

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

POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

Caracterización bioinformática y experimental de las proteínas nucleares de unión a poli-A (PABN) de Arabidopsis thaliana.

Tesis que presenta Itzel Guadalupe Lopez Zamora

Para obtener el grado de Maestra en Ciencias en Biología Molecular

> **Director de la Tesis:** Dr. Juan Francisco Jiménez Bremont

> > San Luis Potosí, S.L.P., Abril 2023



Constancia de aprobación de la tesis

La tesis "Caracterización bioinformática y experimental de las proteínas nucleares de unión a poli-A (PABN) de Arabidopsis thaliana" presentada para obtener el Grado de Maestro(a) en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por Itzel Guadalupe Lopez Zamora y aprobada el 21 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 Director de tesis

Dra. Margarita Rodríguez y Domínguez Kessler Miembro del Comité Tutoral

> Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís 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.

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.

Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (980657) y del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C. Acta de examen

Dedicatoria

A mí, por aprender a priorizarme. A Gaby y a mi Alba.

Agradecimientos

Agradezco al Consejo de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la oportunidad y la beca otorgada (No. 980657).

Al Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica (IPICyT) por confiar en mi perseverancia y determinación y abrirme las puertas para realizar mis estudios de posgrado en su institución.

Al Dr. Juan Francisco Jiménez Bremont por aceptar el reto de instruir a una alumna con una formación que difería del ideal. Gracias por permitirme formarme en su equipo de trabajo y por cada charla que fomentó que pensara un poco más como una bióloga molecular.

A la Dra. Margarita Rodríguez y Domínguez Kessler y al Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís cuyos comentario, aportaciones y sugerencias enriquecieron esta investigación y ayudaron a forjar en mí el pensamiento científico.

A la Dra. Aída A. Rodríguez Hernández por apoyarnos para llevar a cabo los ensayos BiFC, que fortalecen esta investigación. Gracias infinitas.

A las Dra. María A. Ortega Amaro, Dra. Saraí Castro Bustos y al Dr. Enrique González Pérez quienes me enseñaron todo lo que debía conocer sobre las técnicas y, con mucha paciencia, me guiaron para hacer las preguntas adecuadas y el cómo responderlas. Gracias, por demostrarme y enseñarme a encontrar soluciones a los retos que nos enfrentamos día a día y por cada comentario en mis avances y escritos.

A mis compañeros de laboratorio: Ale, Bri, Kin, Gene, Sussi, por ofrecerme una mano e ideas del porqué no todo sale a la primera. También por cada momento en el que compartieron sus anécdotas y risas conmigo.

A nuestra técnico M.C Alicia Barrera Flora por siempre atender mis preguntas y mostrarme dónde encontrar respuestas.

A mi compañero de vida y amor, Saúl. A mi maestra en ciencias y bióloga favorita, Fer. Al hombre más veloz del mundo y mi mejor amigo, Carry-Larry-Barry. Gracias por ser mis mejores amigos, y por formar parte de mi familia.

A las que me harán falta toda una vida: Alba y Gabriela.

Principalmente, a Zayda, Juan Carlos, Germán, Albita, Margarita y Santos. Ustedes son mi inicio, mis cimientos y mi final.

Contenido

	Página
Constancia de aprobación de la tesis	ii
Créditos institucionales	iii
Acta de examen	iv
Dedicatorias	v
Agradecimientos	vi
Lista de tablas	viii
Lista de figuras	ix
Abreviaturas	х
Resumen	xi
Abstract	xii

Introducción	1
Métodos	5
Resultados	10
Las proteínas nucleares de unión a poli-A (PABNs) se agrupan	10
filogenéticamente en un clado diferente al de las PABs	
Análisis de la organización genómica de PABNs de Arabidopsis	11
thaliana y sus ortólogos de plantas.	
La proteína PABN2 interactúa con la proteína AtGRDP2	12
Evaluación del fenotipo de líneas de Arabidopsis thaliana	13
sobreexpresantes del gen AtPABN3.	
Las líneas sobreexpresoras de AtPABN3 presentan un fenotipo	14
sensible a estrés salino	
La sobreexpresión de AtPABN3 no genera un fenotipo en	14
respuesta a estrés osmótico	
Las líneas que sobreexpresan AtPABN3 son ligeramente	15
insensibles a la aplicación exógena de la fitohormona ABA	
Discusión	16
Conclusiones	23
Perspectivas	23
Referencias	35

Lista de tablas

Tabla 1. Tamaño de regiones UTR, intrones y exones de	24
genes ortólogos de AtPABNs.	
Tabla 2. Fases de los intrones de AtPABNs y sus ortólogas	25

Lista de figuras

	Página
Fig. 1 . Árbol filogenético de proteínas de unión a poli-A canónicas y nucleares de diversos organismos.	26
Fig. 2. Árbol filogenético de proteínas nucleares de unión a poli-A de Arabidopsis y sus ortólogos en plantas.	27
Fig. 3. Arreglo genómico de <i>AtPABN</i> s y sus ortólogos en plantas	28
Fig. 4. Señal de fluorescencia emitida por la interacción del heterodímero AtGRDP2-AtPABN2 en hojas de <i>N.</i>	30
Fig. 5. Fenotipo de líneas de sobreexpresión de <i>AtPABN3</i> baio condiciones óptimas de crecimiento	31
Fig. 6. Fenotipo de líneas de sobreexpresión de <i>AtPABN3</i> baio condiciones de estrés salino (NaCl 125 mM).	32
Fig. 7. Fenotipo de líneas de sobreexpresión de <i>AtPABN3</i> baio condiciones de estrés osmótico (glucosa 4%).	33
Fig. 8. Fenotipo de líneas de sobreexpresión de <i>AtPABN3</i> bajo condiciones de estrés por ABA.	34

Abreviaturas

ABA ácido abscísico

AtGRDP1 proteína con un dominio rico en glicinas 1 de Arabidopsis thaliana

AtGRDP2 proteína con un dominio rico en glicinas 2 de A. thaliana

AtPABN proteína nuclear de unión a poli-A de A. thaliana

AtPABs proteínas de unión a poli-A citosólicas de A. thaliana

BiFC complementación bimolecular fluorescente, por sus siglas en inglés

mRNA RNA mensajero

ORF marco de lectura abierto, por sus siglas en inglés

PABP proteínas de unión a poli-A

PAB proteínas de unión a poli-A citosólicas

PABN proteínas de unión a poli-A nucleares

PCR reacción en cadena de la polimerasa

RRM motivo de reconocimiento a RNA

saAtGRDP1 versión de splicing de la proteína con un dominio rico en glicinas 1 de *A. thaliana*

Resumen

Caracterización bioinformática y experimental de las proteínas nucleares de unión a poli-A (PABN) de *Arabidopsis thaliana*.

La poliadenilación es un proceso en el cual se agregan repetidos de adenosina al extremo 3' de los mRNA. Estos repetidos forman una cola de poli-A que junto con proteínas de unión a RNA influyen en la estabilidad y localización de RNAs codificantes, en la terminación de la transcripción y el inicio de la traducción. En particular, las proteínas de unión a poli-A nucleares (PABN) y citosólicas (PAB) se unen al transcrito para protegerlo y darle estabilidad. Se ha propuesto que estas PABN pudieran participar en el empalme de RNA; sin embargo, hay poca información respecto a estas proteínas en plantas. En el genoma de Arabidopsis thaliana se han identificado tres genes que codifican para las PABN nucleares: At5G51120 (AtPABN1), At5g10350 (AtPABN2) y At5g65260 (AtPABN3). En este estudio nos enfocamos inicialmente en estudiar la organización genómica de las tres AtPABNs y sus proteínas homólogas. La mayoría de los genes ortólogos de AtPABNs de la familia Brassicaceaea presentan un arreglo de seis exones y cinco intrones, con un intrón de tamaño inusual con una longitud de ~1Kb. Por otra parte, AtPABN1 tiene siete exones y seis intrones. También, evaluamos el fenotipo de líneas de Arabidopsis que sobreexpresión AtPABN3 bajo condiciones de estrés abiótico. Las líneas de sobreexpresión de AtPABN3 mostraron un fenotipo ligeramente insensible a ABA y sensible a estrés salino. Por último, nos enfocamos en elucidar sí AtPABN2 puede interactuar con la proteína AtGRDP2, y observamos que dicha interacción de AtPABN2-AtGRDP2 ocurre en el núcleo. La interacción de AtPABN2 y AtPABN3 con AtGRDP2 en el núcleo, nos sugiere que estas proteínas podrían estar formando un complejo con mRNAs con actividades de poliadenilación y de transporte de mRNAs.

Palabras clave: Organización genómica, interacción proteína-proteína, respuesta al estrés abiótico.

xi

Abstract

Bioinformatic and experimental characterization of the nuclear poly-A binding proteins (PABN) of *Arabidopsis thaliana*.

Polyadenylation is a process in which adenosine repeats are added to the 3' termini of mRNA. These repeats form a poly-A tail that along with poly-A binding proteins influence transcription termination, the stability and surveillance of coding RNA, and the translation initiation process. Particularly, nuclear, and cytosolic poly-A binding proteins (PABN and PAB, respectively) bind to the RNA transcript to provide protection and stability. It has been proposed that PABNs could be involved in RNA splicing, but little information has been produced regarding these proteins in plants. In the Arabidopsis thaliana's genome three PABN coding genes have been identified: At5G51120 (AtPABN1), At5g10350 (AtPABN2) y At5g65260 (AtPABN3). In this research, we studied the genomic organization of AtPABNs and their homologous proteins. Most of the AtPABNs homologous genes in members of the Brassicaceae family have six exons and five introns genomic arrangement, with one unusually large intron of ~1Kb. AtPABN1 has seven exons and six introns. Furthermore, we evaluated the phenotype of *AtPABN3* overexpressing lines under abiotic stress. AtPABN3 overexpressing lines showed a slight insensibility to ABA and sensibility to salt stress. Finally, we focus on elucidating whether AtPABN2 could interact with AtGRDP2, and we observed that the AtGRDP2-AtPABN2 interaction occurs in nucleus. The interaction of AtPABN2 and AtPABN3 with AtGRDP2 in the nucleus suggests that these proteins could be forming a post-transcriptional complex with polyadenylation and mRNA transport activities.

