



**INSTITUTO POTOSINO DE INVESTIGACIÓN
CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA, A.C.**

“Caracterización de la interacción de la proteína AtGRDP2 de *Arabidopsis thaliana* con proteínas implicadas en procesos post-transcripcionales”

Tesis que presenta

Saraí Castro Bustos

Para obtener el grado de

Doctora en Ciencias en Biología Molecular

Codirectores de la Tesis:

Dr. Juan Francisco Jiménez Bremont

Dr. Cesaré Moisés Ovando Vázquez

San Luis Potosí, S.L.P., marzo de 2023



Constancia de aprobación de la tesis

La tesis “**Caracterización de la interacción de la proteína AtGRDP2 de *Arabidopsis thaliana* con proteínas implicadas en procesos post-transcripcionales**” presentada para obtener el Grado de Doctora en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **Saraí Castro Bustos** y aprobada el 06 de marzo de 2023 por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Dr. Juan Francisco Jiménez Bremont

Codirector de la tesis

Dr. Cesaré Moisés Ovando Vázquez

Codirector de la tesis

Dra. Fabiola Jaimes Miranda

Miembro del Comité Tutoral

Dra. María de la Luz Guerrero González

Miembro del Comité Tutoral

Dr. Sergio Nemorio Hidalgo Figueroa

Miembro del Comité Tutoral



Créditos Institucionales

Esta tesis fue elaborada en el Laboratorio de Biología Molecular de Hongos y Plantas de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., bajo la dirección del Dr. Juan Francisco Jiménez Bremont.

Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (No. de registro 587106) y del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C.

Se agradece al Proyecto de Ciencia Básica titulado “Caracterización de la proteína de unión a RNA AtGRDP2 de Arabidopsis bajo estrés por frío” (A1-S-25233), por el apoyo otorgado para la realización de esta tesis.

copia del acta de examen.

Dedicatoria

A mis padres Lupita y Rubén por mostrarnos el mundo de la ciencia y por su apoyo incondicional.

A mi hermana Denis por ser un ejemplo de pasión por la ciencia y perseverancia.

A mi compañero de vida Emmanuel por motivarme a seguir adelante incluso en los momentos difíciles.

Les dedico este trabajo con mucho cariño pues todos han contribuido de alguna u otra forma para que yo pudiera concluir este trabajo. Gracias infinitas

Agradecimientos

A mis directores de tesis Dr. Juan Francisco Jiménez Bremont y Dr. Cesaré Moisés Ovando Vázquez por haberme dado la oportunidad de realizar este proyecto y aceptarme en su grupo de investigación. Un sincero agradecimiento por su asesoría y aportaciones invaluable para realizar este proyecto de tesis.

A mis sinodales Dra. Fabiola Jaimes Miranda, Dra. María de la Luz Guerrero González, Dr. Sergio Nemorio Hidalgo Figueroa por sus valiosas sugerencias y comentarios a lo largo de estos cuatro años que culmina en la escritura de este documento.

Al Dr. Israel Maruri López por su tutoría constante e incondicional desde la realización de experimentos, así como la escritura del artículo.

A la Dra. Azucena Ortega Amaro por el apoyo para la realización de este trabajo.

A la M. en C. Alicia Becerra Flora por brindarme su apoyo técnico.

Al Dr. Mario Alberto Serrano Ortega por recibirme en su laboratorio para realizar una estancia y realizar parte de los experimentos de esta tesis.

A mis compañeros del laboratorio por sus sugerencias en los seminarios de grupo

Contenido

Constancia de aprobación de la tesis	ii
Créditos institucionales	iii
Acta de examen	iv
Dedicatoria	v
Agradecimientos	vi
Resumen	viii
Abstract	ix
Introducción	1
Estrés en plantas	1
Proteínas ricas en glicina (GRPs)	3
Clasificación de las GRPs	3
Diversidad funcional de las GRPs de clase IV	7
Proteínas con un dominio rico en glicinas	8
Otras GRDPs en plantas	9
Antecedentes	10
Justificación	14
Objetivo general	15
Objetivos particulares	15
Resultados	16
Capítulo 1	16
AtGRDP2 interactúa con proteínas implicadas en procesos post-transcripcionales	
Capítulo 2	20
Caracterización del motivo RRM de la proteína AtGRDP2	
Discusión general	24
Conclusiones generales	29
Perspectivas	30
Anexos	31
Artículo publicado	31
Mutagénesis dirigida mediante el método "Quick change"	32
Figuras anexas	33
Referencias	35

Resumen

Caracterización de la interacción de la proteína AtGRDP2 de *Arabidopsis thaliana* con proteínas implicadas en procesos post-transcripcionales

El gen *AtGRDP2* se expresa durante el desarrollo de la planta modelo *Arabidopsis thaliana*. Líneas de *Arabidopsis* que sobreexpresan *AtGRDP2* mostraron un crecimiento acelerado y una floración temprana, además de una mayor tolerancia al estrés salino, mientras que la mutante *Atgrdp2* presentó un fenotipo opuesto. El gen *AtGRDP2* codifica una proteína de 787 aminoácidos constituida por un dominio DUF1399 ubicado en el N-terminal, un potencial dominio de unión a ARN (RRM) en la región central, y un dominio rico en glicinas en el C-terminal. A pesar de la importancia de *AtGRDP2*, aún no se ha esclarecido su mecanismo de acción, por lo que en este estudio se realizaron análisis moleculares para aportar conocimiento sobre su localización subcelular y la identificación de algunas proteínas interactoras. Mediante una fusión traduccional *AtGRDP2*-GFP, se observó que esta proteína se localiza tanto en el citosol como en el núcleo de células de tabaco. Además, se determinó que diversas versiones truncas de la proteína *AtGRDP2*, como la que contiene el N-terminal (que incluye el dominio DUF1399), y la versión que contiene la parte central de la proteína (que incluye el RRM) también se localizaron en el núcleo. Utilizando un ensayo de dos híbridos (“split-ubiquitin”) en levadura, se identificaron a los socios proteicos de la proteína *AtGRDP2* y posteriormente, mediante el ensayo de complementación bimolecular de la fluorescencia (BiFC) se demostró que *AtGRDP2* interactúa con proteínas asociadas a funciones de procesamiento de ARN como: PABN3, EF-1 α y CL15. Por último, se analizó cuales regiones de la proteína *AtGRDP2* son claves para la interacción con sus proteínas interactoras. Estos datos sugieren que *AtGRDP2* podría participar en múltiples complejos proteicos con proteínas involucradas en el procesamiento y la traducción del ARN, como es el caso de PABN3 en el núcleo, en el citosol con EF-1 α y en el cloroplasto con CL15.

Palabras clave: Dos híbridos, BiFC, localización celular, socios proteicos, dominios de interacción

Abstract

Characterization of the interaction of the *Arabidopsis thaliana* AtGRDP2 protein with proteins involved in post-transcriptional processes

The *AtGRDP2* gene is expressed during the development of the model plant *Arabidopsis thaliana*. The overexpression of *AtGRDP2* in plants accelerated their growth, they flowered earlier, and had a higher tolerance to abiotic stress, while *Atgrdp2* mutant had an opposite phenotype. The *AtGRDP2* gene encodes a 787 amino acid protein consisting of an N-terminal DUF1399 domain, a potential RNA-binding domain (RRM) in the central region, and a C-terminal glycine-rich domain. Despite the importance of AtGRDP2, its mechanism of action has not yet been elucidated, therefore in this study molecular analyses were performed to provide knowledge about its subcellular localization and the identification of some interacting proteins. Using an AtGRDP2-GFP translational fusion, it was observed that this protein localizes to both the cytosol and the nucleus of tobacco cells. In addition, it was determined that several truncated versions of the AtGRDP2 protein, such as the one containing the N-terminal (which includes the DUF1399 domain), and the version containing the central part of the protein (which includes the RRM) were also localized in the nucleus. Using a yeast two-hybrid ("split-ubiquitin") assay, protein partners of the AtGRDP2 protein were identified. Bimolecular fluorescence complementation (BiFC) assay showed that AtGRDP2 interacts with proteins associated with RNA processing functions such as PABN3, EF-1 α , and CL15. Finally, it was analyzed which regions of the AtGRDP2 protein are key for the interaction with its interacting proteins. These data suggest that AtGRDP2 could participate in multiple protein complexes with proteins involved in RNA processing and translation, as is the case of PABN3 in the nucleus, in the cytosol with EF-1 α , and in the chloroplast with CL15.

Keywords: Two-hybrid, BiFC, cellular localization, protein partners, interaction domains.

Introducción

Estrés en plantas

Las plantas son organismos que se encuentran expuestos a condiciones de factores ambientales que pueden afectar su crecimiento y desarrollo. A estas condiciones adversas se les conoce como estrés, y en plantas se clasifica de acuerdo con su origen en biótico y abiótico. El estrés biótico es causado por patógenos de plantas entre los cuales se encuentran los virus, las bacterias, los hongos y los animales herbívoros que causan diversos daños en la planta. Por otra parte, la sequía, la salinidad, el frío, las temperaturas extremas, entre otros, son ejemplos de estrés abiótico que afectan el crecimiento y desarrollo de las plantas, y que pueden causar pérdidas de cultivos de importancia agrícola (Bashir et al., 2021).

