo MRN (Mre11/Rad50/Xrs2) que es diana de Mec1p y Tel1p y está implicado en reparación del ADN. Por otro lado, *MAG1* codifica 3-metiladenina ADN glicosilasa implicada en la protección del ADN frente a agentes alquilantes como lo es MMS. Esta proteína inicia la reparación del ADN mediante la escisión de bases dañadas para crear sitios abasicos, para la subsiguiente reparación de los mismos. El requerimiento de estas proteínas para la activación de Gcn2p, sugiere que, de alguna manera interaccionan directa o indirectamente con Gcn2p. Alternativamente también podrían indicar que Gcn2p contribuiría de alguna forma a la correcta funcionalidad de las mismas. Estas dos posibilidades se están explorando en el laboratorio

En *Arabidopsis* el gen *AtGCN2* se activa por ayuno de aminoácidos, y el mutante *AtGCN2Δ* muestra sensibilidad a herbicidas que provocan dicho ayuno (Zhang *et al.* 2008). La confirmación de estos resultados, y la puesta a punto en nuestro laboratorio del ensayo bioquímico que permite detectar la activación de GCN2 en *Arabidopsis* (fosforilación de eIF2 α), nos servirán en un futuro para la caracterización del papel de *AtGCN2* en la estabilidad genómica en plantas. En los ensayos previos de inmunodetección de eIF2 α en muestras tratadas con HU se observa una inducción de AtGcn2p tras tratamiento con 5mM HU, aunque esta activación es inhibida a concentraciones mayores (Figura 16). Dado que se trata de un experimento preliminar, existen múltiples explicaciones a este resultado, por ejemplo, que la activación sea transitoria y que el ensayo se haya realizado a tiempos demasiado largos, o bien que la activación dependa de la dosis utilizada. Lógicamente, hay que realizar más ensayos utilizando diferentes ventanas temporales, para confirmar ésta u otras hipótesis. En un futuro también realizaremos ensayos utilizando otros agentes lesionantes.

VI. CONCLUSIONES

1. Gcn2p es un regulador clave de la respuesta a lesiones del ADN, y más específicamente de aquellas que generan estrés replicativo.
2. La activación de la quinasa Gcn2p por MMS es dependiente de las proteínas Gcn1p y Gcn20p. Este hecho sugiere que la activación de Gcn2p por daño al ADN implica la acumulación de ARNt descargados.
3. La activación de de Gcn2p por MMS depende de las quinasas de *checkpoint* Tel1p y Xrs2p y de la proteína de reparación Mag1p y es independiente de otras proteínas como Rad9p, y el grupo epistático Rad24p. Por lo tanto, Gcn2p está conectado funcionalmente con la maquinaria de reparación del ADN y/o de *checkpoint*.
4. Puesta a punto en *Arabidopsis thaliana* del ensayo bioquímico para detectar la activación de AtGCN2, que nos permitirá validar el papel de AtGCN2 en la estabilidad genómica en plantas.

VII. BIBLIOGRAFÍA

VII. BIBLIOGRAFÍA

Assenmacher, N. and K.-P. Hopfner (2004). "MRE11/RAD50/NBS1: complex activities." Chromosoma **113**(4): 157-166.

Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Analytical Biochemistry **72**(1-2): 248-254.

Bressan, D. A., B. K. Baxter and J. H. J. Petrini (1999). "The Mre11-Rad50-Xrs2 Protein Complex Facilitates Homologous Recombination-Based Double-Strand Break Repair in *Saccharomyces cerevisiae*." Mol. Cell. Biol. **19**(11): 7681-7687.

Burke D., D. D., Stearns T. (2000). "Methods in yeast genetics (A cold Spring Harbor Laboratory course manual)." A cold Spring Harbor , New york, Cold Spring Harbor Laboratory Press(2000 Edition).

Corda, Y., S. E. Lee, S. Guillot, A. Walther, J. Sollier, A. Arbel-Eden, J. E. Haber and V. Geli (2005). "Inactivation of Ku-Mediated End Joining Suppresses *mec1*{ Δ } Lethality by Depleting the Ribonucleotide Reductase Inhibitor *Sml1* through a Pathway Controlled by *Tel1* Kinase and the *Mre11* Complex." Mol. Cell. Biol. **25**(23): 10652-10664.