Key words: genomic organization, protein-protein interaction, abiotic stress response.

INTRODUCCIÓN

La poliadenilación es un proceso en el cual se agregan repetidos de adenosina al extremo 3' de los mRNA. Estos repetidos forman una cola de poli-A que influye en la estabilidad y localización de RNAs codificantes, en la terminación de la transcripción y el inicio de la traducción (Deng y Cao, 2017). La maquinaria de poliadenilación incluye a los factores de especificidad de corte y poliadenilación (CPSF), factores de estimulación de corte (CstF), factores de corte (CF), las poli-A polimerasas y proteínas de unión a la cola de poli-A, conocidas como PABs (Deng y Cao, 2017).

Las PABs son proteínas que influyen en la estabilidad y transporte del transcrito del núcleo al citoplasma (Colgan & Manley, 1997). Además, participan en la regulación mediada por miRNAs, la estabilidad de mRNAs específicos, la inhibición de la desadenilación, aumentan la eficiencia del inicio de la traducción, entre otras funciones (Smith et al., 2014). En el genoma de *Arabidopsis thaliana* se han identificado 8 genes que codifican para PABs como: At1G341401, At4G34110, At1G22760, At2G23350, At1G71770, At3G16380, At2G36660 y At1G49760 (Bravo et al., 2005).

Las PABs de Arabidopsis cuentan con cuatro motivos de reconocimiento a RNA (RRM) y un dominio PABC, que es necesario para la formación de homodímeros y heterodímeros con proteínas regulatorias y factores de transcripción (Gallie y Liu, 2014; Kozlov et al., 2010). Las PABs se han localizado en el núcleo y citosol de las células de *A. thaliana*. Este grupo de ocho proteínas se pueden clasificar de acuerdo con sus patrones de expresión. La primera clase, que incluye a PAB3 y PAB5, se expresan constitutivamente en tejidos reproductivos. PAB2, PAB4 y PAB8 forman parte de la clase II que se expresa fuertemente en toda la planta. La clase III, conformada por PAB6 y PAB7, presenta una baja expresión en toda la planta a excepción de las raíces. Por último, PAB1 está clasificada como clase IV y presenta una expresión baja y específica en raíces y flores (Mangus et al., 2003).

Por otro lado, Hunt et al., (2012) identificaron en el genoma de *A. thaliana* a tres proteínas adicionales de unión al poli-A nucleares denominadas AtPABN1, AtPABN2 y AtPABN3, las cuales solo se han localizado en el núcleo, y son codificadas por los genes At5G51120, At5G10350 y At5G65260, respectivamente. AtPABN1 está formada por 227 aminoácidos (aa), AtPABN2 por 217 aa y AtPABN3 por 220 aa. Estas PABNs cuentan con un solo dominio de unión a RNA, precedido por una hélice superenrollada en el extremo amino. Interesantemente las tres PABNs de Arabidopsis se expresan fuertemente en semillas en germinación y presentan una expresión constitutiva en tejidos reproductivos (https://bar.utoronto). Si bien las PABs han sido ampliamente estudiadas mediante ensayos de complementación funcional en levadura, y en evaluación de fenotipos de mutantes individuales, dobles y triples en el crecimiento y desarrollo de la planta, hay poca información respecto a la función de las PABNs (Chekanova et al., 2001; Gallie, 2017; Palanivelu et al., 2000; Smith et al., 2014).

La localización subcelular de PABN3 de *A. thaliana* en las manchas nucleares fue comprobada por ensayos de BiFC empleando la construcción cYFP-AtPABN3. Además, se demostró la asociación de las tres PABNs con la proteína 3 con dominio Cold Shock, AtCSP3, en las manchas nucleares, lo cual sugiere que podrían participar en el empalme de RNA (Kim et al., 2013a). También se ha comprobado la interacción de cada una de ellas (AtPABN1, AtPABN2 y AtPABN3) con el factor que integra la poli-A polimerasa (Fip1), la poli-A polimerasa 4 (PAPS4) y con la proteína 3 con dominio cold-shock (CSP3) (Arabidopsis Interactome Mapping Consortium, 2011; Forbes et al., 2006; Kim et al., 2013). Fip1 y PAPS4 son parte de la maquinaria de poliadenilación. CSP3 es una proteína que cuenta con un solo dominio cold-shock y siete dedos de zinc tipo CCHC intercalados por regiones ricas en glicinas. Se ha propuesto que CSP3 funciona como chaperona de mRNAs y regula la tolerancia a estrés por congelamiento (Kim et al., 2009).

AtPABN2 interacciona en las funciones no-teloméricas de la proteína telomerasa reversa transcriptasa, TERT. Las funciones no-teloméricas de TERT incluyen la reparación de DNA de doble cadena, tolerancia a estrés oxidativo y la regulación de

expresión génica mediante la modulación de la cromatina o mediante la producción de siRNAS empleando la polimerasa dependiente de RNA (Thompson & Wong, 2020). También se ha reportado que AtPABN2 forma homodímeros mediante su extremo C-terminal (Dokládal et al., 2015).

Por su parte, se ha reportado que AtPABN1 interactúa con la proteína de función desconocida ACR6. ACR6 cuenta con un dominio ACT terminal que se presenta en proteínas involucradas en el monitoreo y señalización del metabolismo de aminoácidos (Hsieh & Goodman, 2002).

Recientemente Castro-Bustos, et al. (2021), reportaron que AtPABN3 interactúa con la proteína AtGRDP2. AtGRDP2 es una proteína de función desconocida con un dominio rico en glicinas y presenta un potencial dominio de unión a RNA. También se descubrió que AtGRDP2 además de interaccionar con PABN3, interacciona con las proteínas CL15, y EF-1α. PABN3 se une a las colas de poli-A de mRNAs, CL15 es una proteína del complejo ribosomal de cloroplasto y EF-1α participa en la elongación de la traducción de mRNAs a secuencias peptídicas.

Líneas de Arabidopsis que sobreexpresan el gen *AtGRDP2* muestran un fenotipo de crecimiento acelerado, florescencia temprana y una mayor tolerancia a estrés abiótico, mientras las mutantes son más sensibles y tienen un desarrollo tardío(Ortega-Amaro et al., 2015).

Con el fin de elucidar la función de AtPABN3 y aportar al conocimiento de la familia de las PABNs, en el presente trabajo de tesis nos planteamos generar líneas de sobreexpresión de *AtPABN3* y evaluar su fenotipo bajo condiciones óptimas y de estrés abiótico. Por otro lado, mediante ensayos de complementación bimolecular fluorescente (BiFC, por sus siglas en inglés) en hojas de tabaco, analizamos la interacción de AtPABN2 con la proteína AtGRDP2. Por último, realizamos un análisis bioinformático de la organización genómica de las PABNs de plantas.

Encontramos que la mayoría de los genes ortólogos de los *AtPABN*s conservan un arreglo genómico de seis exones y cinco intrones, con un intrón de una longitud de aproximadamente una kilobase. Las líneas sobreexpresantes de *PABN3* tienen un

marcado fenotipo de sensibilidad a estrés salino durante el crecimiento; mientras bajo estrés por ABA muestran una ligera hiposensibilidad en comparación con la Col-0. Al igual que AtPABN3, AtPABN2 interacciona con AtGRDP2 lo cual sugiere una redundancia en su función que posiblemente incluye un mecanismo de punto de control de egreso de RNAs correctamente procesados mediante su interacción con proteínas de transporte.

MÉTODOS

Árbol filogenético de secuencia peptídica de las proteínas nucleares de unión a poli-A (AtPABNs) y las proteínas de unión a poli-A (AtPABs) de *Arabidopsis thaliana*

Se construyó un árbol filogenético de las secuencias de AtPABs y AtPABNs con el fin de evaluar la relación entre estas proteínas. En total se emplearon 15 secuencias. Las secuencias codificantes de las proteínas fueron obtenidas de la base de datos de NCBI. Para las proteínas de *Arabidopsis thaliana*, los números de acceso son At5G51120, At5G10350, At5G65260, At1G341401, At4G34110, At1G22760, At2G23350, At1G71770, At3G16380, At2G36660 y At1G49760. Para las proteínas de unión a poli-A humanas: XP_005250918, NP_001347480 y para la de levadura: NP_011092. La proteína de la cianobacteria *Anabaena variabilis*: BAA04562 fue empleada como grupo externo debido a que cuenta con un motivo RRM.

Para evaluar la conservación genómica entre los genes ortólogos que codifican para PABNs, se emplearon las secuencias peptídicas de las 3 PABNs de *A. thaliana*, 3 PABNs de *A. halleri* (Araha.28134s0003, Araha.2597s0005, Araha.0539s0006), 3 PABNs *A. lyrata* (AL8G25380, AL6G20840, AL8G42820), 3 PABNs de *Capsella rubella* (Carub.0006s0881, Carub.0008s1116, Carub.0008s2613), 3 PABNs de *C. grandiflora* (Cagra.5476s0005, Cagra.1085s0025, Cagra.0917s0058), 3 PABNs de *Malcolmia marítima* (Mamar.0014s0112, Mamar.0029s1575, Mamar.0076s0016), una de maíz (Zm00008a023046) y dos de durazno (Prupe.2G269600.1, Prupe.6G191400.1). Estas secuencias fueron obtenidas de Phytozome (https://phytozome-next.jgi.doe.gov) y se emplearon para crear un árbol filogenético usando MEGA X (Goodstein et al., 2012). Como grupo externo se empleó la proteína con código Cre06.g274500 del alga *Chlamydomonas reinhardti*.