A pesar de que las plantas son organismos sésiles, éstas han desarrollado diversos mecanismos de respuesta, entre los cuales se encuentran los de tipo fisiológico, bioquímico y moleculares que les permiten adaptarse, tolerar, y sobrevivir a las diversas condiciones de agobio (revisado en Ahmad and Prasad, 2012). Entre los mecanismos de respuesta fisiológicos se encuentran los ciclos de vida cortos, la limitación de la expansión floral, la modificación de las hojas para dar lugar a espinas, la disminución del tamaño y número de estomas para evitar la transpiración, el desarrollo de raíces largas, la alteración de la permeabilidad de las membranas a los iones y al agua, entre otros (revisado en Bashir et al., 2021).

Como parte de los mecanismos de respuesta molecular en plantas, el estrés es percibido como un estímulo externo mediante sensores que se pueden encontrar en las membranas celulares (Zhang et al., 2022). Una vez que este estímulo es percibido inicia el proceso de señalización celular en el cual participan las fitohormonas que actúan como moléculas señalizadoras y activan diferentes vías de señalización, entre las cuales se encuentran la vía del ácido salicílico (SA), ácido jasmónico (JA) y etileno (revisado en Bashir et al., 2021). Posteriormente, la transducción de señales es mediada por una variedad de moléculas que actúan como segundos mensajeros, entre los cuales se encuentran el ión Ca^{2+} , y las especies reactivas de oxígeno (ROS) (revisado en Rashid et al., 2022). La señal es transmitida a la maquinaria celular para activar a factores de transcripción que a su vez permitirán la expresión de genes para sintetizar moléculas efectoras que se encuentran altamente reguladas (Tuteja and Sopory, 2008; Malhotra and Sowdhamini, 2014). Entre los mecanismos de respuesta se encuentra la síntesis de moléculas que le permiten a la célula un ajuste osmótico y favorecen la protección de las estructuras celulares. Por ejemplo, solutos compatibles (glicina-betaina y prolina), azúcares (trehalosa) (Kaur and Asthir, 2017), proteínas de membrana que regulan el paso del agua (acuaporinas) (Hernández-Sánchez et al., 2019), síntesis de proteínas LEA (“Late Embryogenesis Abundant”), proteínas de choque térmico (“Heat shock”) (revisado en Wang et al., 2003) y proteínas ricas en glicina (GRPs) (Mousavi and Hotta, 2005), entre otros.

Proteínas ricas en glicina (GRPs)

Las GRPs pertenecen a una familia de proteínas que se caracteriza por presentar repeticiones de glicina que constituyen entre el 40 y 70% del contenido total de la proteína. Esta familia se encuentra ampliamente distribuida en diversos organismos como son: las cianobacterias, los hongos, los nemátodos y las plantas (Sachetto-Martins et al., 2000). La familia de las GRPs es diversa y sus miembros participan en diversas funciones, entre las cuales se encuentran: función estructural en la pared celular, en la defensa en las plantas, en la tolerancia al estrés abiótico, en la hidratación del polen, en la transducción de señales, como ligandos extracelulares de proteínas quinasas, entre otros (Sachetto-Martins et al., 2000; Mousavi and Hotta, 2005; Mangeon et al., 2010). Además, se ha relacionado a estas proteínas con la respuesta a diversos tipos de estrés como, por ejemplo: estrés hídrico y estrés por frío, así como en respuesta al ácido abscísico (ABA), ácido salicílico, entre otros (Czolpinska and Rurek, 2018).

Clasificación de las GRPs

Las GRPs canónicas se clasifican en cinco clases de acuerdo con la disposición de los residuos de glicina y la presencia de dominios adicionales en su estructura (Figura 1). Las clases I, II, III, y V presentan firmas características en la región rica en glicina como: GGX, GGXXXGG, GXGX y GGX/GXGX, respectivamente, en donde la X significa cualquier otro aminoácido distinto a glicina (Mangeon et al., 2010). Las GRPs de clase I pueden contener un péptido señal

seguido de una región con un alto contenido de glicina. La mayoría de las GRPs incluidas en esta clase se ha propuesto que tienen una función estructural debido a su localización en la pared celular, como es el caso de PvGRP1.8 de frijol que actúa como un agente aglutinante para la deposición de constituyentes de la pared celular y se ha asociado con el crecimiento del protoxilema (Keller et al., 1988). Otro ejemplo de GRP clase I que también se encuentra en la pared celular, es el caso de la proteína PtGRP1 de *Petunia*, la cual está conformada por 374 residuos de aminoácidos de los cuales el 67% corresponde a glicinas (Condit and Meagher 1987, revisado en Ciuzan et al., 2015). La importancia de la presencia de GRPs en la pared celular se debe a que el alto contenido de glicinas en esta región facilita la flexibilidad de la pared celular, la cual es necesaria para el crecimiento normal (revisado en Ciuzan et al., 2015).

Las GRPs de clase II también contienen un péptido señal y además presentan una región rica en cisteínas en la región C-terminal (Mangeon et al., 2010). La proteína AtGRP3 de *Arabidopsis thaliana* pertenece a esta clase, Park y colaboradores (2001) identificaron mediante un ensayo de dos híbridos en levadura que AtGRP3 interactúa con un receptor quinasa asociado a la pared celular llamado Wak1 y que el dominio rico en cisteínas de AtGRP3 es importante en la interacción con el dominio extracelular de Wak1. También, determinaron mediante co-inmunoprecipitación la formación de un complejo multiproteico conformado por AtGRP3, Wak1 y KAPP (una proteína fosfatasa asociada a cinasa) y que la unión de AtGRP3 con Wak1 es crucial para la integridad del complejo (Park et al., 2001). Además, tanto *Wak1* como *AtGRP3* son inducidos por el tratamiento con ácido

salicílico. En protoplastos tratados con diferentes cantidades de proteína AtGRP3, los autores observaron un aumento de la expresión del propio transcrito *AtGRP3* y de *Wak1*, así como también un aumento en la expresión de *PR1* (de la vía de respuesta a patógenos inducida por ácido salicílico) (Park et al., 2001, revisado en Mangeon et al., 2010).

Estos autores sugieren que AtGRP3 regula la función de *Wak1* a través de la unión al dominio de pared celular de *Wak1*, y que el complejo *Wak1/AtGRP3* se podría formar en la planta en respuesta contra patógenos (Park et al., 2001, revisado en Mangeon et al., 2010).

Las GRPs de clase III tienen un menor contenido de glicina en comparación con las otras clases, se ha descrito que existen miembros de esta clase que tienen un dominio oleosina en la región N-terminal y también pueden presentar un péptido señal (revisado en Mangeon et al., 2010). El dominio oleosina se encuentra presente en las proteínas que llevan este mismo nombre, las cuales se localizan en regiones de las plantas que sufren una desecación extrema y están involucradas en la absorción de agua del polen en el estigma (Shao et al., 2019). Debido a la presencia de este dominio oleosina en las GRPs clase III, se han identificado a este tipo de proteínas en el polen de plantas de *A. thaliana*, entre las más abundantes se encuentra GRP17 (Mayfield and Preuss, 2000, revisado en Mangeon et al., 2010). Mayfield y colaboradores (2000) analizaron el polen de plantas mutantes *Atgrp17* y reportaron un retraso significativo en la hidratación del polen de estas mutantes en comparación con las plantas parentales Col-0. Este retraso en la hidratación del polen fue causado debido a un fallo de la interacción del polen con el estigma y no

fue relacionado con la incapacidad de absorción de agua (Mayfield and Preuss, 2000). Estos datos sugieren la importancia de *GRP17* en el proceso de polinización en las plantas.

En la clase IV, las GRPs se distinguen del resto por presentar un dominio de unión a ARN. Esta clase se divide en cuatro subclases; IVa, IVb, IVc y IVd (Mangeon et al., 2010). La subclase IVa contiene un único motivo de reconocimiento a ARN (RRM), la subclase IVb además del RRM presenta un dominio estructural dedos de zinc (CCHC), la subclase IVc presenta adicionalmente un dominio de choque por frío (CSD) y además un dominio estructural de dedos de zinc (Mangeon et al., 2010). Finalmente, la subclase IVd se caracteriza por presentar más de dos motivos RRM (Mousavi and Hotta, 2005; Mangeon et al., 2010).

