

ELUCIDACIÓN DEL ROL DE GCR1 EN LA REGULACIÓN DE LA SENSIBILIDAD AL ÁCIDO ABSCÍSICO Y A LA RESPUESTA AL ESTRÉS POR ALUMINIO MEDIANTE EL ANÁLISIS DEL MUTANTE DE ADN-t *gcr1-2* en *Arabidopsis thaliana*

Juliana Chaura, Vanessa Reyes,
Mauricio Quimbaya, Fabián Tobar y
Thaura Ghneim



Proteínas G

Familia de proteínas transductoras de señales que modulan un amplio abanico de respuestas:

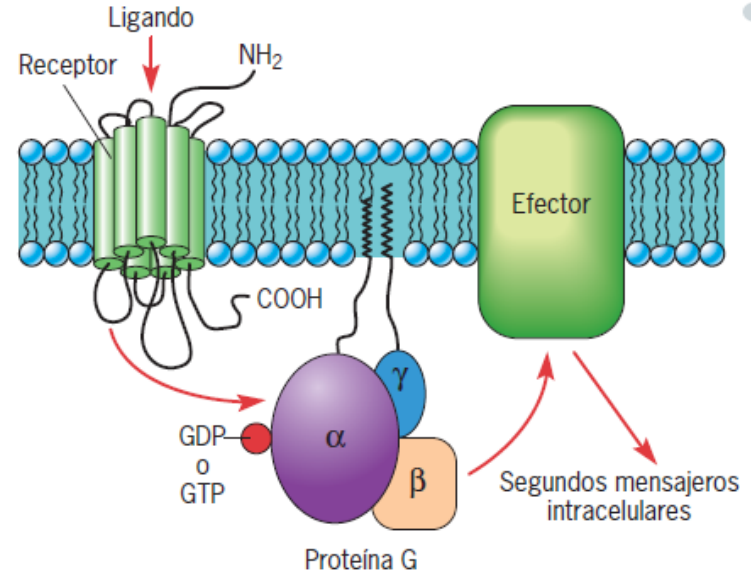
- Crecimiento y desarrollo
- Respuesta a estrés → Metales fitotóxicos (Al)
- Señalización hormonal → Ácido abscísico

Humanos

$\alpha \rightarrow 23$
 $\beta \rightarrow 5$
 $\gamma \rightarrow 12$

A. thaliana

$\alpha \rightarrow 1$
 $\beta \rightarrow 1$
 $\gamma \rightarrow 3$
 $\alpha\text{XL} \rightarrow 3$



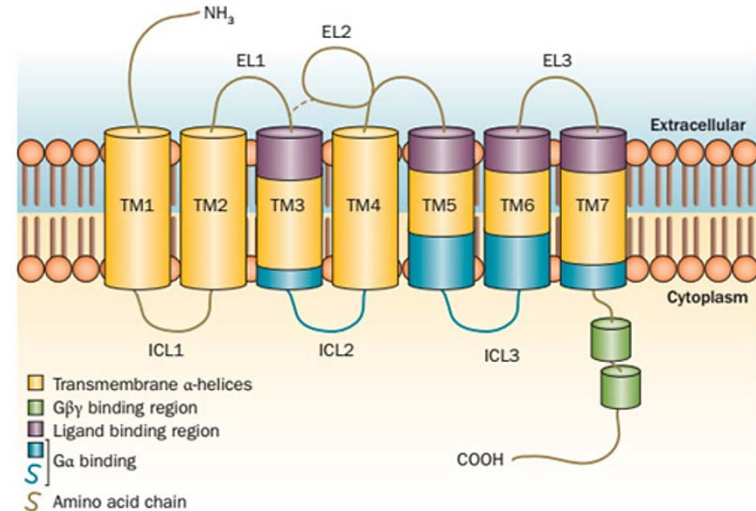
GPCRs

Son la familia más grande de receptores de membrana en animales.

En plantas sólo se ha encontrado un homólogo a los GPCRs humanos en *A. thaliana* llamado **GCR1** descubierto en 1997 y revisitado ocasionalmente.

Las funciones propuestas para GCR1 son:

- Señalización de estrés abiótico
- Señalización hormonal
- Regulación del ciclo celular
- Metabolismo del nitrógeno y el fósforo
- Respuestas a la luz
- Inmunidad contra patógenos

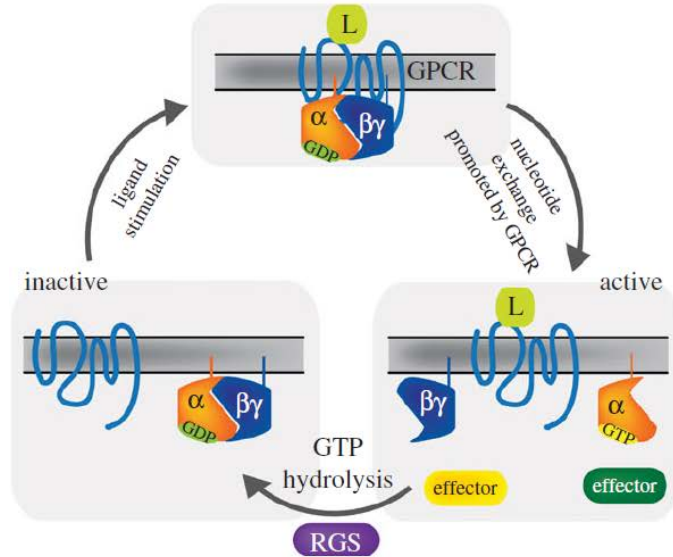


¿GCR1 es o no un GPCR?