Además, se realizó el alineamiento de las secuencias usando Clustal W en el programa MEGA. El árbol filogenético fue construido usando el método estadístico Neighbor-Joining y para la prueba de filogenia se empleó un Bootstrap de 1000

réplicas. Finalmente, se empleó Clustal Omega (https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/) para obtener los porcentajes de identificar regiones conservadas entre las secuencias de interés.

Para el análisis de la organización genómica de cada gen PABN, se emplearon las predicciones de Phytozome para identificar los exones e intrones de cada secuencia de cDNA. Posteriormente se cuantificó el número de intrones y tamaño. Además, se analizó la conservación de los intrones mediante alineamientos de secuencias usando Clustal W.

Construcción de vectores

Se amplificaron los ORF de AtPABN2 y AtPABN3 empleando oligonucleótidos específicos para cada gen y cDNA de plantas de Arabidopsis thaliana de 15 días de edad usando una Hot Star HiFidelity Polymerase Kit (Qiagen, Hilden, Germany). Los productos de 654 y 663 pb, respectivamente, fueron clonados en el vector PCR8/GW/TOPO (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Se transformaron células de Escherichia coli TOP10 con las construcciones PCR8:PABN2 y PCR8:PABN3. Posteriormente, se extrajeron los plásmidos con Minipreps. Se verificó la presencia del inserto con el patrón de bandeo por digestión con la enzima de restricción *Eco* RI. Los plásmidos que mostraron el patrón de bandeo fueron secuenciados con el oligonucleótido M13 FWD para identificar las muestras con el inserto en sentido. Mediante una reacción LR se recombinó AtPABN2 a los vectores YFC43 y YFN43 para ensayos de complementación bimolecular fluorescente (Belda-Palazón et al., 2012). AtPABN3 se recombinó a los vectores YFN43 y a PMDC32. Los plásmidos fueron extraídos por el protocolo descrito previamente y fueron secuenciados con el oligo NosT para PMDC32, y los oligos YFN43 y YFC43 para los vectores BiFC. Se transformaron células de Agrobacterium tumefaciens GV3101 con las construcciones YFC43:AtPABN2 y YFN43:AtPABN2. Se seleccionaron las colonias con resistencia a rifampicina y kanamicina. También se emplearon cepas de A. tumefaciens transformadas con los vectores YFC43:AtGRDP2 y YFN43:PABN3 (Castro-Bustos et al., 2021).

Material vegetal y condiciones de crecimiento

Semillas de *A. thaliana* ecotipo Col-0 fueron lavadas con una solución de cloro al 20% (v/v) por 5 min, seguido por seis lavados con agua destilada estéril. Las semillas fueron estratificadas por 2 días a 4°C y fueron germinadas en placas de agar con medio 0. 2X Murashige and Skoog (MS), sacarosa al 0.5% (w/v) y agar al 1.2% (w/v)(Murashige & Skoog, 1962). Se incubaron las placas en una cámara de crecimiento a 22± 2°C con un fotoperiodo de ciclos de 16 h de luz y 8 de oscuridad. Posteriormente, las plántulas fueron traspasadas a macetas con una mezcla 3:1:1 del sustrato comercial Sunshine Mix #3, vermiculita y perlita.

Para los ensayos de complementación bimolecular fluorescente se emplearon plantas de *Nicotiana benthamiana* de 4 semanas de edad. Estas fueron sometidas a un fotoperiodo de 16 h luz/8 h oscuridad a 22°C.

Transformación de plantas A. thaliana Col-0 mediante floral dip

Para la transformación, se emplearon plantas del ecotipo silvestre Col-0 de 4 semanas de edad. Se incubó por 16 h un cultivo de *Rhizobium radiobacter* (previamente descrito como *A. tumefaciens*) PDMC32:PABN3. Se prepararon 50 mL de medio LB+rif50+km50 por cada 3 macetas a transformar. Se ajustó la OD a 0.8 y se centrifugó a 8,000 x *g*. Posteriormente, se disolvió la pastilla en 50 mL de medio MES con acetosiringona 200 μ M y MgCl₂ 10 mM. Se sumergieron las inflorescencias en el medio de infiltración por 10 segundos. Se incubaron por un día en posición horizontal en condiciones de oscuridad. Posteriormente, se reanudó su crecimiento en condiciones óptimas hasta el desarrollo de silicuas. Se colectaron las semillas (T0). Se seleccionaron las semillas transformantes mediante crecimiento en medio con higromicina 50 μ g/mL. Las plantas que lograron crecer en medio con antibiótico comprenden la T1. Para los experimentos posteriores se empleó la T2.

Fenotipo de sobreexpresantes de PABN3

Se evaluó el fenotipo de crecimiento en placa y en maceta de seis líneas que sobreexpresan a *PABN3* por comparación con el ecotipo silvestre Col-0. Tras la estratificación y un período de vernalización de 2 días, se sembraron 15 semillas de cada línea por placa. Se usaron cinco repeticiones por tratamiento. Se evaluaron los porcentajes de germinación en los siguientes tratamientos: control (Medio MS), salinidad (NaCl 125 mM), estrés por ABA (ABA 1.5 μ M y 5 μ M) y estrés osmótico (glucosa al 4%). Se registraron como semillas germinadas aquellas cuya radícula había emergido. La germinación se registró durante los primeros siete días. A los 16 días se llevaron a cabo las mediciones del peso fresco de 15 plántulas por línea en cada tratamiento. Para el análisis estadístico de los datos se llevó a cabo un ANOVA de una vía y un pohoc de Tukey para comparaciones múltiples usando el programa GraphPad Prism 6.

Complementación biomolecular fluorescente (BiFC)

Se prepararon inóculos de las cepas *A. tumefaciens* YFC43:AtPABN2, YFC43:AtGRDP2, YFN43:AtPABN2 y YFN43:AtPABN3 y p19. Se mantuvieron en incubación a 28°C por 16 h. Posteriormente, se ajustó a una OD₆₀₀ a 1-2 y se centrifugó a 6,000 g por 8 min. Se resuspendió la pastilla en medio de infiltración y se incubó a 28°C por 4 h. Se prepararon mezclas 1:1:1 de las cepas con la proteína fusionada al C-terminal, la proteína fusionada al N-terminal y una cepa con el vector p19 para disminuir la respuesta de silenciamiento génico en la planta. La mezcla fue infiltrada en el envés de las hojas del tabaco. Se colocaron las plantas en la cámara de crecimiento a 22± 2°C con un fotoperiodo de ciclos de 16 h de luz y 8 de oscuridad por dos días. Posteriormente, se cortaron discos de 2 cm de diámetro de las hojas transformadas y se tiñeron con DAPI para la visualización de los núcleos. Se montó la muestra en portaobjetos y se analizó por microscopía confocal.

Microscopía confocal

Para la obtención de las imágenes de interacción entre proteínas se empleó la técnica de microscopía de escaneo láser confocal (CLSM). Se usó un microscopio Carl Zeiss LSM800, modelo EVO LS10 (Munich, Alemania) acoplado a una AxioCam HD color (Carl Zeiss, Modelo 305, Alemania). Se detectó la fluorescencia de GFP entre los 497 y 537 nm, usando una onda de excitación de 488 nm. Se detectó la clorofila entre los 684 y 758 nm con ayuda de un divisor de haz por espejos 488. Para la identificación de núcleos se empleó DAPI. El marcador fluorescente se excitó con una onda de 405 nm y se detectó a los 410-492 nm. La observación de las muestras se llevó a cabo con un objetivo de multi-inmersión de 20x/0.75. Las imágenes se obtuvieron usando el software Zeiss Efficient Navigation (ZEN) Blue Edition versión 2.6. Finalmente, se empleó el programa ImageJ para el procesamiento de imágenes.

RESULTADOS

Las proteínas nucleares de unión a poli-A (PABNs) se agrupan filogenéticamente en un clado diferente al de las PABs

Las proteínas de unión a poli-A (PABs) pueden ser clasificadas en dos tipos de acuerdo con el número de motivos de unión a RNA (RRMs) que éstas presentan. Por ejemplo, las PABs que presentan cuatro dominios tipo RRMs y que se localizan tanto en núcleo como en citosol forman parte del tipo I, mientras que las PABNs (exclusivas del núcleo) pertenecen al tipo II y solo cuentan con un RRM. El número de RRMs presentes en estas proteínas de Arabidopsis representa una diferencia en su tamaño; por ejemplo, las PABs (4 RRMs) tienen una longitud de 500 aminoácidos aproximadamente, mientras las PABNs (1 RRM) tienen un tamaño menor de 217 a 227 aminoácidos.

Para elucidar la relación filogenética entre las proteínas de unión a poli-A (PABs) y las proteínas nucleares de unión a poli-A (PABNs), se construyó un árbol filogenético de las ocho AtPABs y las tres AtPABNs de *Arabidopsis thaliana*, y además se incluyeron las PABs de humano y de levadura, y la PABPN (nuclear) de humano y una proteína con dominio de unión a RNA de cianobacteria como grupo externo (Fig. 1). En el árbol se puede observar que las AtPABs se unen en un solo nodo, junto con una de las PAB de humano (HsPABPC1) y la PAB de levadura; mientras que las tres AtPABNs se agrupan en un clado distinto con la proteína nuclear de unión a poli-A humana (HsPABPN1). En humanos, la PABPN1 cuenta con un dominio RRM y con 10 repetidos de alanina dentro de su región codificante. Cuando estos repetidos se alargan de 11-18 residuos, los pacientes sufren de distrofia muscular oculofaríngea como consecuencia en la desregulación de las colas de poli-A en los mRNAs, en la poliadenilación alternativa, en los procesamientos de InRNAs y snoRNas, en la hiperadenilación y la degradación de RNA (Doki et al., 2019).