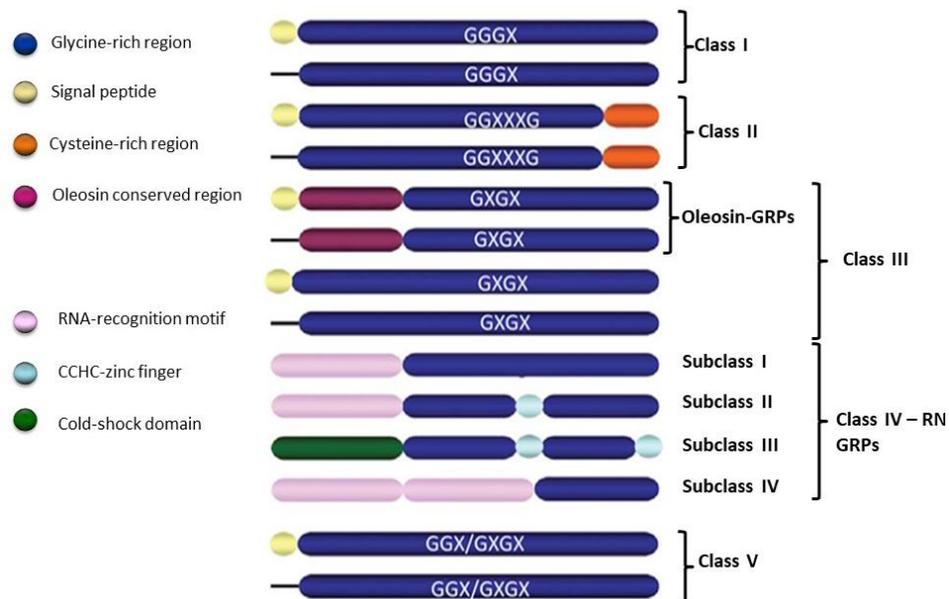


Figura 1. Clasificación de las GRPs canónicas de acuerdo con las firmas de glicinas y dominios adicionales presentes en su estructura. Tomado de Bocca y colaboradores (2005).

Diversidad funcional de las GRPs de clase IV

Como se ha mencionado anteriormente, esta clase de proteínas contienen al menos un motivo de reconocimiento a ARN en su estructura proteica.

Por ejemplo, AtGRP7 y AtGRP8 se encuentran entre las proteínas más estudiadas hasta el momento de esta clase IV, de las cuales se conoce que ambas participan en la respuesta al estrés por frío y floración (Streitner et al., 2008; Kim et al., 2008). Además, ambas intervienen en el corte y empalme de intrones del ARN (Schöning et al., 2008). AtGRP7 tiene actividad de chaperona de ARN y se ha asociado en la respuesta al estrés salino y osmótico mediante el control de la apertura de los estomas (Kim et al., 2008).

Interesantemente, las proteínas AtGRP7 y AtGRP8 se autorregulan negativamente y también entre ellas mismas. Ambas proteínas controlan la abundancia de sus propios ARNm mediante un mecanismo post-transcripcional (Schöning et al., 2008). En este mecanismo, tanto AtGRP7 como AtGRP8 son capaces de unirse a su propio transcrito promoviendo la expresión de una isoforma de dicho transcrito. Por ejemplo, cuando los niveles de AtGRP7 o AtGRP8 son elevados, se produce una versión de empalme alternativo, en la cual se retiene la mitad de su único intrón, en donde se genera un codón de paro prematuro que será degradado por el sistema denominado NMD por sus siglas en inglés "Non-sense Mediated Decay" (Schmal et al., 2013, Schöning et al., 2007, 2008). Los marcos de lectura abiertos que se generan con estas variantes de empalme alternativas contienen un codón de terminación en la primera mitad del intrón y codifican polipéptidos de 5 kDa (Schöning et al., 2007). Actualmente, se ha identificado mediante inmunoprecipitación a que otros transcritos se une AtGRP7, para realizar

el mismo proceso de retención de intrón, entre ellos se encuentran *mTERF*, *FYD* y, *APUM23* (Streitner et al., 2012).

En otro estudio realizado por Kim y colaboradores (2008), se reportó que la proteína AtGRP7 se localiza tanto en citosol como en núcleo, lo cual sugiere que AtGRP7 podría tener otras funciones en el metabolismo del ARN. Los autores demostraron que AtGRP7 participa en la exportación de ARNs mensajeros del núcleo hacia el citosol en condiciones de frío (Kim et al., 2008). Además, existe evidencia sobre la movilidad de esta proteína entre célula-célula, lo que podría indicar múltiples funciones (Kim et al., 2008).

Proteínas con un dominio rico en glicinas

En el 2005, Bocca y colaboradores realizaron una búsqueda de secuencias ESTs (“Expressed Sequence Tag”) correspondientes a GRPs en una base de datos del genoma de Eucaliptus (*E. grandis*, *E. saligna*, *E. globulus*, *E. urophylla*, *E. camaldulensis*). Estos autores encontraron 17, dos, cuatro y cinco secuencias correspondientes a GRPs de la clase I, II, III, y IV, respectivamente. Adicionalmente, estos autores reportaron secuencias correspondientes a proteínas con dominios adicionales como RRM y dedos de zinc. También, reportaron secuencias de proteínas con patrones mixtos de glicina (Bocca et al., 2005). Además, los autores identificaron un grupo de proteínas que solamente presentan un pequeño dominio rico en glicinas, a estas proteínas se les dio el nombre de GRDPs por sus siglas en inglés “Glycine Rich Domain Protein” (Bocca et al., 2005).

Otras GRDPs en plantas

Como se ha mencionado previamente, la información respecto a las GRDPs aún es escasa. Sin embargo, uno de los últimos reportes sobre este tipo de proteínas, es el caso del gen *OsGRDP1* en arroz (*Oryza sativa*). Tanto la sobreexpresión como el silenciamiento del gen *OsGRDP1* en plantas de arroz causó el desarrollo espontáneo de lesiones en las hojas; estas manchas en las hojas fueron provocadas por la acumulación de ROS (Zhao et al., 2021). Además, los autores reportaron que la disminución de la cantidad de proteína OSGRDP1 en las hojas de plantas sobre-expresoras y silenciadas provocó la activación de la respuesta inmune, mediante la expresión constitutiva de genes relacionados con la defensa de las vías SA y JA (Zhao et al., 2021). Por otra parte, identificaron que *OsGRDP1* interactúa con *OsAP25*, una proteasa aspártica. Las proteasas aspárticas se han reportado que llevan a cabo una función en la degradación de proteínas. Los autores sugieren que la sobreexpresión de *OsGRDP1* activa a las proteasas aspárticas y éstas a su vez degradan a la proteína *OsGRDP1* causando la aparición de lesiones en las hojas. De igual manera, líneas silenciadas con una disminución en la expresión del gen *OsGRDP1* presentan este fenotipo de lesiones. Por lo tanto, los autores sugieren que la expresión de *OsGRDP1* debe de ser finamente regulada, de lo contrario provoca la acumulación de ROS y la muerte celular (Zhao et al., 2021).

Antecedentes

Nuestro grupo de investigación identificó al gen *Phaseolus vulgaris* Glycine Rich Domain Protein (*PvGRDP1*) en el cultivar Pinto Villa de frijol (*P. vulgaris*), un cultivar reportado como tolerante a la sequía (Hernández-Lucero et al., 2014). Este gen se aisló a partir de una biblioteca sustractiva de ADNc inducida en condiciones de estrés salino. *PvGRDP1* aumentó su expresión en las hojas de plantas de frijol de 30 días de edad a los 2 y 5 días de tratamiento salino a una concentración de 200 mM de NaCl (Hernández-Lucero et al., 2014).

Posteriormente, nuestro grupo de investigación realizó una búsqueda de secuencias ortólogas del gen *PvGRDP1* de frijol en el genoma de *Arabidopsis thaliana* y se identificaron al menos dos secuencias ortólogas, *AtGRDP1* y *AtGRDP2*. La estructura de las proteínas *AtGRDP1* y *AtGRDP2* está conformada por un dominio de función desconocida (DUF1399) en la región N-terminal, un potencial dominio de unión a ARN en la región central, y un dominio rico en glicinas hacia la región C-terminal (Figura 2). Las proteínas *AtGRDP1* y *AtGRDP2* presentan un 64% de identidad entre ellas; en donde presentan una mayor conservación en la región N-terminal donde se encuentra el dominio DUF1399. Por el contrario, la región C-terminal que contiene el pequeño dominio rico en glicinas es donde se encuentra la mayor diferencia entre estas proteínas.

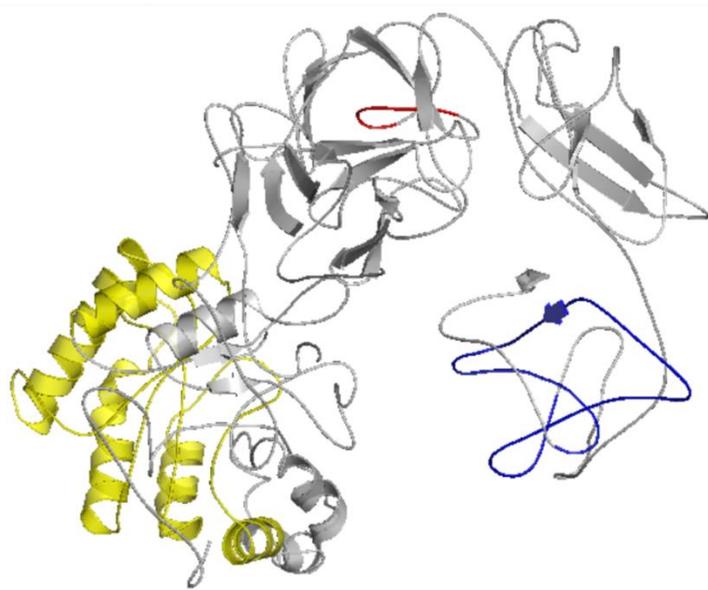


Figura 2. Predicción de estructura terciaria de la proteína AtGRDP2 usando el servidor I-tasser y el visualizador PyMOL. En amarillo el dominio DUF1399, el color rojo representa la región RNP1 que se encuentra en el RRM, y en color azul el dominio rico en glicinas.