Costa-Mattioli, M., D. Gobert, E. Stern, K. Gamache, R. Colina, C. Cuello, W. Sossin, R. Kaufman, J. Pelletier, K. Rosenblum, K. Krnjevic, J. C. Lacaille, K. Nader and N. Sonenberg (2007). "eIF2 α phosphorylation bidirectionally regulates the switch from short- to long-term synaptic plasticity and memory." Cell **129**(1): 195-206.

Costa-Mattioli, M., W. S. Sossin, E. Klann and N. Sonenberg (2009). "Translational Control of Long-Lasting Synaptic Plasticity and Memory." Neuron **61**(1): 10-26.

Czornak, K., S. Chughtai and K. H. Chrzanowska (2008). "Mystery of DNA repair: the role of the MRN complex and ATM kinase in DNA damage repair." Journal of applied genetics **49**(4): 383-96.

Chang, M., M. Bellaoui, C. Boone and G. W. Brown (2002). "A genome-wide screen for methyl methanesulfonate-sensitive mutants reveals genes required for S phase progression in the presence of DNA damage." Proceedings of the National Academy of Sciences **99**(26): 16934-16939.

Chen, J. J., M. S. Throop, L. Gehrke, I. Kuo, J. K. Pal, M. Brodsky and I. M. London (1991). "Cloning of the cDNA of the heme-regulated eukaryotic initiation factor 2 α (eIF-2 α) kinase of rabbit reticulocytes: homology to yeast GCN2 protein kinase and human double-stranded-RNA-dependent eIF-2 α kinase." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **88**(17): 7729-33.

Dever, T. E., Dar A.C., Sicheri, F. (2007). The eIF2alpha kinases. Translational Control in Biology and Medicine. M. B. Mathews, Sonenberg, N., and Hershey, J.W.B. (Ed). Cold Spring Harbor, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2007: 319-345.

Garcia-Barrio, M., J. Dong, S. Ufano and A. G. Hinnebusch (2000). "Association of GCN1-GCN20 regulatory complex with the N-terminus of eIF2[alpha] kinase GCN2 is required for GCN2 activation." EMBO J **19**(8): 1887-1899.

Greenwell, P. W., S. L. Kronmal, S. E. Porter, J. Gassenhuber, B. Obermaier and T. D. Petes (1995). "TEL1, a gene involved in controlling telomere length in *S. cerevisiae*, is homologous to the human ataxia telangiectasia gene." Cell **82**(5): 823-829.

Hao, S., J. W. Sharp, C. M. Ross-Inta, B. J. McDaniel, T. G. Anthony, R. C. Wek, D. R. Cavener, B. C. McGrath, J. B. Rudell, T. J. Koehnle and D. W. Gietzen (2005). "Uncharged tRNA and Sensing of Amino Acid Deficiency in Mammalian Piriform Cortex." Science **307**(5716): 1776-1778.

Harding, H. P., Y. Zhang, A. Bertolotti, H. Zeng and D. Ron (2000). "Perk Is Essential for Translational Regulation and Cell Survival during the Unfolded Protein Response." Molecular Cell **5**(5): 897-904.

Harlow, E., and Lane, D. (1988). Antibodies: A Laboratory Manual. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

He, C. H., J.-Y. Masson and D. Ramotar (1996). "A *Saccharomyces cerevisiae* phleomycin-sensitive mutant, *phl40*, is defective in the *RAD6* DNA repair gene." Canadian Journal of Microbiology **42**(12): 1263-1266.

Hinnebusch, A. G. (1997). "Translational Regulation of Yeast GCN4." Journal of Biological Chemistry **272**(35): 21661-21664.

Hinnebusch, A. G. (2005). "Translational regulation of GCN4 and the general amino acid control of yeast " Annual Review of Microbiology **59**(1): 407-450.

Hueso, G., R. Aparicio-Sanchis, C. Montesinos, S. Lorenz, J. R. Murguía and R. Serrano (in press). A novel role of protein kinase Gcn2 in yeast tolerance to intracellular acid stress, Biochemical Journal.

Icely, P. L., P. Gros, J. J. Bergeron, A. Devault, D. E. Afar and J. C. Bell (1991). "TIK, a novel serine/threonine kinase, is recognized by antibodies directed against phosphotyrosine." Journal of Biological Chemistry **266**(24): 16073-16077.

Jackson, S. P. (1996). "The recognition of DNA damage." Current Opinion in Genetics & Development **6**(1): 19-25.