Respecto a la relación entre las PABNs nucleares de Arabidopsis, la AtPABN2 y la AtPABN3 comparten un 85% de identidad en su secuencia peptídica y se agrupan en el mismo nodo, separado de su parálogo AtPABN1, la cual comparte solo un 65% de identidad en aminoácidos respecto a la PABN2 y PABN3 (Fig. 1). Esto sugiere que *AtPABN2* y *AtPABN3* pudieron ser producto de una duplicación génica, por lo que estudios sobre la microsintenia de estos genes serán importantes para confirmar esta hipótesis.

Análisis de la organización genómica de las *PABNs* de *Arabidopsis thaliana* y sus ortólogos de plantas.

Con el fin de evaluar la organización genómica entre los genes de plantas que codifican para PABNs, construimos un árbol filogenético con 18 proteínas ortólogas de las tres AtPABNs de *A. thaliana* (Fig. 2). Durante la recopilación de secuencias, observamos que otras especies de Brassicaceaes también contienen tres PABNs, como es el caso de *A. halleri, A. lyrata, Capsella rubella, C. grandiflora y Malcolmia marítima*s. Por otro lado, el durazno (*Prunus persica*) solo presenta dos ortólogas de PABNs. En la Figura 2, también se puede observar que las proteínas ortólogas de AtPABN3 y de AtPABN2 se agruparon en un mismo clado, mientras que AtPABN1 y sus ortólogas se separan en un clado independiente.

Respecto a la conservación genómica, la mayoría de los genes ortólogos de los tres genes *AtPABNs* conservan un arreglo de seis exones y cinco intrones (Fig. 3), excepto el gen *AhPABN2* de *A. halleri* que cuenta con cinco exones y cuatro intrones. Por otro lado, el gen *AtPABN1* presenta una organización genómica con siete exones y seis intrones. Es de notar que en la mayoría de los genes *AtPABNs* los exones 2, 4 y 6 tienen longitudes casi idénticas, siendo de 100-103, 192 y 49 nucleótidos, respectivamente (Fig. 3; Tabla 1). En *AtPABN3*, el exón número dos codifica para el N-terminal, el cuarto exón codifica la mayor parte del dominioRRM y el sexto exón codifica los últimos aminoácidos de la región C-terminal. Los exones 1, 3 y 5 presentan mayor variabilidad respecto a su longitud (Fig. 3, Tabla 1).

Los intrones varían en tamaño entre las tres PABNs de Arabidopsis, pero es notorio que los genes de *AtPABN2* y *AtPABN3* contienen un intrón de más de 1 kb, que corresponden al intrón número tres, el cual está conservado en sus proteínas homólogas de otras plantas de la familia *Brassicaceae*. Cuando se realizó el análisis bioinformático para determinar la conservación entre los intrones de las PABNs, observamos que el tercer intrón del gen *PABN1* de maíz comparte al menos un 40% de identidad con las secuencias del tercer intrón de los genes *AtPABN2*, *AtPABN3* y sus ortólogas en *Brassicaceas*.

En el caso del gen *AhPABN2* de *A. halleri*, este cuenta con un arreglo de solo cuatro intrones en total, su segundo intrón mide más de 1 kb, y este comparte un porcentaje de identidad del 90% con el tercer intrón del gen *AtPABN2*, y más del 80% con el segundo intrón de los genes *MmPABN2* y *AlyPABN2* (Tabla 1).

Estos resultados destacan que AtPABN2 y AtPABN3 no solo son similares en su secuencia peptídica, sino también están conservadas en su arreglo génico. Las diferencias de AtPABN2 y AtPABN3 con AtPABN1 también se observaron a nivel genómico donde el gen *AtPABN1* no cuenta con el intrón de 1 Kb, pero tiene un intrón y exón de más en comparación con los genes parálogos. Este análisis de organización genómica apoya la hipótesis de la duplicación génica entre *AtPABN2* y *AtPABN3*.

La proteína PABN2 interactúa con la proteína AtGRDP2

Previamente, mediante ensayos BiFC se comprobó la interacción entre AtGRDP2 y AtPABN3 en núcleo (Castro-Bustos et al., 2021). Considerando el alto porcentaje de identidad entre AtPABN3 y AtPABN2, y con el fin de conocer el mecanismo de acción de las AtPABNs, se evaluó la interacción AtGRDP2-AtPABN2. En la Figura 4 se observa la fluorescencia emitida por la complementación de la proteína YFP a causa de la interacción entre las proteínas AtGRDP2 y AtPABN2. Asimismo, se observa la señal de fluorescencia de la interacción AtGRDP2-AtPABN2 en el núcleo, y que ésta correlaciona con la tinción del núcleo mediada por DAPI. Con esta

información demostramos que AtGRDP2 también interacciona con AtPABN2 en el núcleo celular, como se observó para el parálogo AtPABN3 (Castro-Bustos et al., 2021).

Evaluación del fenotipo de líneas de *Arabidopsis thaliana* sobreexpresantes del gen *AtPABN3*

En nuestro equipo de trabajo, se diseñó la construcción *PMDC32:AtPABN3* con el fin de explorar los efectos de la sobreexpresión del gen *AtPABN3* en plantas de *A. thaliana* ecotipo silvestre Col-0 bajo distintas condiciones. La tasa de germinación de semillas de las líneas L1, L4, L6, L8, L10, L12 y de *A. thaliana* ecotipo Col-0 (WT) alcanzó un 96% al cuarto día de incubación en placas de medio MS 0.2 X. No se observaron diferencias fenotípicas en el tamaño de cotiledones y longitud de raíces entre las líneas sobre-expresoras *35S::AtPABN3* (*OEAtPABN3*) y el ecotipo parental Col-0 (Fig. 5a-b).

El peso fresco de las plántulas de 16 días de las líneas *OEAtPABN3* L8, L10 y L12 a los 16 días fue ligeramente menor en comparación con la Col-0; sin embargo, las diferencias no fueron estadísticamente significativas (Fig. 5c). Por otra parte, las líneas L1, L4 y L6 presentaron un peso similar al de la parental.

Curiosamente, algunas de las plántulas de la línea L1 presentaron cotiledones morados al cuarto día de germinación. Después de unos días, estos cotiledones se tornaron blancos. No queda muy claro cuándo, pero el crecimiento de estas plántulas se detiene debido a que tanto sus cotiledones como su raíz son más pequeños en comparación con las otras plántulas de la línea L1 que no presentaron este comportamiento (Fig. 5a). Una de las perspectivas de este trabajo es determinar si el fenotipo de la línea 1 correlaciona con la sobreexpresión de *AtPABN3*; para ello, evaluaremos y compararemos los niveles de expresión de la línea L1 versus las demás líneas que sobreexpresan el gen *AtPABN3*.

Las líneas sobreexpresoras de *AtPABN3* presentan un fenotipo sensible a estrés salino

En condiciones de estrés salino, la tasa de germinación de las líneas *OEAtPABN3* L1 y L12 (56% y 72%) al cuarto día fue menor en comparación con la planta silvestre (84%). En contraste, en el mismo día las líneas L4, L6, L8 y L10 presentaron una tasa de germinación (90-96%) más alta en comparación con la Col-0 (Fig. 6b).

Interesantemente, las líneas *OEAtPABN3* L1, L6, L10 y L12 que sobreexpresan a *PABN3* mostraron un marcado fenotipo de sensibilidad durante el crecimiento al estrés salino; mientras que 2-4 plántulas de cada 15 plantas del ecotipo Col-0 presentaron cotiledones y hojas verdes, la mayoría de las plántulas de las líneas *OEAtPABN3* mostraron cotiledones cloróticos observándose un daño notorio y un menor desarrollo (Fig. 6a). Lo anterior, también se vio reflejado con una disminución del peso fresco en las plántulas de las líneas *OEAtPABN3*, en comparación con las plántulas de la Col-0 (Fig. 6c).

La sobreexpresión de *AtPABN3* no genera un fenotipo en respuesta a estrés osmótico

Al desafiar a las líneas *OEAtPABN3* a estrés osmótico, con la aplicación exógena de glucosa al 4% al medio de cultivo, nosotros observamos que la tasa de germinación fue similar a las condiciones óptimas, presentando más del 90% de germinación en todas las líneas sobreexpresantes *OEAtPABN3s* y el ecotipo parental Col-0 desde el 4to día de incubación (Fig. 7a-b).

Por otra parte, el peso fresco de todas las líneas, incluida la Col-0, resultó mayor que en condiciones óptimas. Específicamente, las líneas *OEAtPABN3* L1, L4 y L6 tuvieron un peso ligeramente menor (26.3, 26.9 y 27.9 mg) en comparación con su parental Col-0 (30 mg) bajo estrés osmótico. De manera similar, las líneas L8, L10 y L12 pesaron 25.3, 24.8 y 22.6 mg, respectivamente; siendo menos pesadas que la Col-0 (28.7 mg) (Fig. 7c). A pesar de las diferencias en peso fresco, los resultados no presentaron diferencias estadísticamente significativas.

Las líneas que sobreexpresan *AtPABN3* son ligeramente insensibles a la aplicación exógena de la fitohormona ABA

Nos planteamos evaluar la germinación de semillas sobreexpresantes de At*PABN3* en tratamientos con concentraciones de ABA 1.5 y 5 μ M. La presencia de esta fitohormona en el medio de crecimiento produce un letargo y disminuye la germinación de semillas, y en altas concentraciones genera un arresto en la germinación.

La tasa de germinación en presencia del ABA se vio afectada en todas las líneas *OEAtPABN3* (Fig. 8b y 8d). En el cuarto día del tratamiento con ABA 1.5 µM, la línea L6 mostró un porcentaje mayor de germinación (55.0%) en comparación a la parental Col-0 (23.3%) (Fig. 8b).