El gen *AtGRDP1* aumenta su expresión bajo condiciones de estrés salino (NaCl y LiCl) y osmótico (sorbitol y manitol) en plántulas de *A. thaliana* (Rodríguez-Hernández et al., 2014). Para conocer la función de *AtGRDP1* en la tolerancia al estrés durante la germinación, se analizó el fenotipo de líneas sobre-expresantes de *AtGRDP1* (*35S::AtGRDP1*), y de una línea mutante *Atgrdp1-null* por inserción de ADN-T. Los resultados mostraron que no hubo diferencias en la tasa de germinación entre las líneas transgénicas y la parental cuando crecieron en condiciones sin estrés. Sin embargo, en condiciones de estrés salino y osmótico se observó una

disminución de la germinación en la línea *Atgrdp1-null* mientras que las líneas *35S::AtGRDP1* mostraron un mayor porcentaje de germinación en comparación con la línea parental Col-0 (Rodríguez-Hernández et al., 2014).

Además, el grupo analizó el efecto del ácido abscísico (ABA) exógeno en la inhibición de la germinación en todas las líneas, e interesantemente se observó que la sobreexpresión del gen *AtGRDP1* causó un fenotipo insensible a ABA, es decir que las semillas lograron germinar en presencia de altas concentraciones de ABA; por el contrario, la línea *Atgrdp1-null* presentó hipersensibilidad al ABA; estos resultados sugieren que *AtGRDP1* puede participar en la señalización de ABA (Rodríguez-Hernández et al., 2014). Con la finalidad de conocer la participación de *AtGRDP1* en la respuesta a ABA se analizó la expresión de los factores de transcripción insensibles a ABA (ABI), los cuales son reguladores positivos de la señalización mediada por ABA en la germinación, crecimiento y en la respuesta a estrés. El aumento de la expresión de los genes *ABI3* y *ABI5* en la línea mutante *Atgrdp1-null* correlaciona con el fenotipo hipersensible a ABA, mientras que estos factores de transcripción mostraron una disminución de su expresión en la línea sobre-expresora *35S::AtGRDP1*, en comparación a la parental Col-0 (Rodríguez-Hernández et al., 2014). Además, la sobreexpresión del gen *AtGRDP1* también generó fenotipos con alteraciones en el tamaño de las silicuas, el número de semillas por silicuas, así como el tamaño y peso de la semilla. Estos fenotipos sugieren un papel del gen *AtGRDP1* en el desarrollo de las silicuas y semillas de *Arabidopsis* (Rodríguez-Hernández et al., 2017).

Respecto al gen *AtGRDP2* de *A. thaliana*, este presenta una mayor expresión en las hojas de roseta, hojas caulinas y tejidos florales (brotes, flores, silicuas inmaduras) (Ortega-Amaro et al., 2015). Con la finalidad de conocer la función de *AtGRDP2* durante el crecimiento y desarrollo de *A. thaliana*, se analizó el fenotipo de plantas sobre-expresantes (*35S::AtGRDP2*) y se observó un crecimiento acelerado así como una floración temprana. Por el contrario, para las plantas mutantes “knock out” y “knock down” se observó un retraso en el crecimiento y en su desarrollo (Ortega-Amaro et al., 2015). Además, la acumulación de ácido indolacético (IAA) en las plantas *35S::AtGRDP2* sugiere que este gen se encuentra regulado por auxinas. Además, en ese mismo estudio se reportó que la sobreexpresión de *AtGRDP2* en *A. thaliana* y lechuga generó líneas más tolerantes a estrés salino, y además estas se recuperaron mejor que las plántulas parentales después de un tratamiento con 150 mM de NaCl (Ortega-Amaro et al., 2015).

Con base en los antecedentes, se evaluó en otro estudio el efecto de la sobreexpresión de *AtGRDP2* en raíces compuestas “hairy roots” de plantas de frijol obtenidas mediante la infección con *Agrobacterium rhizogenes*. La sobreexpresión de *AtGRDP2* en las raíces peludas transgénicas mostró un crecimiento acelerado de las raíces, un aumento en la biomasa radicular, y tolerancia a estrés salino de la planta (Ortega-Amaro et al., 2016).

Justificación

El grupo de investigación del Dr. Jiménez Bremont ha identificado los genes *AtGRDP1* y *AtGRDP2* de *Arabidopsis thaliana*, las cuales codifican para proteínas con un dominio rico en glicinas. A pesar de que no había reportes en la literatura sobre estos genes, el grupo ha estado enfocado en estudiar y caracterizar estos genes de función desconocida (Hernández-Lucero et al., 2014; Ortega-Amaro et al., 2015, 2016; Rodríguez-Hernández et al., 2017). En particular, han reportado que el gen *AtGRDP2* está involucrado en el desarrollo y en la respuesta al estrés salino de *Arabidopsis* (Ortega-Amaro et al., 2015). Por ejemplo; la sobreexpresión de *AtGRDP2* en *Arabidopsis* acelera la tasa de desarrollo de las plantas, y además le confiere tolerancia al estrés a salino. La proteína codificada por este gen está conformada por tres dominios; en el N-terminal un dominio de función desconocida (DUF1399), en la región central un posible dominio de unión a ARN (RRM), y en el C-terminal un dominio corto rico en glicinas. A pesar de los avances en el conocimiento sobre la función de este gen, aun no se conocía información sobre la proteína *AtGRDP2*. Por lo que en este estudio se analizó la localización subcelular de esta proteína y se identificaron algunos de sus socios proteicos. Además, se elucidaron los dominios claves para la interacción entre *AtGRDP2* y sus socios proteicos. Los datos generados en esta tesis Doctoral contribuirán a generar información que pueda en un futuro ayudar a entender los mecanismos de acción de *AtGRDP2* en la planta modelo *A. thaliana*.

Objetivo general

- Identificar a los socios proteicos de AtGRDP2, y elucidar los dominios de AtGRDP2 implicados en estas interacciones.

Objetivos particulares

- Determinar la localización subcelular de la proteína AtGRDP2 y sus versiones truncas mediante fusiones traduccionales con la GFP en células de tabaco.
- Localizar potenciales señales de localización nuclear (NLS) *in silico* en la secuencia proteica de AtGRDP2.
- Identificar proteínas interactoras de AtGRDP2 mediante el ensayo de dos híbridos en levadura, utilizando una biblioteca de *Arabidopsis thaliana*.
- Analizar *in planta* la interacción de AtGRDP2 con sus interactores proteicos mediante la técnica de complementación bimolecular de la fluorescencia (BiFC).
- Determinar los dominios claves de AtGRDP2 implicados en la interacción con sus proteínas interactoras.

Resultados

Capítulo 1

AtGRDP2 interactúa con proteínas implicadas en procesos post-transcripcionales

En nuestro grupo de trabajo se ha estudiado desde hace tiempo al gen que codifica para una proteína con un pequeño dominio de glicinas llamada AtGRDP2. Ortega-Amaro et al. (2015) describieron un fenotipo de crecimiento acelerado y tolerancia al estrés salino en plantas sobreexpresoras del gen *AtGRDP2*. Por el contrario, las líneas “*knock out*” y “*knock down*” mostraron plantas con un fenotipo opuesto. Adicionalmente, Ortega-Amaro et al. (2015) reportaron que la proteína AtGRDP2 está constituida por tres dominios. En la región N-terminal un dominio de función desconocida (DUF1399), en la región central un posible sitio de reconocimiento a ARN llamado RRM, y en la región C-terminal un pequeño dominio rico en glicinas

Durante el desarrollo de esta tesis Doctoral, nos enfocamos en continuar con la caracterización funcional de la proteína AtGRDP2. Con la finalidad de investigar sobre la posible función de esta proteína se realizó un screening para identificar a las posibles proteínas que interactúan con AtGRDP2. Para esto, se utilizó una librería de ADNc de *Arabidopsis* y el marco de lectura abierta (ORF) completo de AtGRDP2 como “bait” mediante el sistema “split-ubiquitin” de dos híbridos (Y2H) en levadura. A partir de estos resultados, se identificaron siete proteínas interactoras, de las cuales tres de ellas estaban relacionadas con funciones de procesamiento

de ARN como fue el caso de la proteína de unión a poli-A (PABN3, At5G65260), un factor de elongación de la traducción (EF-1 α , At1G07920), y finalmente, una proteína ribosomal de cloroplasto (CL15, At3G25920).

Con la finalidad de elucidar el papel que juegan las regiones de la proteína AtGRDP2 tanto en su localización subcelular como en la interacción con sus “socios proteicos”, se generaron versiones truncas de nuestra proteína de interés que incluían diferentes dominios de la proteína AtGRDP2. Una de estas versiones truncas consistió en únicamente la región N-terminal (versión DUF1399) de la proteína AtGRDP2. Además, se generaron tres versiones que incluyeron la región central con el dominio de unión a ARN (RRM); entre ellas una versión que incluía tanto el dominio DUF1399 como la región central con el RRM (versión DUF1399-RRM), la otra versión incluyó solamente la región central con el RRM (versión RRM) y finalmente, una versión trunca que incluía tanto la región central como la región de glicinas del C-terminal (versión RRM-Gly).