Kimball, S. R., N. K. Heinzinger, R. L. Horetsky and L. S. Jefferson (1998). "Identification of Interprotein Interactions between the Subunits of Eukaryotic

Initiation Factors eIF2 and eIF2B." Journal of Biological Chemistry **273**(5): 3039-3044.

Kleijn, M., G. C. Scheper, H. O. Voorma and A. A. M. Thomas (1998). "Regulation of translation initiation factors by signal transduction." European Journal of Biochemistry **253**(3): 531-544.

Krishnamoorthy, T., G. D. Pavitt, F. Zhang, T. E. Dever and A. G. Hinnebusch (2001). "Tight Binding of the Phosphorylated {alpha} Subunit of Initiation Factor 2 (eIF2{alpha}) to the Regulatory Subunits of Guanine Nucleotide Exchange Factor eIF2B Is Required for Inhibition of Translation Initiation." Mol. Cell. Biol. **21**(15): 5018-5030.

Kubota, H., T. Obata, K. Ota, T. Sasaki and T. Ito (2003). "Rapamycin-induced translational derepression of GCN4 mRNA involves a novel mechanism for activation of the eIF2alpha kinase GCN2." J. Biol. Chem.: C300133200.

Kubota, H., K. Ota, Y. Sakaki and T. Ito (2001). "Budding yeast GCN1 binds GI domain to activate the eIF2alpha kinase GCN2." J. Biol. Chem.: M011793200.

Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4." Nature **227**(5259): 680-685.

Lageix, S., E. Lanet, M. N. Pouch-Pelissier, M. C. Espagnol, C. Robaglia, J. M. Deragon and T. Pelissier (2008). "Arabidopsis eIF2alpha kinase GCN2 is essential for growth in stress conditions and is activated by wounding." BMC plant biology **8**: 134.

Lanker, S., J. L. Bushman, A. G. Hinnebusch, H. Trachsel and P. P. Mueller (1992). "Autoregulation of the yeast lysyl-tRNA synthetase gene GCD5/KRS1 by translational and transcriptional control mechanisms." Cell **70**(4): 647-657.

Mellor, H., K. M. Flowers, S. R. Kimball and L. S. Jefferson (1994a). "Cloning and characterization of cDNA encoding rat hemin-sensitive initiation factor-2 alpha (eIF-2 alpha) kinase. Evidence for multitissue expression." Journal of Biological Chemistry **269**(14): 10201-10204.

Mellor, H., K. M. Flowers, S. R. Kimball and L. S. Jefferson (1994b). "Cloning and characterization of a cDNA encoding rat PKR, the double-stranded RNA-dependent eukaryotic initiation factor-2 kinase." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression **1219**(3): 693-696.

Menacho-Marquez, M., J. Perez-Valle, J. Ariño, J. Gadea and J. R. Murguía (2007). "Gcn2p Regulates a G1/S Cell Cycle Checkpoint in Response to DNA Damage." Cell Cycle **6** (18): 2302-2305.

Meurs, E., K. Chong, J. Galabru, N. S. B. Thomas, I. M. Kerr, B. R. G. Williams and A. G. Hovanessian (1990). "Molecular cloning and characterization of the human double-stranded RNA-activated protein kinase induced by interferon." Cell **62**(2): 379-390.

Morrow, D. M., D. A. Tagle, Y. Shiloh, F. S. Collins and P. Hieter (1995). "TEL1, an *S. cerevisiae* homolog of the human gene mutated in ataxia telangiectasia, is functionally related to the yeast checkpoint gene MEC1." Cell **82**(5): 831-40.

Murashige, T. and F. Skoog (1962). "A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures." Physiologia Plantarum **15**(3): 473-497.

Nakada, D., T. Shimomura, K. Matsumoto and K. Sugimoto (2003). "The ATM-related Tel1 protein of *Saccharomyces cerevisiae* controls a checkpoint response following phleomycin treatment." Nucleic Acids Research **31**(6): 1715-1724.

Narasimhan, J., K. A. Staschke and R. C. Wek (2004). "Dimerization Is Required for Activation of eIF2 Kinase Gcn2 in Response to Diverse Environmental Stress Conditions." Journal of Biological Chemistry **279**(22): 22820-22832.

Natarajan, K., M. R. Meyer, B. M. Jackson, D. Slade, C. Roberts, A. G. Hinnebusch and M. J. Marton (2001). "Transcriptional Profiling Shows that Gcn4p Is a Master Regulator of Gene Expression during Amino Acid Starvation in Yeast." Mol. Cell. Biol. **21**(13): 4347-4368.