Al cuarto día de germinación bajo un tratamiento con ABA 5 μ M, todas las líneas *OEAtPABN3*, excepto L1, registraron una mayor tasa de germinación (30.6-50.6%) que la parental Col-0 (17.3 y 20%). Sin embargo, al séptimo día no hubo diferencias entre la parental y las líneas sobreexpresoras, ya que la Col-0 alcanzó una tasa de germinación del 51.6 y 48.33%, mientras las líneas *OEAtPABN3* mostraron una germinación del 51 al 65%, a excepción de la línea L1 que alcanzó solamente el 36.6% (Fig. 7d).

Uno de los aspectos que resaltan en las imágenes de ambos tratamientos de ABA (1.5 y 5 μ M) es que las raíces de algunas de las plántulas de las líneas sobreexpresantes de PABN3 fueron considerablemente mayores comparadas con las raíces de la parental Col-0 que presentan raíces muy pequeñas (Fig. 8a y 8c). En particular, a la concentración más alta de 5 μ M de ABA la totalidad de los germinados de la parental Col-0 se quedaron en arresto, mientras que algunas plántulas de las líneas *OEAtPABN3* continuaron con su crecimiento. Estos resultados apuntan a que la sobreexpresión del gen *PABN3* en Arabidopsis genera un fenotipo de insensibilidad a la aplicación exógena de ABA.

DISCUSIÓN

Las PABNs forman parte de una subfamilia de proteínas de unión a poli-A que tienen un solo dominio de unión a RNA (RRM). Miembros de esta subfamilia en otros organismos superiores incluyen a la CsPABPN1 de naranjo, la XlePABPN1 de *Xenopus* y a la HsPABPN1 de humano (Doki et al., 2019; Domingues et al., 2015; Song et al., 2008).

En este estudio, mediante la comparación de las secuencias de los ortólogos de las AtPABNs de Arabidopsis thaliana se identificaron motivos dentro de la secuencia de estas proteínas de unión a poli-A nucleares. Al igual que CsPABPN1, las secuencias de las AtPABNs cuentan con regiones ricas en ácido aspártico (D) y ácido glutámico (E). Además, la proteína CsPABPN1 en su amino-terminal tiene una región rica en DEH, un motivo específico de especies cítricas (Domingues et al., 2015). Resulta interesante que esta región es similar al carboxilo terminal del factor de terminación de la trascripción mitocondrial 4, MTER4, que participa en la unión a RNA y a otras proteínas. Es posible que en la proteína CsPABPN1, la región rica en DEH esté involucrada en la unión a RNA y/o en la especificidad de interacciones proteínaproteína. En el caso de la proteína AtPABN1 de Arabidopsis en lugar de la región rica en DEH se encuentra la secuencia TEEYEEHGGEEGAAAGDEELE (rica en ácido glutámico), la cual está ausente en sus proteínas parálogas, AtPABN2 y AtPABN3. Experimentos posteriores serán necesarios para evaluar sí esta firma es responsable de la interacción entre AtPABN1 con sus proteínas ligando, o en la interacción a los RNAs.

El porcentaje de identidad de las AtPABNs con HsPABPN1 de humano es del 40% comparada con AtPABN1, y del 43% comparada con AtPABN2 y AtPABN3. Esto sugiere que las AtPABNs son posibles ortólogas de HsPABPN1, aunque se requieren de más análisis para confirmarlo. De manera similar a HsPABPN1, AtPABN1 tiene una región rica en argininas en el C-terminal (Goss & Kleiman, 2013). Los dominios ricos en arginina pueden ser del tipo serina-arginina (SR) o cajas RGG. El dominio SR se presenta en proteínas que participan en el splicing, mientras las cajas RGG (arginina, glicina) se han identificado en proteínas que

median las interacciones entre proteínas y entre proteína-RNA. La región enriquecida en dominios de HsPABPN1 y AtPABN1 no cumple con las características para ser clasificada como un motivo RS o RGG; sin embargo, es posible que el enriquecimiento en argininas les confiera especificidad para participar en eventos de splicing.

En esta investigación analizamos la organización genómica de 21 genes que codifican para proteínas de PABNs de monocotiledóneas y dicotiledóneas. Se elucidó una organización génica conservada que consiste en 5 intrones y 6 exones en la mayoría de estas secuencias (86.3%). Los genes que presentaron una organización génica diferencial fueron AtPABN1, que cuenta con 6 intrones y 7 exones, y AhPABN2 que tiene 4 intrones y 5 exones.

Este dato contrasta para el caso de las 8 PABs citosólicas de *A. thaliana* en las cuáles la organización génica no es muy conservada; sin embargo, a nivel expresión tejido-específica muestran conservación (Belostotsky, 2003). El número de intrones varía de 3 a 8 entre los 8 genes *PABs* (Belostotsky, 2003). Las *PABs* de Arabidopsis se pueden clasificar de acuerdo con su patrón de expresión. La clase I compuesta por los genes *PAB3* y *PAB5* se expresan en tejido reproductivo y tienen una estructura de seis intrones y siete exones. *PAB2, PAB4* y *PAB8* que forman parte de la clase II se expresan constitutivamente en toda la planta y comparten un arreglo génico de 8 intrones y 9 exones. Por otra parte, *PAB6* y *PAB7* conforman la clase III quienes presentan una expresión débil y restringida a hojas y silicuas, respectivamente. Los transcritos de las proteínas de la clase III cuentan con 3 intrones en común que no se encuentran en los genes parálogos, y difieren en las secuencias de los 5 intrones ubicados en el extremo 3', los cuales codifican para el dominio PABPC. Además, el gen *PAB7* cuenta con un intrón único (Belostotsky, 2003).

Las *AtPABNs* de Arabidopsis presentan una expresión fuerte en toda la planta, además preservan esta expresión a lo largo del desarrollo del organismo (Klepikova et al., 2016). La expresión del gen *AtPABN2* es ligeramente menor en semillas secas y en silicuas en comparación con el resto de la planta. Los niveles de

transcrito de *AtPABN3* son menores en las radículas de germinados de un día en comparación con los niveles de los genes *AtPABN2* y *AtPABN1*. Además, el gen *AtPABN1* tiene una expresión ligeramente menor en hojas maduras en comparación con sus parálogos (Klepikova et al., 2016).

Del total de secuencias cuyo arreglo genómico fue analizado, 18 de ellas corresponden a genes PABNs de la familia Brassicaceae (Tabla 1). El 66% de estas secuencias cuentan con un intrón con una longitud mayor a 1 kb. Los intrones con una longitud mayor a 1 kb son poco comunes en el genoma A. thaliana, comprendiendo el 0.77% del total de intrones (Chang et al., 2017). La longitud del resto de los intrones de los genes homólogos de las AtPABNs en plantas de la familia de las Brasicáceas, es cercano al promedio de los intrones en los genes de AtPABNs Arabidopsis, 168 pb (Chang et al., 2017). Al alinear las secuencias >900 pb del tercer intrón de PABNs de Brassicaceaes (Tabla 1), observamos que comparten un porcentaje de identidad que va del 43 al 99% comparadas con el intrón largo de AtPABN2 y AtPABN3. En A. thaliana el gen de la histona desmetilasa *IBM1* presenta un intrón con una longitud de más de 2 Kb, en este se encuentra una región cuya metilación regula positivamente su expresión génica (Rigal et al., 2012). Los ortólogos del gen IBM1 en organismos distantes como en maíz y abeja también contienen este intrón de una longitud mayor al promedio de sus respectivos genomas (Rigal et al., 2012). Previamente se ha elucidado que en los genomas de humano y C. elegans, los genes con una expresión fuerte cuentan con intrones más cortos que los de genes con menor expresión que cuentan con intrones más largos (Castillo-Davis et al., 2002). Debido al tiempo y costos de la transcripción, y tomando en cuenta la conservación del tercer intrón de los genes AtPABN3 y AtPABN2 en otras Brassicaceaes es probable que éste cuente con secuencias regulatorias que aún no han sido identificadas.

Los intrones se pueden encontrar en distintas fases de acuerdo con su relación con los codones de los exones. Los intrones clasificados como fase cero son aquellos que no interrumpen el codón donde están insertados. Se ha estimado que el 60% de intrones fase cero y el 10% fase, uno prevalecen desde un ancestro común (De

Souza et al., 1998). En los 21 genes correspondientes a *PABNs* de plantas analizadas en este estudio, se encontró que la mayoría de los intrones pertenecen a la fase cero, y al menos uno de los intrones de cada secuencia corresponde a la fase uno. Además, todos los intrones de las *PABNs* de *A. thaliana* tienen el arreglo GT-AG característico de los intrones del tipo U2, que son procesados y empalmados por la maquinaria del spliceosoma principal.

Las PABNs de *Citrus sinensis* (CsPABPN1) y de *Xenopus laevis* (XlePABPN1) se encuentran como homodímeros en solución (Domingues et al., 2015; Song et al., 2008). Cuando estas proteínas se unen a la cola de poli-A del mRNA, el dímero se disocia e interactúa con el RNA en forma de monómero (Domingues et al., 2015). Según el modelo propuesto por Domingues y col, se requiere de siete proteínas de unión a poli-A tipo II (PABPNs) para formar una estructura superhelicoide que envuelve la cola de poli-A de 50 residuos. La estructura es estabilizada por las interacciones con las adeninas y los puentes de hidrógeno y contactos Van der Waals entre los monómeros de las PABNs. Previamente, se ha determinado que el C-terminal de AtPABN2 es necesario para la formación de homodímeros (Dokládal et al., 2015). Los porcentajes de homología de los C-terminal entre las AtPABNs sugieren que AtPABN1 y AtPABN3 podrían formar también homodímeros, e incluso podrían formarse heterodímeros entre ellas. Por esta razón, en esta tesis nosotros nos dimos a la tarea de construir los vectores BiFC para demostrar sí las AtPABs forman homodímeros y heterodímeros.