GPCRs en plantas

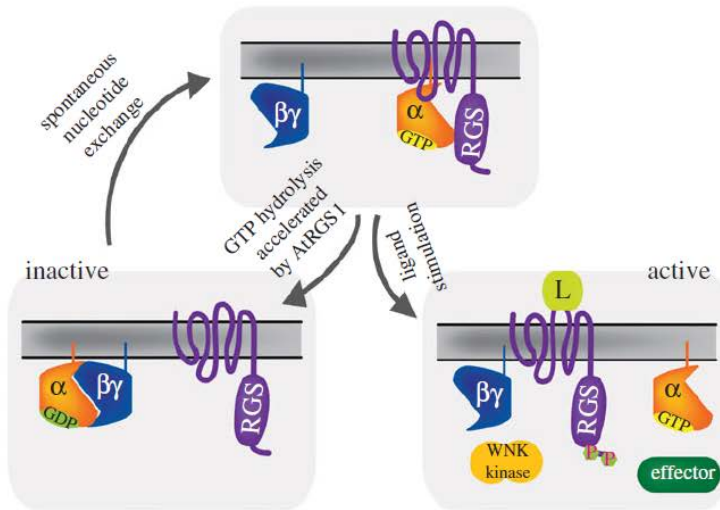
Modelo animal

G protein regulation in animals



Modelo vegetal

proposed G protein regulation in *Arabidopsis*

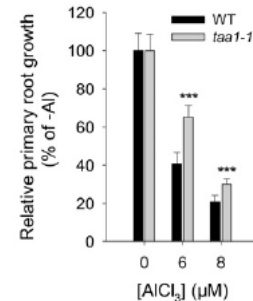
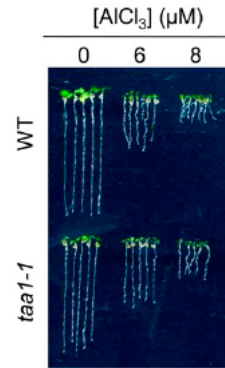


<http://dx.doi.org/10.1098/rsob.120186>

GCR1

GCR1 ha sido evaluado para varios tipos de estrés abiótico pero nunca antes para toxicidad por aluminio

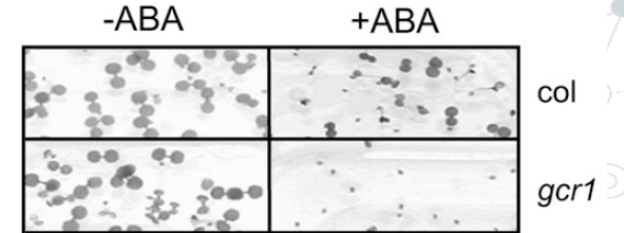
La respuesta al aluminio de *A. thaliana* ha sido bien caracterizada clasificándola como una especie sensible al metal



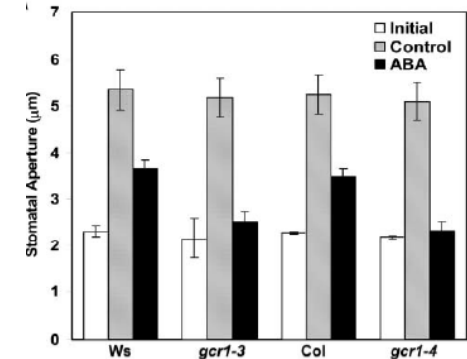
doi/10.1105/tpc.114.127993

El rol de GCR1 en la respuesta hormonal ha sido varias veces estudiado en especial la respuesta al ABA

El ABA tiene roles importantes en la señalización de estrés abiótico, germinación y control estomático



doi/10.1104/pp.106.089904



doi/10.1105/tpc.020321

Incertidumbre

Artículo refutado (2009)

Two Novel GPCR-Type G Proteins Are Absciscic Acid Receptors in *Arabidopsis*

Sona Pandey,^{1,2} David C. Nelson,^{3,4} and Sarah M. Assmann*

¹Biology Department, 208 Mueller Laboratory, Penn State University, University Park, PA 16802, USA

²Donald Danforth Plant Science Center, St. Louis, MO 63132, USA

³Biotechnology Center and Biochemistry Department, University of Wisconsin, 425 Henry Mall, Madison, WI 53706, USA

⁴Present address: Plant Energy Biology, University of Western Australia, 35 Stirling Highway, Crawley 6009 WA, Australia

*Correspondence: sma3@psu.edu

DOI 10.1016/j.cell.2008.12.026



Scientific Correspondence

Reevaluation of Absciscic Acid-Binding Assays Shows That G-Protein-Coupled Receptor2 Does Not Bind Absciscic Acid

Joanna M. Risk, Catherine L. Day, and Richard C. Macknight*

Biochemistry Department, University of Otago, Dunedin 9054, New Zealand

Artículo retractado

G-Protein Complex Mutants Are Hypersensitive to Absciscic Acid Regulation of Germination and Postgermination Development^{1[W]}

2006

Mutante
gcr1-2

Sona Pandey², Jin-Gui Chen^{2,3}, Alan M. Jones, and Sarah M. Assmann*

Department of Biology, Pennsylvania State University, University Park, Pennsylvania 16802-5301 (S.P., S.M.A.); and Departments of Biology and Pharmacology, University of North Carolina, Chapel Hill, North Carolina 27599-3280 (J.-G.C., A.M.J.)