Paciotti, V., G. Lucchini, P. Plevani and M. P. Longhese (1998). "Mec1p is essential for phosphorylation of the yeast DNA damage checkpoint protein Ddc1p, which physically interacts with Mec3p." The EMBO journal **17**(14): 4199-209.

Prinz, W. (2003). Guide to yeast genetics and molecular and cell biology. New York, Academic Press.

Proud, C. G. (2005). "eIF2 and the control of cell physiology." Seminars in cell & developmental biology **16**(1): 3-12.

Qiu, H., J. Dong, C. Hu, C. S. Francklyn and A. G. Hinnebusch (2001). "The tRNA-binding moiety in GCN2 contains a dimerization domain that interacts with the kinase domain and is required for tRNA binding and kinase activation." EMBO J **20**(6): 1425-1438.

Rolfes, R. J. and A. G. Hinnebusch (1993). "Translation of the yeast transcriptional activator GCN4 is stimulated by purine limitation: implications for activation of the protein kinase GCN2." Molecular and cellular biology **13**(8): 5099-111.

Sanchez, Y., B. A. Desany, W. J. Jones, Q. Liu, B. Wang and S. J. Elledge (1996). "Regulation of RAD53 by the ATM-like kinases MEC1 and TEL1 in yeast cell cycle checkpoint pathways." Science (New York, N.Y.) **271**(5247): 357-60.

- Sattlegger, E. and A. G. Hinnebusch (2005). "Polyribosome binding by GCN1 is required for full activation of eukaryotic translation initiation factor 2{alpha} kinase GCN2 during amino acid starvation." The Journal of biological chemistry **280**(16): 16514-21.
- Shaikhin, S. M., S. K. Smailov, A. V. Lee, E. V. Kozhanov and B. K. Iskakov (1992). "Interaction of wheat germ translation initiation factor 2 with GDP and GTP." Biochimie **74**(5): 447-454.
- Sonenberg, N. and A. G. Hinnebusch (2007). "New Modes of Translational Control in Development, Behavior, and Disease." Molecular Cell **28**(5): 721-729.
- Sood, R., A. C. Porter, D. A. Olsen, D. R. Cavener and R. C. Wek (2000). "A mammalian homologue of GCN2 protein kinase important for translational control by phosphorylation of eukaryotic initiation factor-2alpha." Genetics **154**(2): 787-801.
- Szekeres, T., M. Fritzer-Szekeres, H. L. Elford and H. M. Jayaram (1997). "The Enzyme Ribonucleotide Reductase: Target for Antitumor and Anti-HIV Therapy." Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences **34**(6): 503-528.
- Tvegard, T., H. I. Soltani, H. C. Skjolberg, M. Krohn, E. A. Nilssen, S. E. Kearsey, B. Grallert and E. Boye (2007). "A novel checkpoint mechanism regulating the G1/S transition." Genes & Development **21**(6): 649-654.
- Walker, J. M., H.-Y. Hong, G.-S. Yoo and J.-K. Choi (2002). Detection of Proteins on Blots Using Direct Blue 71. The Protein Protocols Handbook, Humana Press: 387-392.
- Wek RC, J. H., and Anthony TG (2006). "Coping with stress: eIF2 kinases and translational control." Biochem Soc Trans **34**: 7-11.
- Yang, W. and A. G. Hinnebusch (1996). "Identification of a regulatory subcomplex in the guanine nucleotide exchange factor eIF2B that mediates inhibition by phosphorylated eIF2." Mol. Cell. Biol. **16**(11): 6603-6616.
- Zhang, Y., J. R. Dickinson, M. J. Paul and N. G. Halford (2003). "Molecular cloning of an arabidopsis homologue of GCN2, a protein kinase involved in co-ordinated response to amino acid starvation." Planta **217**(4): 668-675.
- Zhang, Y., Y. Wang, K. Kanyuka, M. A. J. Parry, S. J. Powers and N. G. Halford (2008). "GCN2-dependent phosphorylation of eukaryotic translation initiation factor-2alpha in Arabidopsis." Journal of Experimental Botany **59**(11): 3131-3141.
- Zhou, B.-B. S. and S. J. Elledge (2000). "The DNA damage response: putting checkpoints in perspective." Nature **408**(6811): 433-439.