Posteriormente, se realizó la sub-clonación de las cuatro versiones truncas que se mencionan anteriormente en los vectores pMDC43 (GFP) y pYFC43 (BiFC). Estas fusiones traduccionales se utilizaron para analizar la localización subcelular de AtGRDP2, y para el ensayo de complementación bimolecular de la fluorescencia (BiFC) en células de hojas de *Nicotiana benthamiana*.

Se encontró que la proteína AtGRDP2 tiene una localización dual en el citosol y en el núcleo en las células de hojas de *N. benthamiana*. Además, con el uso de las versiones truncas se determinó que la presencia de al menos la región que contiene el dominio DUF1399 o el RRM son requeridos para la localización nuclear de

AtGRDP2. Posteriormente, se analizó *in silico* la secuencia de aminoácidos de AtGRDP2 y se encontró que existen cinco potenciales señales de localización nuclear (NLSs), de las cuales una se encuentra en la región que contiene el dominio DUF1399, y las otras cuatro NLSs se ubican en la región central que contiene el dominio RRM. Estos datos corroboran que la localización nuclear observada en la versión completa de la proteína AtGRDP2 y en sus versiones truncas podría deberse a que las NLS predichas *in silico* son funcionales.

A continuación, se confirmó la interacción entre AtGRDP2 y las proteínas interactoras obtenidas de un “screening” a partir de un ensayo Y2H en levadura. El ORF de los socios proteicos se clonó en el vector pYFN43, el cual contiene la porción de la región N-terminal de la proteína verde fluorescente (GFP). Por otra parte, tanto el ORF completo del gen *AtGRDP2* como las cuatro versiones truncas de ésta se clonaron en el vector pYFC43, el cual contiene la porción de la región C-terminal de la GFP. Cuando se analizaron las interacciones *in planta* de AtGRDP2 con sus posibles socios proteicos mediante BiFC se encontró que dichas interacciones con PABN3, EF-1 α y CL15 ocurren en el núcleo, en el citosol y en los cloroplastos, respectivamente. Finalmente, con las versiones truncas de AtGRDP2 se pudo determinar que la presencia de al menos la región con el dominio DUF1399 o la región con el RRM son necesarias para la interacción con la proteína PABN3. Por otra parte, se observó la importancia del dominio DUF1399 en la interacción con la proteína EF-1 α y, por último, se logró identificar que la interacción CL15 con AtGRDP2 ocurre en la región central que contiene el dominio RRM de AtGRDP2.

Como resultado de esta tesis Doctoral se publicó un manuscrito titulado **“An interactome analysis reveals that *Arabidopsis thaliana* GRDP2 interacts with proteins involved in post-transcriptional processes”** que se encuentra publicado en el volumen 27 páginas 165-176 de la revista **“Cell Stress and Chaperones”** del año 2022.

Esta publicación resultó en el primer reporte sobre la localización de la proteína AtGRDP2 de la planta modelo *Arabidopsis thaliana*, y la identificación de algunos interactores proteicos, que nos proporcionaron pistas sobre su mecanismo de acción. Además, se discutió sobre la importancia de algunos dominios estructurales que contiene la proteína AtGRDP2 que son relevantes en su localización subcelular, así como durante la interacción con socios proteicos.

Capítulo 2

Caracterización del motivo RRM de la proteína AtGRDP2

En las proteínas de unión a ARN, el motivo de reconocimiento a ARN (RRM) es el más abundante que se encuentra presente; las proteínas de unión a ARN participan en diversos procesamientos del ARN como, por ejemplo; la adición del CAP, el procesamiento de corte y empalme de intrones, la poliadenilación, transporte de ARN, y estructuración del ARN, entre otros. Este motivo RRM está conformado por dos regiones llamadas RNP-1 y RNP-2. El RNP-1 está conformado por ocho aminoácidos conservados con la secuencia K/R-G-F/Y-G/A-F/Y-V/I/L-X-F/Y, mientras que el RNP-2 está constituido por seis residuos con la secuencia I/V/L-F/Y-I/V/L-X-N-L (Lorković and Barta, 2002). Estructuralmente el RRM tiene una conformación de cuatro láminas- β y dos α -hélices, y los motivos RNP-1 y RNP-2 se encuentran en las regiones centrales de las láminas- β 3 y β 1, respectivamente (Maris et al., 2005). El motivo RRM puede estar acompañado de otros tipos de dominios adicionales de unión a ARN, como pueden ser dedos de zinc, dominios tipo “cold shock”, entre otros. (Maris et al., 2005). La presencia de dominios adicionales, como por ejemplo una región rica en glicinas pueden contribuir al plegamiento de la proteína que contiene el RRM, y por lo tanto facilitar el reconocimiento del ARN. Además, le podría permitir a la proteína de unión a ARN interactuar con otras proteínas con diferentes funciones biológicas y de esta forma ejercer una mayor cantidad de funciones biológicas debido a la interacción con otras proteínas (Maris

et al., 2005). El sitio de unión entre el RRM y el ARN es de aproximadamente de ocho a diez nucleótidos (Maris et al., 2005). En el caso de proteínas que contienen más de un RRM, la afinidad de estas proteínas hacia el ARN es mayor debido a que le permite a la proteína reconocer secuencias más largas de ARN.

En la proteína AtGRDP2 se ha localizado un potencial RRM en la región central. Ortega-Amaro y colaboradores (2015) realizaron un alineamiento múltiple de secuencias aminoacídicas correspondientes a proteínas ortólogas de AtGRDP2 en diversas plantas, en donde se identificaron ocho aminoácidos que conforman al posible RNP-1. La secuencia KGSCFLPM se encontró también conservada en especies de plantas como *Thellungiella hallophila*, *Brassica rapa*, *Capsella rubella* y *Arabidopsis lyrata*. En el caso del RNP-2, no se ha identificado la firma en la secuencia de la proteína AtGRDP2 de *A. thaliana*. Sin embargo, en el laboratorio previamente se realizó un análisis *in silico* de *docking* molecular y se observó que existe un posible sitio RNP-2 (comunicación personal del Dr. Juan Francisco Jiménez Bremont).

Durante el doctorado se generó una versión mutada del RNP-1, en la cual se generaron cuatro mutaciones puntuales mediante el método de “Quick Change” descrito en el anexo 1. Se sustituyeron cuatro aminoácidos del RNP-1 (KGSCFLPM) por alaninas (AGSAAAPM) (Figura 3).

RNP1-----KGSCFLPM
 Q.Change -----AGSAAAPM

Figura 3. Esquema de secuencia de la región RNP-1 identificada en la proteína AtGRDP2. En color rojo se muestran las mutaciones puntuales que se realizaron mediante el método de “Quick Change”.

Además, con la finalidad de caracterizar la región RRM de AtGRDP2, se generó una construcción la cual carece de toda la región central de la proteína y solamente incluye las regiones N y C-terminal que contienen el dominio DUF1399 y glicinas, respectivamente (Figura 4).

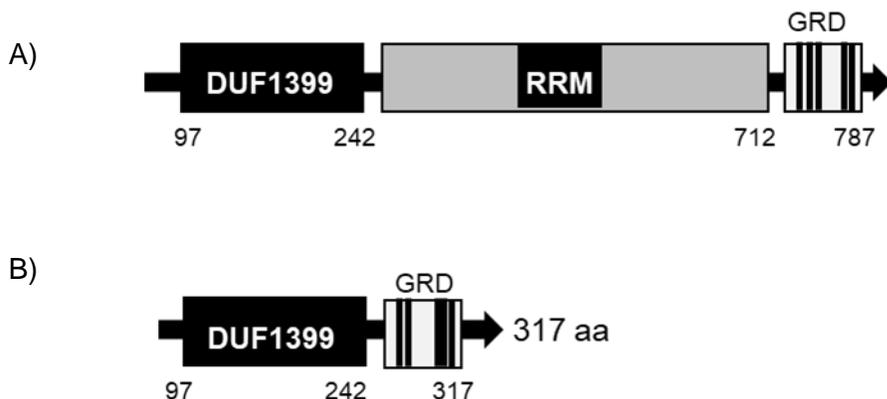


Figura 4. Esquema de los dominios estructurales de la (A) proteína AtGRDP2 y (B) la versión sin la región central que contiene el RRM.

A continuación, tanto la versión mutada (RNP1QCH) como la versión sin la región central de la proteína que incluye en RRM (AtGRDP2 Δ RRM) fueron clonadas en el

vector pCR8/TOPO y posteriormente sub-clonada en el vector pMDC32 para su sobreexpresión en *A. thaliana*. Hasta la fecha se ha logrado transformar plantas de *Arabidopsis* mediante el método de “floral dip” para obtener líneas independientes y actualmente, en el laboratorio se trabaja en la selección de semillas transformantes.