Castro-Bustos et al. (2022), determinó que la interacción de AtGRDP2 con AtPABN3 ocurre en núcleo. Además, elucidó que la región amino-terminal es responsable de esta interacción. Dado que la interacción de AtGRDP2 con otras proteínas presentes en el citosol y en el cloroplasto, es posible que AtGRDP2 funcione como una proteína de transporte de RNA. En este estudio demostramos que la interacción de AtGRDP2 con AtPABN2 también sucede en el núcleo. El alto porcentaje de identidad entre ambos parálogos PABN2 y PABN3 sugiere que estas interacciones con AtGRDP2 podrían estar mediadas por las regiones conservadas que comprenden el RRM y el extremo carboxilo de estas PABNs de Arabidopsis. La

interacción de AtGRDP2 con AtPABN2 y AtPABN3 podría indicar una redundancia de función de las PABNs de Arabidopsis. En estudios posteriores será necesario evaluar sí AtPABN1 también interactúa con esta proteína con un dominio rico en glicina (AtGRDP2).

Como se mencionó anteriormente, la sobreexpresión de *AtGRDP2* presenta un fenotipo de crecimiento acelerado y tolerancia a estrés. Interesantemente la sobreexpresión de *AtGRDP1*, el parálogo de *AtGRDP2*, también confiere un fenotipo tolerante a estrés salino y estrés osmótico; además de ser tolerantes a la aplicación exógena de ABA (Rodríguez-Hernández et al., 2014). AtGRDP1 está compuesta por 819 aminoácidos y se expresa durante las etapas de desarrollo general de la planta (Muro-Medina, 2014).

Mediante el estudio transcripcional de las mutantes nulas *Atpabn2* comparadas con el ecotipo parental Col-0 se determinó que esta proteína podría jugar un papel en la regulación de transcritos ribosomales y de la traducción. En estas mutantes *Atpabn2* los genes *G2p* y *TERT* mostraron una mayor expresión comparadas con la WT. Es posible que PABN2 regule negativamente la transcripción o estabilidad de los genes *G2p* y *TERT* mediante un mecanismo de retroalimentación. *G2p* codifica para una proteína nuclear involucrada en la metilación de mRNA, el importe de proteínas al núcleo y en la proteólisis (Dokládal et al., 2015).

La importancia del funcionamiento correcto de las proteínas nucleares de unión a poli-A se ve reflejada en los efectos causados cuando la HsPABPN1 de humano no está funcionando correctamente. En humanos la expresión de la proteína HsPABPN1 con un juego de repetidos de alanina anormales se asocia con la distrofia muscular oculofaríngea (Doki et al., 2019). En las células que expresan la HsPABPN1 con alargados de alanina, se forman agregados nucleares que contienen tanto RNAs poliadenilados y mRNAs sin procesar. También, se ha demostrado que HsPABPN1 secuestra a la proteína músculo-específica (TNNT3) de las manchas nucleares y se produce un splicing defectuoso mediado por la proteína SC35 (Klein et al., 2016).

La ausencia de un fenotipo en las líneas de sobreexpresión de *PABN3* bajo condiciones normales podría deberse a un mecanismo de autoregulación. En humanos, la proteína HsPABPN1 tiene un mecanismo de autoregulación dependiente de la retención del sexto intrón. Esta autoregulación es dependiente de un splicing ineficiente y a la unión de HsPABPN1 a una región rica en adeninas presente en el UTR 3' (Bergeron et al., 2015). Si bien, no se identificaron regiones ricas en adeninas en los extremos UTR de las PABNs; sí existen regiones enriquecidas en adeninas en el tercer intrón de *AtPABN3*. Para elucidar si AtPABN3 y sus parálogas cuentan con un mecanismo de autoregulación similar al de HsPABPN1, será necesario evaluar los niveles del transcrito endógeno de *AtPABN3* en las líneas que sobreexpresan *AtPABN3* (sin intrones) evaluadas en este estudio.

Por su naturaleza sésil, las plantas están expuestas a cambios bruscos en el ambiente y al ataque de organismos patógenos. Esto las ha llevado a desarrollar un sistema de respuesta al estrés que actúa a nivel molecular, celular y sistémico. Cuando el organismo se enfrenta a altas concentraciones de sal, la homeostasis iónica e hídrica sufre un desbalance que impacta en el crecimiento y e incluso en la supervivencia de la planta. Para ello, la planta intenta prevenir el daño, restablecer la homeostasis y continuar con el crecimiento (Zhu, 2001). ABA es una fitohormona que cumple un papel esencial durante el desarrollo de la planta. Bajo condiciones normales, ABA está involucrada en procesos como la latencia y germinación de la semilla y el cierre de las estomas (Raghavendra et al., 2010). Cuando la planta está creciendo bajo altas concentraciones de sales, los niveles del ABA aumentan, lo cual enciende la transcripción de genes de respuesta a estrés salino y osmótico (Yoshida et al., 2014). Las mutantes insensibles a ácido abscísico 4 (abi4) son tolerantes a estrés salino, mientras que las sobreexpresantes muestran un fenotipo marcado de sensibilidad a la salinidad. ABI4 regula negativamente la expresión del gen *HKT1;1*, que codifica para un transportador de sodio, mediante la unión con su promotor. HKT1;1 estimula la expulsión de iones de sodio hacia las células parenquiales del xilema, evitando el transporte del ion a las hojas de la planta (Shkolnik-Inbar et al., 2013). De esta manera, bajo condiciones de salinidad, ABI4 disminuye el transporte de iones sodio desde la raíz hacia las hojas (Shkolnik-Inbar et al., 2013). Es por ello que en nuestro estudio la aparente contradicción en la tolerancia al ABA denotada por las líneas *OEAtPABN3* y su mayor sensibilidad a estrés salino nos pareció un dato muy interesante, que pretendemos seguir estudiando. Es posible que la afectación en el crecimiento de las líneas *OEAtPABN3* bajo condiciones de estrés salino sea independiente de ABA y ocurra en otro de los niveles de respuesta de la planta, tales como un desbalance en el control de ingreso de las moléculas de NaCI a las células.

CONCLUSIONES

La función de las proteínas nucleares de unión a poli-A (PABN) podría ir más allá de participar en el proceso de poliadenilación y de proporcionar estabilidad a los mRNAs. La interacción de las PABNs con otras proteínas sugiere que también pueden estar involucradas en diversos procesos celulares. La evidencia de que las proteínas parálogas AtPABN2 y AtPABN3 interactúan con la proteína AtGRDP2 (con una posible función de transportador de RNAs fuera del núcleo), permite hipotetizar que las AtPABNs podrían funcionar como un punto de control que podría verificar el adecuado procesamiento del mRNA blanco y lo entregue a un complejo de proteínas de transporte que podría incluir a proteínas de unión a RNA como las GRPs, las PABs, y también a AtGRDP2.

Bajo condiciones de estrés salino, se detectó un menor desarrollo de las líneas de sobreexpresión de *AtPABN3* en NaCl 125 mM, en comparación a la parental Col-0. Por el contrario, bajo la aplicación exógena de la fitohormona ABA, un mayor desarrollo de los germinados principalmente en las raíces fue observado en comparación a la parental, sugiriendo que estas líneas de sobreexpresión muestran un fenotipo de hiposensibilidad al ABA.

PERSPECTIVAS

Determinar los niveles de expresión de factores de transcripción tipo ABI implicados en la señalización de ABA en las líneas de sobreexpresión de *AtPABN3*. También será interesante evaluar el fenotipo de líneas mutantes *AtPABN3* bajo estrés salino y en la presencia de ABA. Además, evaluar los niveles de transcrito del gen endógeno de *AtPABN3* en las líneas de sobrexpresión de *AtPABN3* para determinar sí este gen presenta un mecanismo de autorregulación como el que se ha reportado para el gen de humano *HsPABPN1*.

LISTA	DE T	ABL	AS
-------	------	-----	----

			Tamaño (nt)															
	Clave		5 UTR	Exón l	Intrón I	Exón 2	Intrón 2	Exón 3	Intrón 3	Exón 4	Intrón 4	Exón 5	Intrón 5	Exón 6	Intrón 6	Exón 7	3 UTR	Total
1	AT5G51120	AtPABN1	433	156	99	103	79	123	76	59	244	192	84	119	46	46	316	2175
2	AT5G10350	AtPABN2	33	123	119	100	209	71	1305	192	97	128	91	49			270	2787
3	AT5G65260	AtPABN3	61	111	90	103	142	71	1016	192	82	128	89	49			240	2374
4	Araha.28134s0003.1	AhPABN1	37	162	101	103	292	68	270	192	83	116	166	46			169	1805
5	Araha.2597s0005.1	AhPABN2	0	106	163	71	1027	192	81	128	82	49					208	2107
6	Araha.0539s0006.1	AhPABN3	17	123	114	100	176	71	1366	192	97	128	91	49			229	2753
7	AL8G25380.t1	AlyPABN1	76	162	100	103	292	68	267	192	84	116	174	46			257	1937
8	AL6G20840.t3	AlyPABN2	56	111	91	103	161	71	1058	192	81	128	81	49			273	2455
9	AL8G42820.t1	AlyPABN3	22	123	120	100	172	71	1311	192	94	128	92	49			265	2739
10	Carub.0006s0881	CrPABN1	11	111	100	103	142	74	1044	192	80	128	89	49			222	2345
11	Carub.0008s1116.1	CrPABN2	53	156	114	103	261	68	198	192	91	116	183	46			321	1902
12	Carub.0008s2613	CrPABN3	10	123	116	100	207	71	1371	192	99	128	94	49			240	2800
13	Cagra.5476s0005	CgPABN1	83	156	114	103	260	68	199	192	94	116	193	46			339	1963
14	Cagra.1085s0025	CgPABN2	83	111	100	103	142	74	1049	192	80	128	89	49			237	2437
15	Cagra.0917s0058.1	CgPABN3	31	123	116	100	207	71	1356	192	99	128	94	49			233	2799
16	Mamar.0014s0112	MmPABN1	61	156	112	103	317	68	251	192	84	116	191	46			301	1998
17	Mamar.0029s1575	MmPABN2	42	111	70	103	96	71	914	192	79	128	83	49			421	2359
18	Mamar.0076s0016	MmPABN3	20	123	78	100	164	71	1320	192	101	128	90	49			217	2653
19	Zm00008a023046	ZmPABN1	180	105	84	100	1333	71	2836	192	102	122	138	49			530	5842
20	Prupe.2G269600	PpPABN1	96	123	95	103	1020	71	709	192	108	125	547	46			1154	4389
21	Prupe.6G191400	PpPABN2	211	123	97	103	396	71	2452	192	85	128	102	49			350	4359
22	Cre06.g274500	ChrPABN1	187	105	65	69	71	183	617	57	212	90	412	200	181	49	413	2911

Tabla 1. Tamaño de regiones UTR, intrones y exones de proteínas ortólogas de AtPABNs.