RETRACTION

2019

Vol. 141: 243–256, 2006

Pandey S., Chen J.-G., Jones A.M., and Assmann S.M. G-Protein Complex Mutants Are Hypersensitive to Absciscic Acid Regulation of Germination and Postgermination Development. *Plant Physiol.* 141: 243-256.

The authors of the above article request that it be retracted from *Plant Physiology*. The article includes immunoblot data in Figure 1B that were inappropriately duplicated, spliced, and manipulated.

The authors deeply regret that a manipulated image was used in the article and apologize for any inconvenience this publication may have caused. They have indicated that work is currently underway to repeat the experiments of Figure 1B and that the results will be reported in due course.

Programa OMICAS

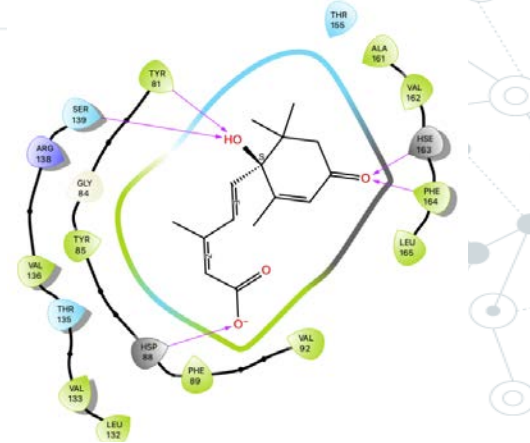
Programa ganador de la segunda convocatoria de Colombia Científica en el foco de alimentos

OMICAS: Optimización Multiescala *In-silico* de Cultivos Agrícolas Sostenibles

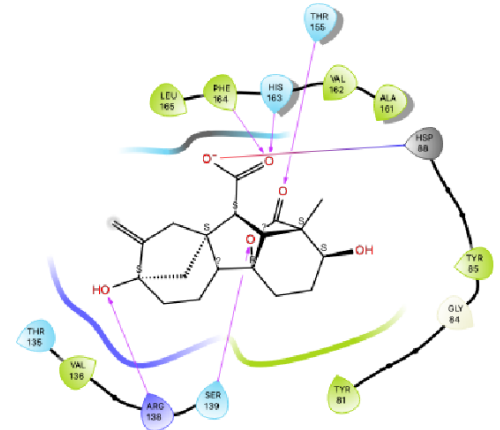
Mediante predicciones *in-silico* y docking molecular se identificaron al ácido abscísico y a las giberelinas como posibles ligandos de GCR1, proponiendo su rol como **receptor de ABA y GAs**

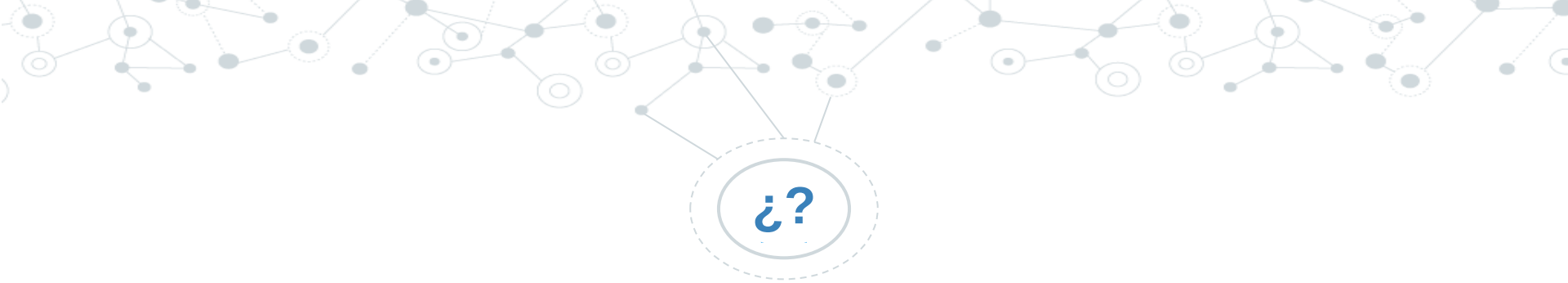
Jaramillo-Botero, Goddard, Kim, Arango, Hernández (Caltech, ICESI, PUJC)

GCR1
+
ABA



GCR1
+
GA1





¿?

¿Cuál es la participación de GCR1 en *Arabidopsis thaliana* en la respuesta a la aplicación exógena de ácido abscísico y al estrés causado por toxicidad por aluminio?

Metodología



Caracterización del mutante *gcr1-2* y su WT Col-0

Verificación de la mutación:

- Homocigocidad (PCR y gel de agarosa)
- Falta de expresión del gen (Real Time q-PCR)

Cultivo en sustrato Forza Mix:

- Altura máxima (cm)
- Diámetro de la roseta (cm)
- Longitud de las silicas
- Longitud radicular (mm) – *in-vitro*



En efecto el mutante contiene un t-DNA insertado en el gen GCR1 el cual disminuye significativamente su expresión.

No se encontraron alteraciones morfológicas en *gcr1-2* comparado con su WT Col-0.