Debido a que se ha demostrado que la región central que contiene el RRM de AtGRDP2 juega un papel muy importante en la interacción con proteínas como la ribosomal de cloroplasto CL15, y el factor de inicio de la traducción como EF-1 α . Nosotros esperamos que estas líneas mutantes del RNP-1 o trunca del RRM presenten un fenotipo de crecimiento similar a la parental Col-0, o cuando se transformen en fondo mutante del gen *AtGRDP2*, tengan un fenotipo lento o retardado semejante a dicha mutante, debido a que la proteína AtGRDP2 no sería funcional.

Discusión general

Como se ha mencionado previamente, la información sobre GRDPs aún es escasa. Por lo tanto, en esta tesis se planteó como objetivo principal conocer más respecto a la función de la proteína AtGRDP2. Para ello, nosotros incursionamos en experimentos sobre la localización subcelular de AtGRDP2 y la búsqueda de proteínas que interactúen con esta GRDP de Arabidopsis. En esta tesis se reporta que la proteína AtGRDP2 se localiza tanto en citosol como en el núcleo de células de hojas de *N. benthamiana*. Estos resultados coinciden con la predicción de la base de datos “SUBcellular location database for Arabidopsis proteins” (SUBA4) (Hooper et al., 2017). Debido a que nuestra proteína de interés se encontró en el núcleo, se realizó una búsqueda en el servidor cNLS Mapper para identificar potenciales señales de localización nuclear (NLS). Se identificaron cinco NLSs bipartitas localizadas principalmente en la región central y en la región N-terminal de AtGRDP2. Las NLS son péptidos cortos que actúan como señal para el transporte de proteínas desde el citoplasma hacia el núcleo (Lu et al., 2021). Las NLS pueden ser de dos tipos: monopartitas o bipartitas. La primera de ellas consiste en una serie de residuos básicos seguido de un residuo que causa la ruptura de la hélice (Lange et al., 2007). Mientras que las NLS bipartitas consiste en dos “clusters” de residuos básicos separados entre sí por 9-12 residuos. Sin embargo, esta regla no siempre se cumple. El transporte de proteínas entre el núcleo y el citoplasma se lleva a cabo a través del complejo de poros nucleares (CPN), los cuáles atraviesan a la envoltura nuclear (Lange et al., 2007). Posteriormente, la NLS es reconocida por los transportadores nucleares que interactúan con las nucleoporinas para facilitar que

las proteínas que contienen NLS lleguen al núcleo a través del CPN (Lange et al., 2007).

En este estudio, se demostró experimentalmente que las versiones truncas de la proteína AtGRDP2, que incluyen las NLSs predichas *in silico* en el servidor cNLS Mapper, fueron localizadas en el núcleo. Por lo que podemos concluir que se requiere al menos el dominio DUF1399 o el dominio RRM para la localización nuclear de AtGRDP2. Estos datos sobre la localización subcelular de esta proteína, nos proporciona pistas sobre sus posibles mecanismos de acción de AtGRDP2.

Recientemente se ha reportado que en el arroz (*O. sativa*) el gen *OsGRDP1* codifica para una GRDP de 930 aminoácidos que contiene hacia la región N-terminal un dominio DUF1399 y siete regiones de repeticiones de glicina en el C-terminal (Zhao et al., 2021). Los autores reportaron que esta proteína OsGRDP1 se encuentra localizada en el citosol y en la membrana de células vegetales, a diferencia de AtGRDP2 que la identificamos en citosol y en el núcleo. Cabe mencionar que el porcentaje de identidad entre las proteínas OsGRDP1 y la AtGRDP2 es bajo (43.96%), por lo que posiblemente tengas funciones específicas cada una de ellas.

Actualmente, las técnicas para identificar a los socios proteicos de una proteína de función desconocida y/o actividad son de mucha utilidad ya que nos permiten tener una pista sobre las posibles funciones y mecanismos de la proteína de interés. En el caso de proteínas GRP-RRMs (Grupo IV) (revisado en Jiménez-Bremont et al., 2018), la técnica de dos híbridos en levadura (Y2H) ha sido clave importante para identificar interactores de proteínas de diversos organismos eucarióticos

incluyendo en las plantas. Por lo anterior, en este trabajo se identificaron a algunos de los potenciales socios proteicos de AtGRDP2. Se seleccionaron a tres de ellos PABN3, EF-1 α y CL15 para para validar su interacción con AtGRDP2 mediante la técnica de complementación bimolecular de la fluorescencia (BiFC). Se identificó que la interacción de AtGRDP2 con PABN3, EF-1 α y CL15 se lleva a cabo en diversos compartimientos celulares como son núcleo, citosol y cloroplastos, respectivamente.

Interesantemente, se ha reportado que otras GRP-RRMs participan en múltiples complejos que se sitúan en compartimientos nucleares y citoplasmáticos, posiblemente regulan el procesamiento y funcionamiento del ARN. Un ejemplo de ello es el caso de la proteína AtCSP3 que pertenece a la clase IV de GRP canónicas, la cual contiene un dominio de unión a ARN (de choque por frío) con siete dedos de zinc CCHC que están intercalados por regiones ricas en glicina. Kim y colaboradores (2013) sugieren que AtCSP3 podría participar en mecanismos post-transcripcionales debido a que esta proteína forma heterodímeros con tres proteínas de unión a poli-A nucleares (PABN1-3). Las proteínas PABN1, PABN2 y PABN3 son muy similares a la PAB2 de los mamíferos, que se une con gran afinidad a las colas nascentes de poli-A, controlando su longitud y promoviendo su extensión (Lorković and Barta, 2002). Debido a que PABN3 tiene un 65,89 y 85,65 % de identidad con PABN1 y PABN2, respectivamente y se ha reportado de que estas proteínas tienen la capacidad formar heterodímeros e interactuar con GRP canónicas, así como se ha descrito que PABN2 es capaz de homo-dimerizar en la región C-terminal que comprende 48 aminoácidos desde el sitio 170 al 217 (Lorković

and Barta, 2002; Dokládal et al., 2015), sería interesante investigar en futuros estudios si AtGRDP2 puede interactuar con las otras PABNs (PABN1 y PABN2).

Se utilizaron las versiones truncas de AtGRDP2 con la intención de conocer cuál dominio está involucrado en la interacción con PABN3, EF-1 α y CL15. En el caso de la formación del heterodímero PANB3/AtGRDP2 observamos que todas las versiones truncas que contenían al menos el dominio DUF1399 o dominio RRM fueron capaces de interactuar con PABN3 en el núcleo, lo cual sugiere que existe a lo largo de AtGRDP2 más de un sitio de interacción con PABN3.

Cuando se analizaron estas versiones truncas en la interacción con EF-1 α , encontramos que tanto la versión que incluía la región N-terminal (que contiene el dominio DUF1399) como la versión RRM-Gly fueron capaces de interactuar con la proteína EF-1 α . Por el contrario, en la versión que incluye los dominios DUF1399-RRM se perdió dicha interacción en el citosol, así como en la versión que solo tenía la región central de AtGRDP2 (que contiene el RRM). Para explicar esto, utilizamos el servidor I-tasser para obtener las estructuras terciarias predichas para las versiones truncas y posteriormente utilizamos el visualizador PyMOL. Cuando se analizaron estas estructuras notamos que existe un cambio conformacional de las versiones truncas al eliminar dichas regiones en comparación con la versión completa de la proteína AtGRDP2. Por ejemplo, en el caso de la versión que tiene la región N-terminal (DUF1399) y región central (versión RRM) es posible que esta conformación impida la exposición de los aminoácidos contenidos en el N-terminal de AtGRDP2, bloqueando así la interacción con EF-1 α (Figuras anexas 1 y 2).

Finalmente, para el caso de AtGRDP2/CL15 se observó que la región central de AtGRDP2 (versión RRM) era capaz de interactuar con CL15, y también ocurrió con la versión DUF1399-RRM. En contraste, la versión trunca que contenía la región RRM-Gly no mostró ninguna interacción con CL15 en cloroplastos. Lo anterior, posiblemente como resultado de la conformación adquirida por esta versión trunca (Figuras anexas 3 y 4). Como AtGRDP2 interactúa con proteínas con funciones relacionadas con el procesamiento del ARN, como PABN3, EF-1 α y CL15, esto sugiere que AtGRDP2 puede estar involucrado en procesos post-transcripcionales.

Debido a que se ha reportado que el dominio RRM está conformado por dos regiones llamadas RNP-1 y RNP-2, las cuales son necesarias para la interacción con ARN. Como parte de este trabajo, se caracterizó la región RNP-1 presente en la proteína AtGRDP2 realizando sustituciones de cuatro aminoácidos conservados en esta región (**KGSCFLPM**) por alaninas (**AGSAAAPM**). En otras RBPs que contienen dominios RRM se ha demostrado que mutaciones en estas regiones afectan las constantes de disociación de estas proteínas. Hasta ahora, la evidencia que tenemos sobre la posible función de AtGRDP2 indica que esta proteína podría tener una actividad de transportador de ARN. Por lo tanto, el poder determinar si el RNP1 es funcional, esto nos confirmaría que AtGRDP2 es una RBP, la cual podría estar involucrada en el transporte de ARNs de núcleo al citosol o a organelos.