		Fases de los intrones									
		Intrón I	Intrón II	Intrón III	Intrón IV	Intrón V	Intrón VI				
1	AtPABN1	0	0	1	1	0	0				
2	AtPABN2	0	0	1	0	0					
3	AtPABN3	0	0	1	0	0					
4	AhPABN1	0	0	1	0	0					
5	AhPABN2	0	1	0	0						
6	AhPABN3	0	0	1	0	0					
7	AlyPABN1	0	0	1	0	0					
8	AlyPABN2	0	0	1	0	0					
9	AlyPABN3	0	0	1	0	0					
10	CrPABN1	0	0	1	0	0					
11	CrPABN2	0	0	1	0	0					
12	CrPABN3	0	0	1	0	0					
13	CgPABN1	0	0	1	0	0					
14	CgPABN2	0	0	1	0	0					
15	CgPABN3	0	0	1	0	0					
16	MmPABN1	0	0	1	0	0					
17	MmPABN2	0	0	1	0	0					
18	MmPABN3	0	0	1	0	0					
19	ZmPABN1	0	0	1	0	0					
20	PpPABN1	0	0	1	0	0					
21	PpPABN2	0	0	1	0	0					

 Tabla 2. Fases de los intrones de AtPABNs y sus ortólogas.

LISTA DE FIGURAS



Fig. 1. Árbol filogenético de proteínas de unión a poli-A canónicas y nucleares de diversos organismos. Los cuadros agrupan las PABs canónicas, el recuadro verde agrupa las proteínas de Arabidopsis, el morado la de humano, el anaranjado la de levadura y el negro a la proteína con dominio de unión a RNA de la cianobacteria. El árbol filogenético se obtuvo mediante el método de Neighbor-Joining. Al inicio de cada clado se indica el porcentaje (Bootstrap) en el que las secuencias se agruparon juntas en las 1, 000 réplicas ejecutadas. También se indica la distancia evolutiva que representa el número de sustituciones de aminoácidos por sitio.



Fig. 2. Árbol filogenético de proteínas nucleares de unión a poli-A de Arabidopsis y sus proteínas ortólogas en plantas. El árbol filogenético se construyó mediante Neighbor-Joining. Al inicio de cada clado se indica el porcentaje (Bootstrap) en que las secuencias se agrupan juntas en las 1, 000 réplicas ejecutadas. También se indica la distancia evolutiva que representa el número de sustituciones de aminoácidos por sitio.





Fig. 3. Arreglo genómico de *AtPABNs* y sus ortólogas en otras plantas. Los recuadros en blanco señalan las regiones UTR, los recuadros con relleno negro señalan los exones y las líneas en diagonal representan los intrones. En la esquina superior derecha de cada representación se encuentra una barra de escala que representa 100 pb. El número en la parte inferior de cada exón señala su longitud en pb.



Fig. 4. Señal de fluorescencia emitida por la interacción del heterodímero AtGRDP2-AtPABN2 en hojas de *N. benthamiana*. Se utilizó DAPI para teñir los núcleos. Se empleó un objetivo de 20X para visualizar las muestras. La barra indica una longitud de 20 µm y la flecha blanca indica la ubicación de un núcleo.



Fig. 5. Fenotipo de líneas de sobreexpresión de *AtPABN3* bajo condiciones óptimas de crecimiento. A) Fotografía de las plántulas a los 16 días de incubación. B) Porcentaje de germinación bajo condiciones óptimas. C) Peso fresco (mg) de 5 grupos de 15 plántulas por línea al día 16 de incubación. Se realizó un análisis estadístico usando ANOVA (p<0.05). No hubo diferencias estadísticamente significativas.



Fig. 6. Fenotipo de líneas de sobreexpresión de *AtPABN3* bajo condiciones de estrés salino (NaCl 125mM). A) Fotografía de las plántulas a los 16 días de edad. B) Porcentaje de germinación bajo condiciones de estrés salino. C) Peso fresco (mg) de grupos de 15 plántulas por línea al día 16 de incubación. Los datos fueron analizados mediante un ANOVA usando un p-value (<0.05). Los datos estadísticamente significativos están marcados con un asterisco (*).



Fig. 7. Fenotipo de líneas de sobreexpresión de *AtPABN3* bajo condiciones de estrés osmótico (glucosa 4%). A) Fotografía de las plántulas a los 16 días de edad. B) Porcentaje de germinación bajo condiciones de estrés osmótico. C) Peso fresco (mg) de grupos de 15 plántulas por línea al día 16 de edad. Los datos fueron analizados mediante un ANOVA usando un p-value (<0.05). No hubo diferencias estadísticamente significativas.



Fig. 8. Fenotipo de líneas de sobreexpresión de *AtPABN3* bajo condiciones de estrés por ABA. **A-B)** ABA 1.5 μ M; **C-D)** ABA 5 μ M. A) Fotografía de las plántulas de todas las líneas a los 16 días de incubación con ABA 1.5 μ M. B) Porcentaje de germinación de todas las líneas con ABA 1.5 μ M. C) Fotografía de las plántulas de todas las líneas a los 16 días de incubación en medio con ABA 5 μ M. D) Porcentaje de germinación de todas las líneas en medio con ABA 5 μ M. D) Porcentaje de germinación de todas las líneas en medio con ABA 5 μ M. D) Porcentaje de germinación de todas las líneas en medio con ABA 5 μ M. D) Porcentaje de germinación de todas las líneas en medio con ABA 5 μ M. D) Porcentaje de germinación de todas las líneas en medio con ABA 5 μ M. D) Porcentaje de germinación de todas las líneas en medio con ABA 5 μ M. D) Porcentaje de germinación de todas las líneas en medio con ABA 5 μ M. D) Porcentaje de germinación de todas las líneas en medio con ABA 5 μ M. D) Porcentaje de germinación de todas las líneas en medio con ABA 5 μ M. D) Porcentaje de germinación de todas las líneas en medio con ABA 5 μ M. D) Porcentaje de germinación de todas las líneas en medio con ABA 5 μ M. Los datos fueron analizados mediante un ANOVA usando un p-value (<0.05).

REFERENCIAS

- Arabidopsis Interactome Mapping Consortium. (2011). Evidence for Network Evolution in an Arabidopsis Interactome Map. Science. https://doi.org/10.1126/science.1203877
- Belda-Palazón, B., Ruiz, L., Martí, E., Tárraga, S., Tiburcio, A. F., Culiáñez, F., Farràs, R., Carrasco, P., & Ferrando, A. (2012). Aminopropyltransferases involved in polyamine biosynthesis localize preferentially in the nucleus of plant cells. *PLoS ONE*, 7(10). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046907
- Belostotsky, D. A. (2003). Unexpected complexity of poly(A)-binding protein gene families in flowering plants: Three conserved lineages that are at least 200 million years old and possible auto- and cross-regulation. *Genetics*, *163*(1), 311–319. https://doi.org/10.1093/genetics/163.1.311
- Bergeron, D., Pal, G., Beaulieu, Y. B., Chabot, B., & Bachand, F. (2015). Regulated intron retention and nuclear pre-mRNA decay contribute to PABPN1 autoregulation. *Molecular and Cellular Biology*, 35(14), 2503–2517. https://doi.org/10.1128/mcb.00070-15
- Bravo, J., Aguilar-Henonin, L., Olmedo, G., & Guzmán, P. (2005). Four distinct classes of proteins as interaction partners of the PABC domain of *Arabidopsis thaliana* Poly(A)-binding proteins. In *Molecular Genetics and Genomics* (Vol. 272, Issue 6, pp. 651–665). https://doi.org/10.1007/s00438-004-1090-9
- Castillo-Davis, C. I., Mekhedov, S. L., Hartl, D. L., Koonin, E. v., & Kondrashov, F. A. (2002). Selection for short introns in highly expressed genes. *Nature Genetics*, *31*(4), 415–418. https://doi.org/10.1038/ng940
- Castro-Bustos, S., Maruri-López, I., Ortega-Amaro, M. A., Serrano, M., Ovando-Vázquez, C., & Jiménez-Bremont, J. F. (2021). An interactome analysis reveals that *Arabidopsis thaliana* GRDP2 interacts with proteins involved in post-transcriptional processes. *Cell Stress and Chaperones*, 27(2), 165–176. https://doi.org/10.1007/s12192-022-01261-5
- Chang, N., Sun, Q., Hu, J., An, C., & Gao, H. (2017). Large introns of 5 to 10 kilo base pairs can be spliced out in Arabidopsis. *Genes*, *8*(8). https://doi.org/10.3390/genes8080200
- Chekanova, J. A., Shaw, R. J., & Belostotsky, D. A. (2001). Analysis of an essential requirement for the poly(A) binding protein function using cross-species complementation. *Current Biology*, *11*(15), 1207–1214. https://doi.org/10.1016/S0960-9822(01)00371-2