Metodología

Bioensayo 1

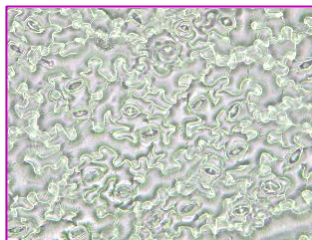
Genotipos: Col-0 y *gcr1-2*

Cultivo *in-vitro* en medios suplementados con ácido abscísico (ABA)

ABA: 2 μ M, 5 μ M y 10 μ M

Parámetros evaluados:

- Germinación durante 9 días
- Enverdecimiento de cotiledones
- Longitud radicular (plantas de 12 días)
- Densidad estomática (plantas de 25 días)



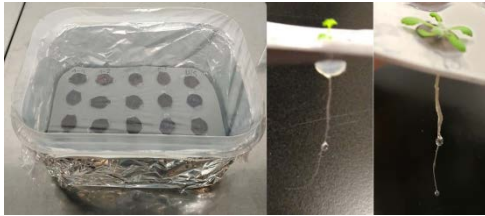
Bioensayo 2

Genotipos: Col-0 y *gcr1-2*

Cultivo *in-vitro* durante 25 días. Spray foliar con ABA 50 μ M y 2 horas después colección de tejido foliar para cuantificación de expresión génica mediante Real Time qPCR

Metodología

Estandarización sistema de cultivo hidropónico para Arabidopsis

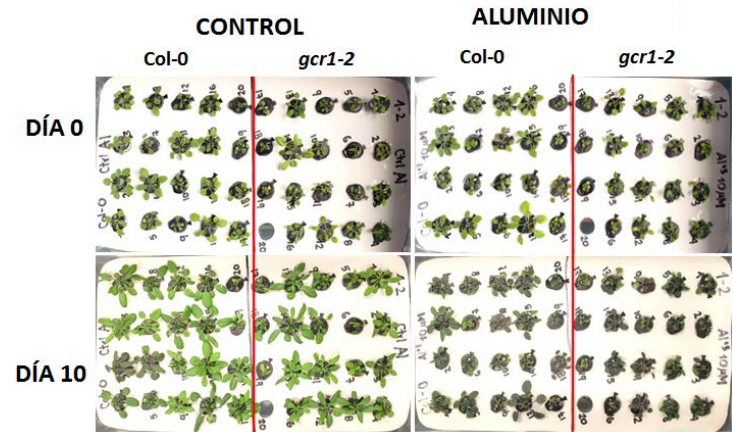


Exposición a concentración fitotóxica de aluminio $2,5\mu\text{M}$ de aluminio libre en solución

Factores: Genotipo (Col-0 y *gcr1-2*) y Tratamiento (Control y Al^{+3} $2,5\mu\text{M}$)

Respuesta: Longitud de la raíz principal

Tiempo tratamiento: 10 días



*En el día 10 de tratamiento se colectó tejido para cuantificar expresión génica

Metodología

Cuantificación de la expresión génica mediante Real Time q-PCR

Tejido proveniente de los experimentos de tolerancia al aluminio ($2,5\mu\text{M}$) y del Bioensayo 2 (ABA)

Genotipos: Col-0 y *gcr1-2*

Genes Target: GCR1, RGS1, GPA1, AGB1, AGG1, AGG2 y AGG3

Genes endógenos (normalizadores): ACT2, TUB4 y EF1 α

Maceración tejido
Nitrógeno líquido

Extracción ARN
Trizol

RT-PCR
cADN

q-PCR
Sybr Green

Análisis de datos
Qbase+



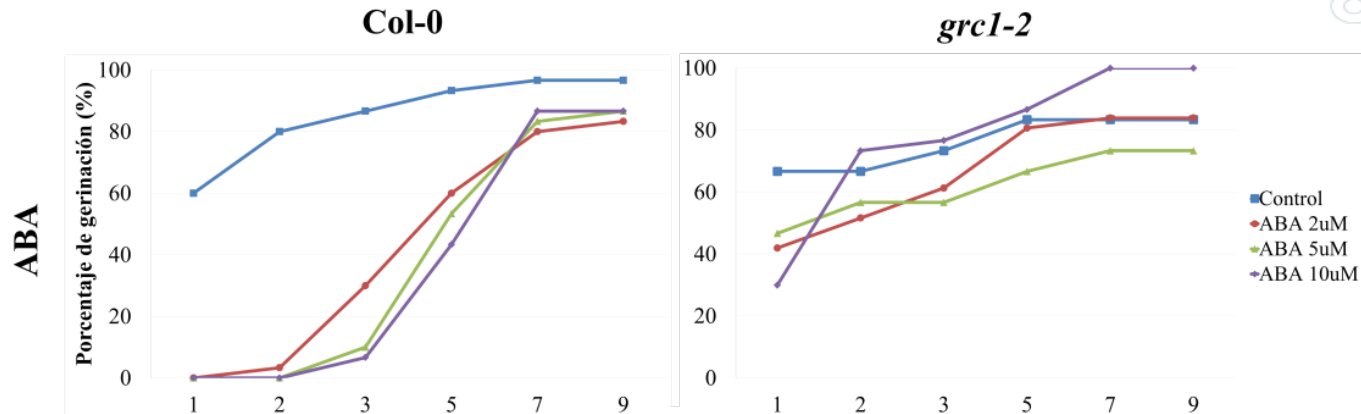
Resultados y discusión

El mutante *gcr1-2* tiene una sensibilidad reducida al ABA

El ABA es un inhibidor de la germinación

El mutante en respuesta al ABA presenta una germinación más rápida

Estos resultados difieren de los reportados en 2004 y 2007 donde reportaron hipersensibilidad de los mutantes al ABA