Conclusiones generales

- La proteína AtGRDP2 tiene una localización dual tanto en citosol como el núcleo en las células vegetales.
- AtGRDP2 es capaz de interactuar con proteínas que participan en el procesamiento del ARN, como son PABN3, EF-1 α y CL15 en el núcleo, citosol y cloroplastos, respectivamente.
- La interacción de AtGRDP2 con proteínas localizadas en varios compartimentos celulares sugiere que su localización depende de la proteína socia con la que está interactuando.
- En la interacción AtGRDP2/PABN3 tanto la región N-terminal (DUF1399) como la región central (RRM) son requeridas para la interacción con PABN3.
- La región N-terminal de AtGRDP2, donde se ubica el dominio DUF1399, es importante en la interacción con el factor de elongación EF-1 α .
- La región central de la proteína AtGRDP2 es necesaria para la interacción con la proteína de cloroplasto CL15.

Perspectivas

- Generar líneas de Arabidopsis que sobre-expresen versiones truncas que contengan uno o dos dominios de la proteína AtGRDP2 en el fondo mutante *Atgrdp2* y en la parental Col-0 para evaluar el fenotipo de las plantas.
- Caracterizar el crecimiento y la respuesta al estrés de las líneas que sobre-expresan las versiones truncas de AtGRDP2.
- Determinar si existe una interacción entre AtGRDP2 y las proteínas nucleares PABN1 y PABN2.
- Determinar la funcionalidad del RNP-1 que conforma el dominio de unión a ARN (RRM) de la proteína AtGRDP2.

Anexos

Artículo publicado

“An interactome analysis reveals that *Arabidopsis thaliana* GRDP2 interacts with proteins involved in post-transcriptional processes” que se encuentra publicado en el volumen 27 páginas 165-176 de la revista “Cell Stress and Chaperones” del año 2022.

Mutagénesis dirigida mediante el método “Quick change”

- Diseño de oligos con las sustituciones deseadas
- Realizar un PCR y usar una rampa de Tm para determinar las condiciones de amplificación

REACCION CON PHUSION FLASH HIGH FIDELITY PCR MASTER MIX

H ₂ O	11 ul
2xBuffer	12.5 ul
Oligo Fwd	0.5 ul
Oligo Rv	0.5 ul
Plasmid 1.10	0.5 ul

95°C-3'
95°C-30''
55,60 y 65°C-30'' 30 CICLOS
72°C-4'
72°C-3'

Realizar una digestión con la enzima DpnI directamente de la reacción de PCR

Buffer 1.5 ul
DpnI 1 ul
Fragmento de PCR 5 ul
H₂O 7.2 ul

37°C – ON

- Inactivación 80°C durante 20 min
- Dializar y transformar 1 ul en cel. Top 10 (electrocompetetes)
- Verificar clonas positivas

Figuras anexas

DUF 1399 → 242 aa

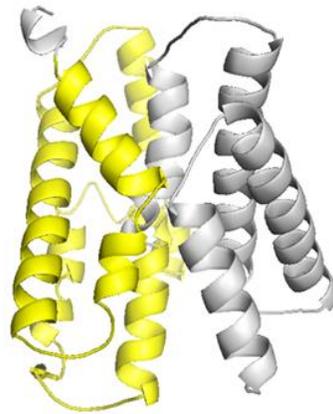


Figura anexa 1. Predicción de la estructura terciaria de la versión trunca de AtGRDP2 que incluye solamente la región N-terminal con el dominio DUF1399 usando el servidor I-tasser y el visualizador PyMOL. En amarillo se muestra el dominio DUF1399.

DUF 1399 RRM → 712 aa

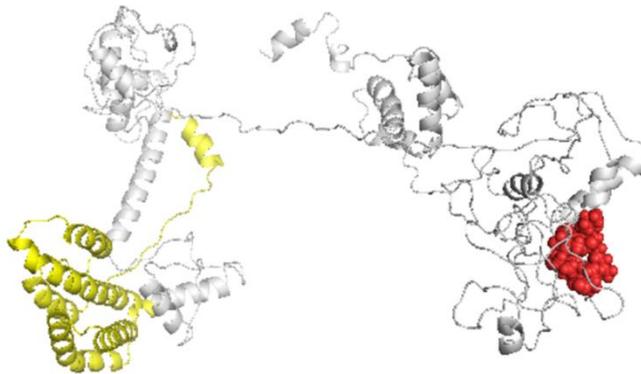


Figura anexa 2. Predicción de la estructura terciaria de la versión trunca de AtGRDP2 que incluye la región N-terminal con el dominio DUF1399 y la región central con el RRM usando el servidor I-tasser y el visualizador PyMOL. En amarillo se muestra el dominio DUF1399 y en esferas de color rojo se representa la región RNP-1 que se encuentra en el RRM.

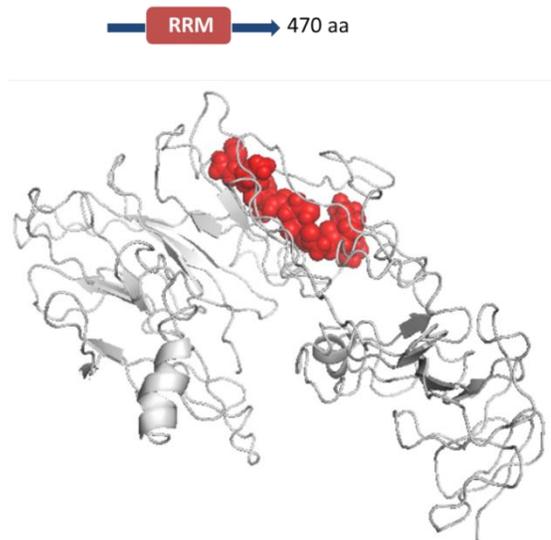


Figura anexa 3. Predicción de la estructura terciaria de la versión trunca de AtGRDP2 que incluye la región central con el RRM usando el servidor I-tasser y el visualizador PyMOL. En esferas de color rojo se representa la región RNP-1 que se encuentra en el RRM.

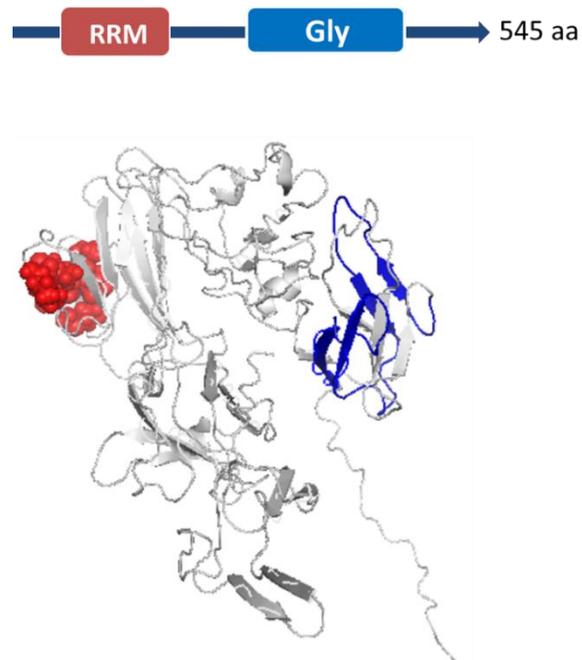


Figura anexa 4. Predicción de la estructura terciaria de la versión trunca de AtGRDP2 que incluye la región central con el RRM y la región C-ter que incluye las glicinas usando el servidor I-tasser y el visualizador PyMOL. En esferas de color rojo se representa la región RNP-1 que se encuentra en el RRM y en color azul el dominio rico en glicinas.