- Colgan, D. F., & Manley, J. L. (1997). Mechanism and regulation of mRNA polyadenylation. *Genes and Development*, *11*(21), 2755–2766. https://doi.org/10.1101/gad.11.21.2755
- De Souza, S. J., Long, M., Klein, R. J., Roy, S., Lin, S., & Gilbert, W. (1998). Toward a resolution of the introns earlylate debate: Only phase zero introns are correlated with the structure of ancient proteins (introns-earlyintrons-latemodules) 95(9), 5094-5099. www.pnas.org.
- Deng, X., & Cao, X. (2017). Roles of pre-mRNA splicing and polyadenylation in plant development. *Current Opinion in Plant Biology*, 35, 45–53. https://doi.org/10.1016/j.pbi.2016.11.003
- Doki, T., Yamashita, S., Wei, F. Y., Hara, K., Yamamoto, T., Zhang, Z., Zhang, X., Tawara, N., Hino, H., Uyama, E., Kurashige, T., Maruyama, H., Tomizawa, K., & Ando, Y. (2019). Mitochondrial localization of PABPN1 in oculopharyngeal muscular dystrophy. In *Laboratory Investigation* (Vol. 99, Issue 11, pp. 1728–1740). https://doi.org/10.1038/s41374-019-0243-8
- Dokládal, 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
- Domingues, M. N., Sforça, M. L., Soprano, A. S., Lee, J., De Souza, T. D. A. C. B., Cassago, A., Portugal, R. V., de Mattos Zeri, A. C., Murakami, M. T., Sadanandom, A., de Oliveira, P. S. L., & Benedetti, C. E. (2015). Structure and Mechanism of Dimer–Monomer Transition of a Plant Poly(A)-Binding Protein upon RNA Interaction: Insights into Its Poly(A) Tail Assembly. *Journal of Molecular Biology*, *427*(15), 2491– 2506. https://doi.org/10.1016/J.JMB.2015.05.017
- Forbes, K. P., Addepalli, B., & Hunt, A. G. (2006). An Arabidopsis Fip1 homolog interacts with RNA and provides conceptual links with a number of other polyadenylation factor subunits. *Journal of Biological Chemistry*, 281(1), 176–186. https://doi.org/10.1074/jbc.M510964200
- Gallie, D. R. (2017). Class II members of the poly(A) binding protein family exhibit distinct functions during Arabidopsis growth and development. *Translation*, *5*(1), e1295129. https://doi.org/10.1080/21690731.2017.1295129
- Gallie, D. R., & Liu, R. (2014). Phylogenetic analysis reveals dynamic evolution of the poly(A)-binding protein gene family in plants. *BMC Evolutionary Biology*, 14(1). https://doi.org/10.1186/s12862-014-0238-4
- Goodstein, D. M., Shu, S., Howson, R., Neupane, R., Hayes, R. D., Fazo, J., Mitros, T., Dirks, W., Hellsten, U., Putnam, N., & Rokhsar, D. S. (2012). Phytozome: A

comparative platform for green plant genomics. *Nucleic Acids Research*, *40*(D1). https://doi.org/10.1093/nar/gkr944

- Goss, D. J., & Kleiman, F. E. (2013). Poly(A) binding proteins: Are they all created equal? *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*, 4(2), 167–179. https://doi.org/10.1002/wrna.1151
- Hsieh, M. H., & Goodman, H. M. (2002). Molecular characterization of a novel gene family encoding ACT domain repeat proteins in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 130(4), 1797–1806. https://doi.org/10.1104/pp.007484
- Hunt, A. G., Xing, D., & Li, Q. Q. (2012). Plant polyadenylation factors: Conservation and variety in the polyadenylation complex in plants. *BMC Genomics*, *13*(1), 1. https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-641
- Kim, M. H., Sasaki, K., & Imai, R. (2009). Cold shock domain protein 3 regulates freezing tolerance in Arabidopsis thaliana. *Journal of Biological Chemistry*, 284(35), 23454– 23460. https://doi.org/10.1074/jbc.M109.025791
- Kim, M. H., Sonoda, Y., Sasaki, K., Kaminaka, H., & Imai, R. (2013). Interactome analysis reveals versatile functions of Arabidopsis COLD SHOCK DOMAIN PROTEIN 3 in RNA processing within the nucleus and cytoplasm. *Cell Stress and Chaperones*, *18*(4), 517–525. https://doi.org/10.1007/s12192-012-0398-3
- Klein, P., Oloko, M., Roth, F., Montel, V., Malerba, A., Jarmin, S., Gidaro, T., Popplewell, L., Perie, S., St Guily, J. L., de La Grange, P., Antoniou, M. N., Dickson, G., Butler-Browne, G., Bastide, B., Mouly, V., & Trollet, C. (2016). Nuclear poly(A)-binding protein aggregates misplace a pre-mRNA outside of SC35 speckle causing its abnormal splicing. *Nucleic Acids Research*, *44*(22), 10929–10945. https://doi.org/10.1093/nar/gkw703
- Klepikova, A. v., Kasianov, A. S., Gerasimov, E. S., Logacheva, M. D., & Penin, A. A. (2016). A high resolution map of the *Arabidopsis thaliana* developmental transcriptome based on RNA-seq profiling. In *Plant Journal* (Vol. 88, Issue 6, pp. 1058–1070). https://doi.org/10.1111/tpj.13312
- Kozlov, G., Ménade, M., Rosenauer, A., Nguyen, L., & Gehring, K. (2010). Molecular determinants of PAM2 recognition by the MLLE Domain of Poly(A)-Binding Protein. *Journal of Molecular Biology*, 397(2), 397–407. https://doi.org/10.1016/J.JMB.2010.01.032
- Mangus, D. A., Evans, M. C., & Jacobson, A. (2003). Poly(A)-binding proteins: Multifunctional scaffolds for the post-transcriptional control of gene expression. *Genome Biology*, 4(7), 1–14. https://doi.org/10.1186/gb-2003-4-7-223
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, *15*(3), 473–497.

- Muro-Medina, C. V. (2014). Caracterización funcional del gen AtGRDP1 durante el crecimiento y desarrollo de Arabidopsis thaliana [Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica]. https://repositorio.ipicyt.edu.mx/handle/11627/3919?show=full
- Ortega-Amaro, M. A., Rodriguez-Hernandez, A. A., Rodriguez-Kessler, M., Hernandez-Lucero, E., Rosales-Mendoza, S., Ibanez-Salazar, A., Delgado-Sanchez, P., & Jimenez-Bremont, J. F. (2015). Overexpression of AtGRDP2, a novel glycine-rich domain protein, accelerates plant growth and improves stress tolerance. *Frontiers in Plant Science*, 5(JAN), 1–16. https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00782
- Palanivelu, R., Belostotsky, D. A., & Meagher, R. B. (2000). Arabidopsis thaliana poly (A) binding protein 2 (PAB2) functions in yeast translational and mRNA decay processes. *Plant Journal*, 22(3), 187–198. https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2000.00721.x
- Raghavendra, A. S., Gonugunta, V. K., Christmann, A., & Grill, E. (2010). ABA perception and signalling. In *Trends in Plant Science* (Vol. 15, Issue 7, pp. 395–401). https://doi.org/10.1016/j.tplants.2010.04.006
- Rigal, M., Kevei, Z., Pélissier, T., & Mathieu, O. (2012). DNA methylation in an intron of the IBM1 histone demethylase gene stabilizes chromatin modification patterns. *EMBO Journal*, 31(13), 2981–2993. https://doi.org/10.1038/emboj.2012.141
- Rodríguez-Hernández, A. A., Ortega-Amaro, M. A., Delgado-Sánchez, P., Salinas, J., & Jiménez-Bremont, J. F. (2014). AtGRDP1 gene encoding a Glycine-Rich Domain protein is involved in germination and responds to ABA signalling. *Plant Molecular Biology Reporter*, 32(6), 1187–1202. https://doi.org/10.1007/s11105-014-0714-4
- Shkolnik-Inbar, D., Adler, G., & Bar-Zvi, D. (2013). ABI4 downregulates expression of the sodium transporter HKT1;1 in Arabidopsis roots and affects salt tolerance. *Plant Journal*, 73(6), 993–1005. https://doi.org/10.1111/tpj.12091
- Smith, R. W. P., Blee, T. K. P., & Gray, N. K. (2014). Poly(A)-binding proteins are required for diverse biological processes in metazoans. *Biochemical Society Transactions*, 42(4), 1229–1237. https://doi.org/10.1042/BST20140111
- Song, J., McGivern, J. v., Nichols, K. W., Markley, J. L., & Sheets, M. D. (2008). Structural basis for RNA recognition by a type II poly(A)-binding protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(40), 15317– 15322. https://doi.org/10.1073/pnas.0801274105
- Thompson, C. A. H., & Wong, J. M. Y. (2020). Non-canonical Functions of Telomerase Reverse Transcriptase: Emerging Roles and Biological Relevance. Current Topics in Medicinal Chemistry, 20(6), 498–507. https://doi.org/10.2174/1568026620666200131125110

- Yoshida, T., Mogami, J., & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2014). ABA-dependent and ABA-independent signaling in response to osmotic stress in plants. In *Current Opinion in Plant Biology* (Vol. 21, pp. 133–139). Elsevier Ltd. https://doi.org/10.1016/j.pbi.2014.07.009
- Zhu, J. K. (2001). Plant salt tolerance. *Trends in Plant Science*, *6*(2), 66–71. https://doi.org/10.1016/S1360-1385(00)01838-0