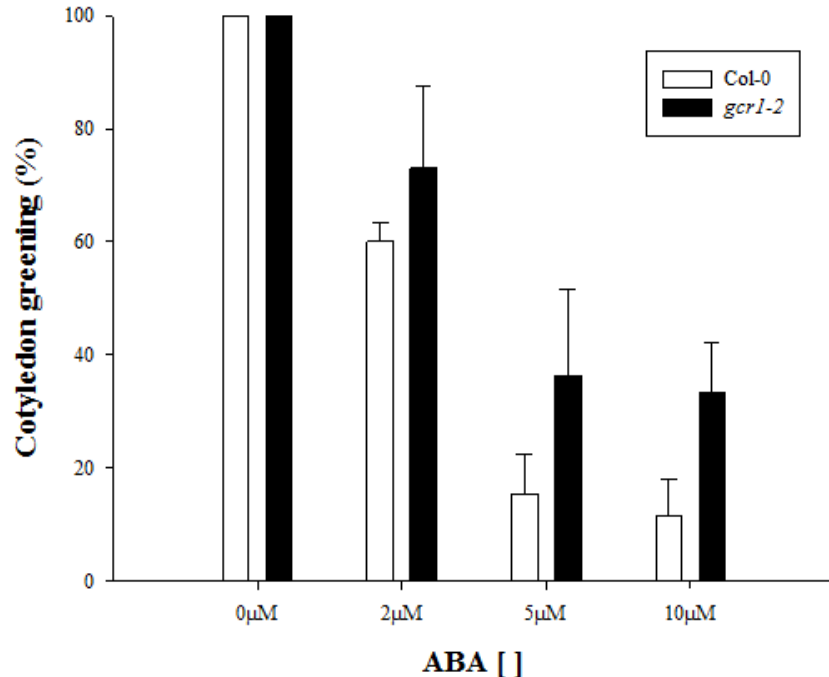
Resultados y discusión

Primera vez que se evalúa este parámetro en
mutantes de pérdida de función de GCR1

ABA inhibe la germinación y
sus etapas posteriores

Para todas las concentraciones el
mutante presenta más plántulas con
cotiledones verdes respecto al WT

**El mutante *gcr1-2* tiene una
sensibilidad reducida al ABA**

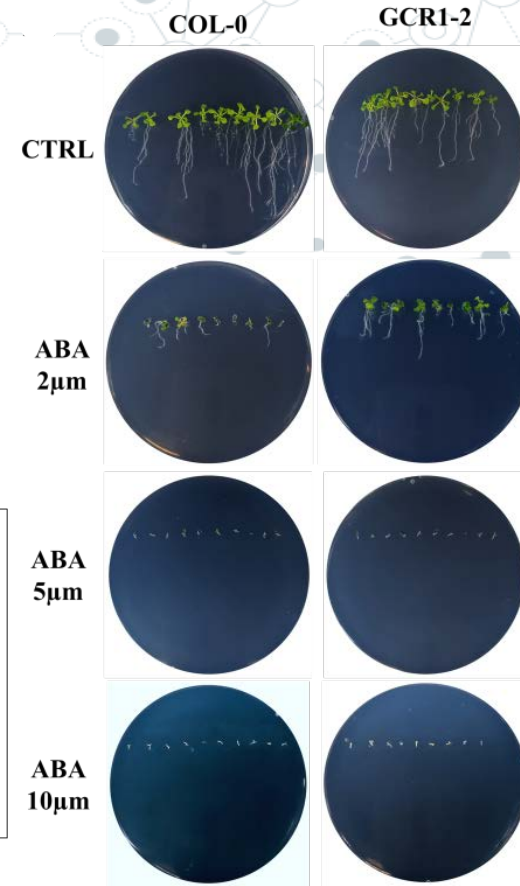
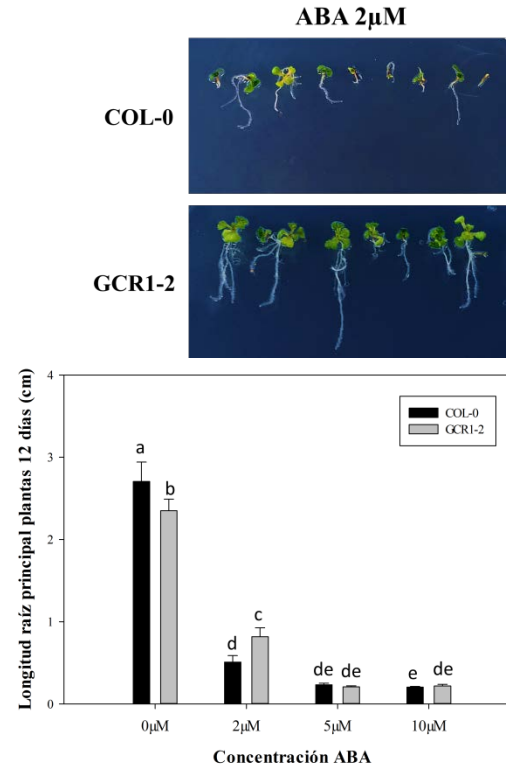


Resultados y discusión

Altas concentraciones de ABA inhiben la formación y crecimiento de la raíz principal

El mutante en la concentración de ABA 2 μ M presenta un crecimiento menos inhibido que el WT y la diferencia es estadísticamente significativa

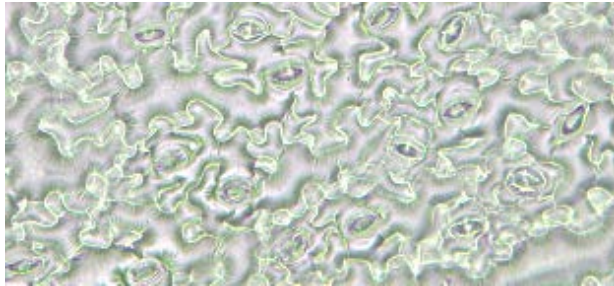
El mutante *gcr1-2* tiene una sensibilidad reducida al ABA