Referencias

- Ahmad, P., & Prasad, M. N. v. (2012). Environmental Adaptations and Stress Tolerance of Plants in the Era of Climate Change. In P. Ahmad & M. N. V. Prasad (Eds.), *Environmental Adaptations and Stress Tolerance of Plants in the Era of Climate Change*. Springer New York. <https://doi.org/10.1007/978-1-4614-0815-4>
- Bashir, S. S., Hussain, A., Hussain, S. J., Wani, O. A., Zahid Nabi, S., Dar, N. A., Baloch, F. S., & Mansoor, S. (2021). Plant drought stress tolerance: understanding its physiological, biochemical and molecular mechanisms. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 35(1), 1912–1925. <https://doi.org/10.1080/13102818.2021.2020161>
- Bobik K, Fernandez JC, Hardin SR, et al (2019) The essential chloroplast ribosomal protein uL15c interacts with the chloroplast RNA helicase ISE2 and affects intercellular trafficking through plasmodesmata. *New Phytologist* 221:850–865. <https://doi.org/10.1111/nph.15427>
- Bocca SN, Magioli C, Mangeon A, et al (2005) Survey of glycine-rich proteins (GRPs) in the Eucalyptus expressed sequence tag database (ForEST). *Genet Mol Biol* 28:608–624. <https://doi.org/10.1590/S1415-47572005000400016>
- Ciuzan O, Hancock J, Pamfil D, et al (2015) The evolutionarily conserved multifunctional glycine-rich RNA-binding proteins play key roles in development and stress adaptation. *Physiol Plant* 153:1–11. <https://doi.org/10.1111/ppl.12286>
- Condit CM, Meagher RB (1987) Expression of a gene encoding a glycine-rich protein in petunia. *Mol Cell Biol* 7:4273–4279. <https://doi.org/10.1128/MCB.7.12.4273>
- Czolpinska M, Rurek M (2018) Plant Glycine-Rich Proteins in Stress Response: An Emerging , Still Prospective Story. *Front Plant Sci* 9:1–13. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00302>
- Dokládál, L., Honys, D., Rana, R., Lee, L. Y., Gelvin, S. B., & Sýkorová, E. (2015). cDNA library screening identifies protein interactors potentially involved in non-telomeric roles of Arabidopsis telomerase. *Frontiers in Plant Science*, 6(NOVEMBER), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00985>
- Hernández-Lucero E, Rodríguez-Hernández AA, Ortega-Amaro MA, Jiménez-Bremont JF (2014) Differential Expression of Genes for Tolerance to Salt Stress in Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Mol Biol Report* 32:318–327. <https://doi.org/10.1007/s11105-013-0642-8>
- Hernández-Sánchez, I. E., Maruri-López, I., Molphe-Balch, E. P., Becerra-Flora, A., Jaimes-Miranda, F., & Jiménez-Bremont, J. F. (2019). Evidence for in vivo interactions between dehydrins and the aquaporin AtPIP2B. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 510(4), 545–550. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2019.01.095>
- Hooper CM, Castleden IR, Tanz SK, et al (2017) SUBA4: the interactive data analysis centre for Arabidopsis subcellular protein locations. *Nucleic Acids Res* 45:D1064–D1074. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw1041>
- Kaur, G., & Asthir, B. (2017). Molecular responses to drought stress in plants. *Biologia Plantarum*, 61(2), 201–209. <https://doi.org/10.1007/s10535-016-0700-9>

- Keller B, Sauer N, Lamb CJ (1988) Glycine-rich cell wall proteins in bean: gene structure and association of the protein with the vascular system. *EMBO J* 7:3625–33
- Kim JS, Jung HJ, Lee HJ, et al (2008) Glycine-rich RNA-binding protein7 affects abiotic stress responses by regulating stomata opening and closing in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* 55:455–466. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2008.03518.x>
- Kim MH, Sonoda Y, Sasaki K, et al (2013) Interactome analysis reveals versatile functions of Arabidopsis COLD SHOCK DOMAIN PROTEIN 3 in RNA processing within the nucleus and cytoplasm. *Cell Stress Chaperones* 18:517–525. <https://doi.org/10.1007/s12192-012-0398-3>
- Lange, A., Mills, R. E., Lange, C. J., Stewart, M., Devine, S. E., & Corbett, A. H. (2007). Classical nuclear localization signals: definition, function, and interaction with importin alpha. *The Journal of Biological Chemistry*, 282(8), 5101–5105. <https://doi.org/10.1074/jbc.R600026200>
- Lorković ZJ, Barta A (2002) Genome analysis: RNA recognition motif (RRM) and K homology (KH) domain RNA-binding proteins from the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nucleic Acids Res* 30:623–635. <https://doi.org/10.1093/nar/30.3.623>
- Lu, J., Wu, T., Zhang, B., Liu, S., Song, W., Qiao, J., & Ruan, H. (2021). Types of nuclear localization signals and mechanisms of protein import into the nucleus. *Cell Communication and Signaling*, 19(1), 60. <https://doi.org/10.1186/s12964-021-00741-y>
- Malhotra, S., & Sowdhamini, R. (2014). Interactions among Plant Transcription Factors Regulating Expression of Stress-responsive Genes. *Bioinformatics and Biology Insights*, 8, BBI.S16313. <https://doi.org/10.4137/BBI.S16313>
- Mangeon A, Junqueira RM, Sachetto-Martins G (2010) Functional diversity of the plant glycine-rich proteins superfamily. *Plant Signal Behav* 5:99–104. <https://doi.org/10.4161/psb.5.2.10336>
- Maris C, Dominguez C, Allain FHT (2005) The RNA recognition motif, a plastic RNA-binding platform to regulate post-transcriptional gene expression. *FEBS Journal* 272:2118–2131
- Mayfield JA, Preuss D (2000) Rapid initiation of Arabidopsis pollination requires the oleosin-domain protein GRP17. *Nat Cell Biol* 2:128
- Mousavi A, Hotta Y (2005) Glycine-rich proteins: a class of novel proteins. *Appl Biochem Biotechnol* 120:169–174. <https://doi.org/10.1385/abab:120:3:169>
- Ortega-Amaro MA, Rodríguez-Hernández AA, Rodríguez-Kessler M, et al (2015) Overexpression of AtGRDP2, a novel glycine-rich domain protein, accelerates plant growth and improves stress tolerance. *Front Plant Sci* 5:782. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00782>
- Ortega-Amaro MA, Rodríguez-Kessler M, Rodríguez-Hernández AA, et al (2016) Overexpression of AtGRDP2 gene in common bean hairy roots generates vigorous plants with enhanced salt tolerance. *Acta Physiol Plant* 38:1–6. <https://doi.org/10.1007/s11738-016-2083-0>
- Park AR, Cho SK, Yun UJ, et al (2001) Interaction of the Arabidopsis Receptor Protein Kinase Wak1 with a Glycine-rich Protein, AtGRP-3. *Journal of Biological Chemistry* 276:26688–26693. <https://doi.org/10.1074/jbc.M101283200>
- Rashid, B., Hassan, S., Batool, F., Akram, F., Arif, U., & Muzaffar, A. (2022). Abiotic Stress: Interplay Between ROS Production and Antioxidant Machinery, Signaling, and ROS Homeostasis. *OBM Genetics*, 06(04), 1–20. <https://doi.org/10.21926/obm.genet.2204171>
- Rodríguez-Hernández AA, Muro-Medina CV, Ramírez-Alonso JI, Jiménez-Bremont JF (2017) Modification of AtGRDP1 gene expression affects silique and seed development in *Arabidopsis*

- Rodríguez-Hernández AA, Ortega-Amaro MA, Delgado-Sánchez P, et al (2014) AtGRDP1 Gene Encoding a Glycine-Rich Domain Protein Is Involved in Germination and Responds to ABA Signalling. *Plant Mol Biol Report* 32:1187–1202. <https://doi.org/10.1007/s11105-014-0714-4>
- Sachetto-Martins G, Franco LO, de Oliveira DE (2000) Plant glycine-rich proteins: a family or just proteins with a common motif? *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression* 1492:1–14. [https://doi.org/10.1016/S0167-4781\(00\)00064-6](https://doi.org/10.1016/S0167-4781(00)00064-6)
- Schmal, C., Reimann, P., & Staiger, D. (2013). A Circadian Clock-Regulated Toggle Switch Explains AtGRP7 and AtGRP8 Oscillations in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Computational Biology*, 9(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1002986>
- Schöning JC, Streitner C, Meyer IM, et al (2008) Reciprocal regulation of glycine-rich RNA-binding proteins via an interlocked feedback loop coupling alternative splicing to nonsense-mediated decay in *Arabidopsis*. *Nucleic Acids Res* 36:6977–6987. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn847>
- Schöning JC, Streitner C, Page DR, et al (2007) Auto-regulation of the circadian slave oscillator component AtGRP7 and regulation of its targets is impaired by a single RNA recognition motif point mutation. *Plant Journal* 52:1119–1130. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2007.03302.x>
- Streitner, C., Köster, T., Simpson, C. G., Shaw, P., Danisman, S., Brown, J. W. S., & Staiger, D. (2012). An hnRNP-like RNA-binding protein affects alternative splicing by in vivo interaction with transcripts in *Arabidopsis thaliana*. *Nucleic Acids Research*, 40(22), 11240–11255. <https://doi.org/10.1093/nar/gks873>
- Streitner, C., Danisman, S., Wehrle, F., Schöning, J. C., Alfano, J. R., & Staiger, D. (2008). The small glycine-rich RNA binding protein AtGRP7 promotes floral transition in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, 56(2), 239–250. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2008.03591.x>
- Shao, Q., Liu, X., Su, T., Ma, C., & Wang, P. (2019). New Insights into the Role of Seed Oil Body Proteins in Metabolism and Plant Development. *Frontiers in Plant Science*, 10, 1568. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01568>
- Tuteja, N., & Sopory, S. K. (2008). Chemical signaling under abiotic stress environment in plants. In *Plant Signaling and Behavior* (Vol. 3, Issue 8, pp. 525–536). <https://doi.org/10.4161/psb.3.8.6186>
- Wang W, Vinocur B, Altman A (2003) Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta* 218:1–14. <https://doi.org/10.1007/s00425-003-1105-5>
- Zhang H, Zhu J, Gong Z, Zhu J-K (2022) Abiotic stress responses in plants. *Nat Rev Genet* 23:104–119. <https://doi.org/10.1038/s41576-021-00413-0>
- Zhao X, Qiu T, Feng H, et al (2021) A novel glycine-rich domain protein, GRDP1, functions as a critical feedback regulator for controlling cell death and disease resistance in rice. *J Exp Bot* 72:608–622.