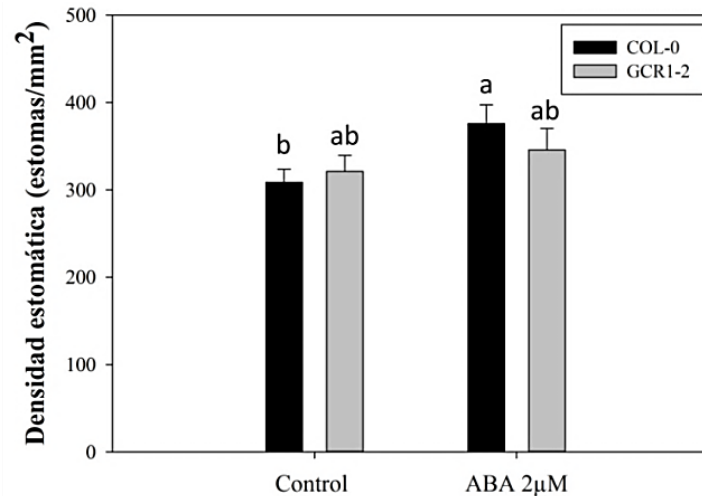
Resultados y discusión

Primera vez que se evalúa este parámetro en mutantes de pérdida de función de GCR1

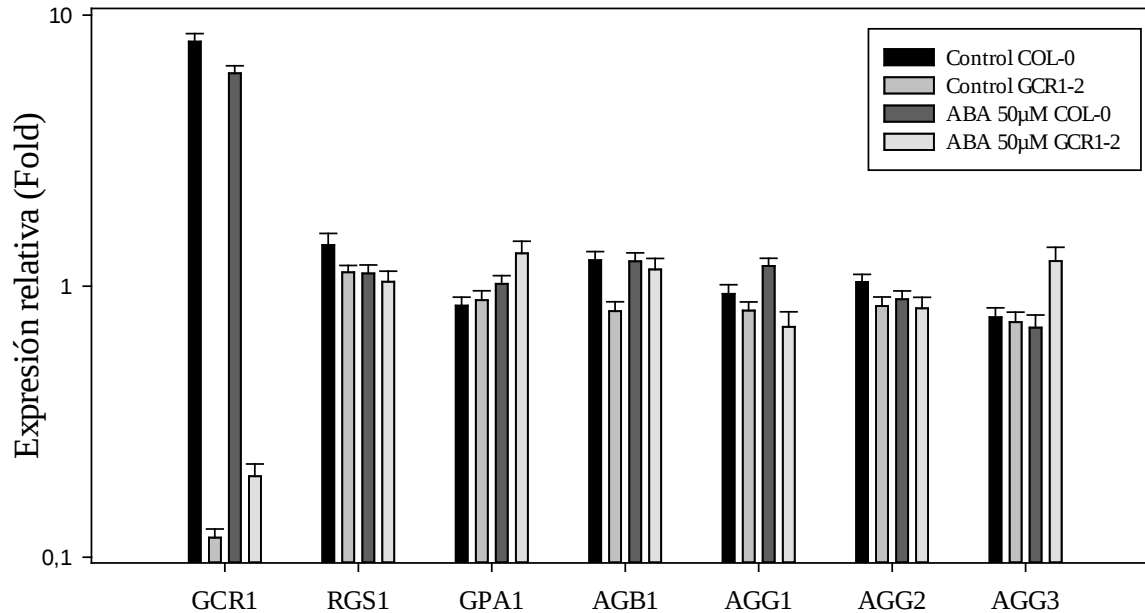
ABA promueve el desarrollo y el cierre estomático



El mutante *gcr1-2* tiene una sensibilidad reducida al ABA

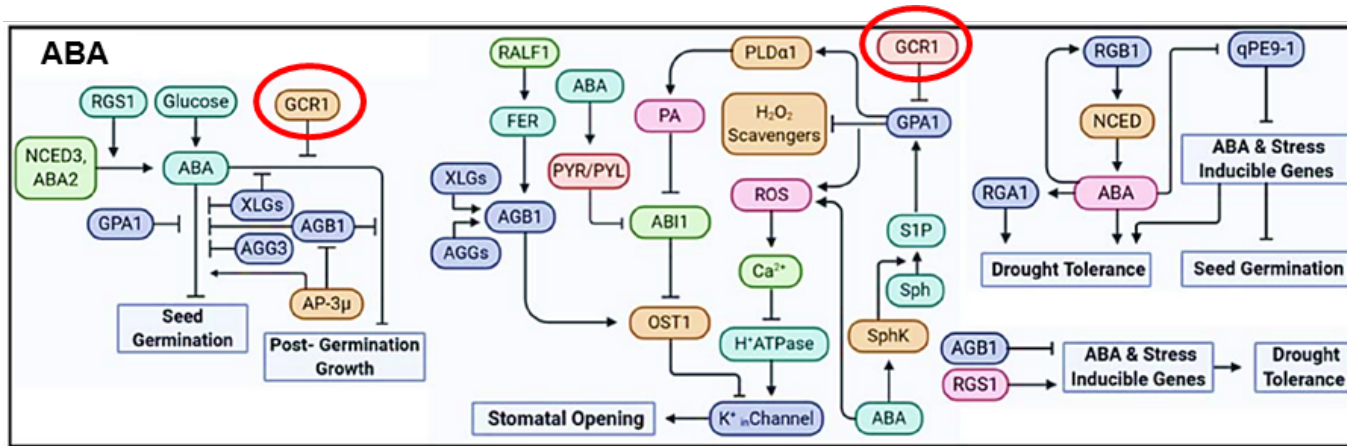


Resultados y discusión



No se encontraron diferencias significativas en la expresión de los genes evaluados involucrados en la señalización por proteínas G

Resultados y discusión



Jose & Choudhury, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2020.109799>

Se aporta evidencia sobre procesos adicionales a los ya reportados en los cuales se encuentra involucrado GCR1 en respuesta al ABA

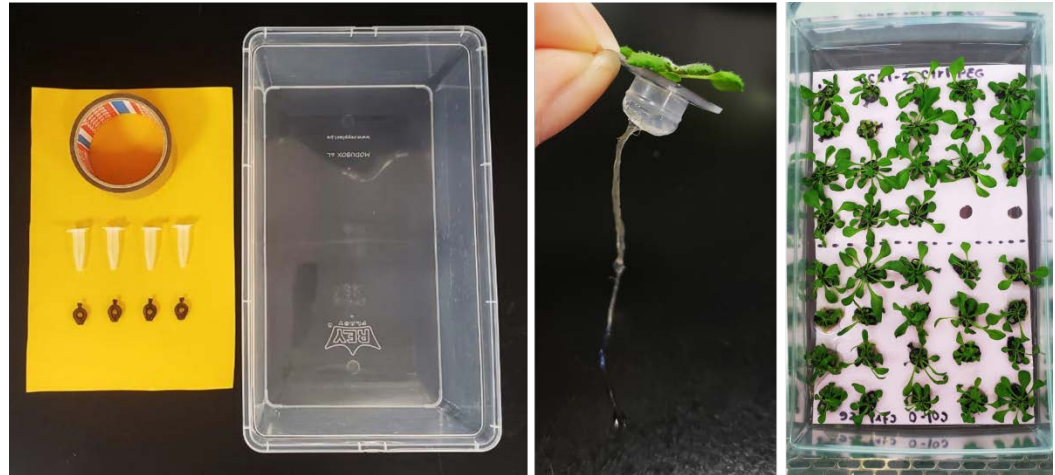
Se propone un potencial rol para GCR1 como receptor de ABA

Resultados y discusión

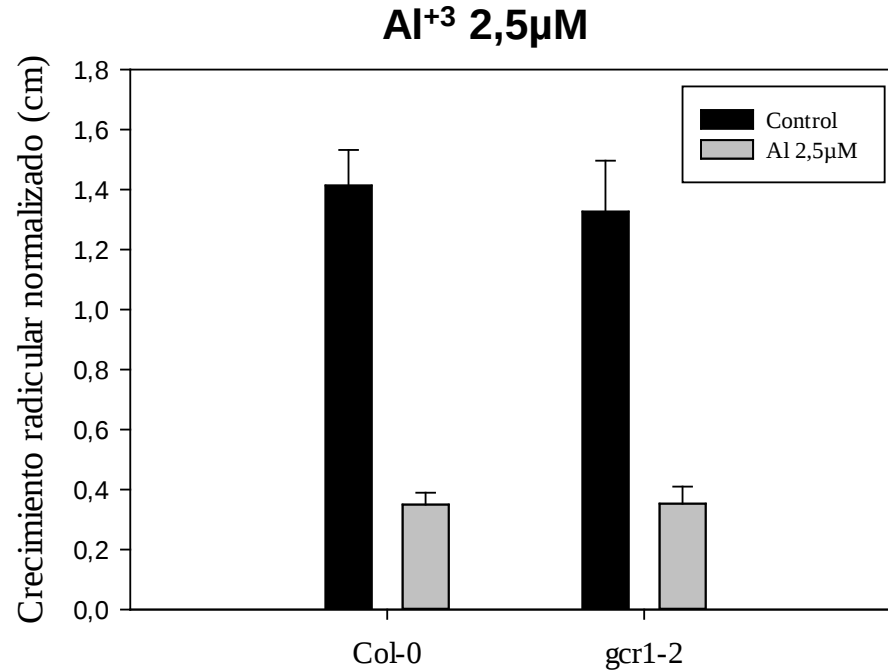
Se estandarizó un sistema de cultivo hidropónico para Arabidopsis

- Materiales de fácil acceso y económicos
- Adaptable a diferentes tamaños de experimentos
- Montaje rápido
- Contaminación al margen con recambio constante de soluciones y materiales

¡Reproducible!



Resultados y discusión

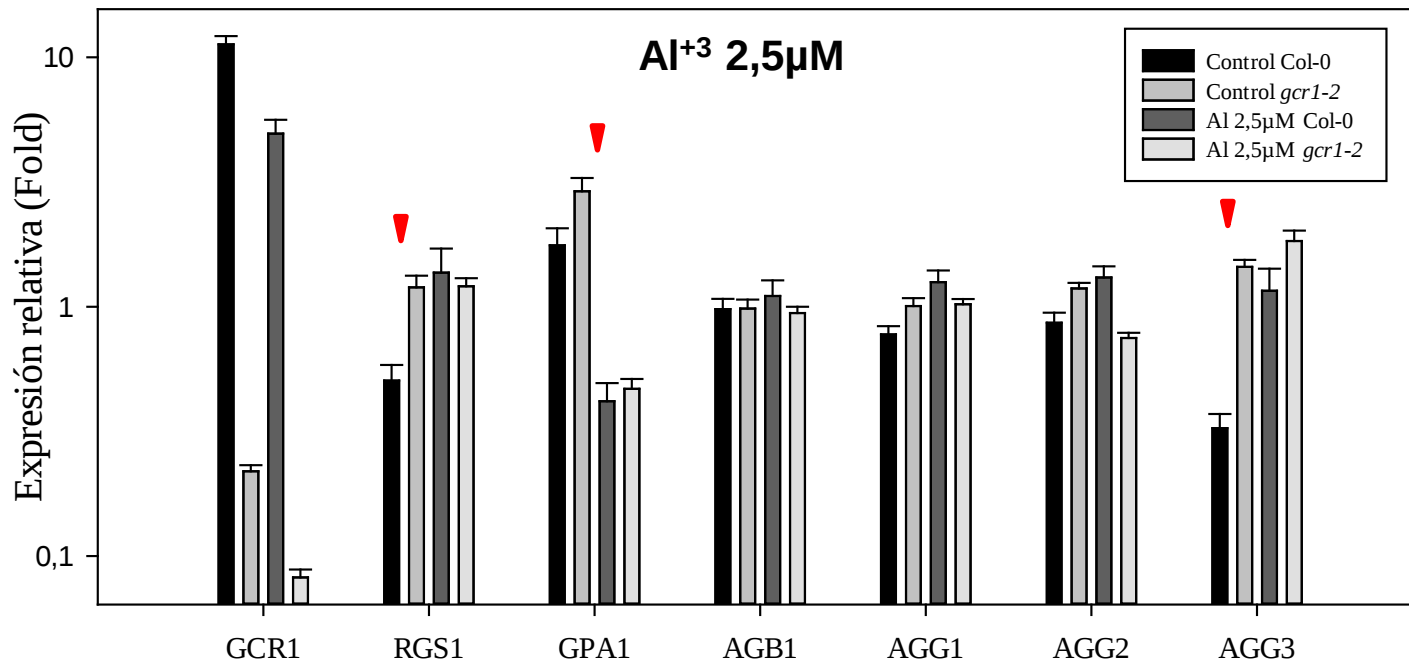


[] más evaluada

El Al³⁺ inhibe fuertemente el crecimiento radicular de ambos genotipos

No hay diferencias significativas entre los genotipos

Resultados y discusión

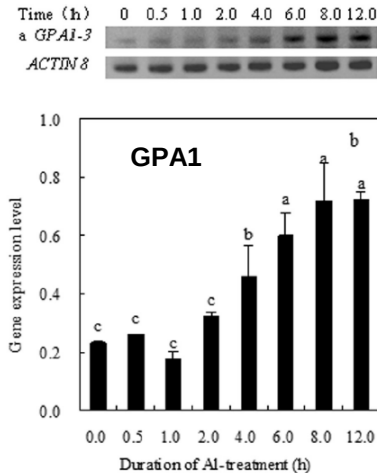


Resultados y discusión

GCR1 no está directamente involucrado en la respuesta al estrés por aluminio

RGS1 exhibe aumento en la expresión del silvestre en respuesta al Al^{+3}

GPA1 y AGG3 presentan cambios en la expresión



DOI 10.1007/s11104-014-2325-0

Journal of
proteome
research

Article
pubs.acs.org/jpr

Quantitative Proteomics Analysis of *Camelina sativa* Seeds Overexpressing the AGG3 Gene to Identify the Proteomic Basis of Increased Yield and Stress Tolerance

Sophie Alvarez,[†] Swarup Roy Choudhury,[†] Kumaran Sivagnanam,[‡] Leslie M. Hicks,[‡] and Sona Pandey^{*,†}

[†]Donald Danforth Plant Science Center, 975 North Warson Road, St. Louis, Missouri 63132, United States

[‡]Department of Chemistry, University of North Carolina, Chapel Hill, North Carolina 27599, United States

Las proteínas G sí están involucradas en la señalización del estrés por aluminio

Conclusiones

Se presentan dos líneas de evidencia que soportan el hecho de que GCR1 tiene roles que son independientes de la señalización por proteínas G.

- El mutante presenta una reducción en la sensibilidad al ABA y según los resultados de expresión génica, no hay variación en la expresión de los genes implicados en la señalización de proteínas G, sugiriendo que la respuesta está dada únicamente por la ausencia de GCR1, implicando que la señalización del ABA es un proceso en el que GCR1 está involucrado y actúa de manera independiente de las proteínas G.
- El mutante *gcr1-2* muestra una respuesta al aluminio similar a la exhibida por el genotipo silvestre, sugiriendo que GCR1 no está involucrado en la señalización de este tipo de estrés. Sin embargo, se observan cambios en la expresión génica de otros actores de la señalización mediada por proteínas G.



¿Qué sigue?

- Validar la ausencia de la proteína GCR1 en el mutante mediante un Western Blot
- Confirmar en otros mutantes de t-DNA para GCR1 los resultados obtenidos en respuesta al ABA
- Evaluar en los mutantes la respuesta a GAs
- Explorar en mayor profundidad los roles de RGS1, GPA1 y AGG3 en la regulación del estrés por toxicidad por aluminio

Agradecimientos



**Equipo laboratorio Fisiología Molecular
de Plantas Universidad Icesi**





Aliados



Apoyan



El futuro
es de todos

Gobierno
de Colombia

